



Rôle de l'autotaxine dans la dissémination métastatique à l'os : implication des plaquettes sanguines, de l'intégrine Alpha V/Beta3 et du protéoglycane syndecan-4

Raphaël Leblanc

► To cite this version:

Raphaël Leblanc. Rôle de l'autotaxine dans la dissémination métastatique à l'os : implication des plaquettes sanguines, de l'intégrine Alpha V/Beta3 et du protéoglycane syndecan-4. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10354 . tel-01128285

HAL Id: tel-01128285

<https://theses.hal.science/tel-01128285>

Submitted on 9 Mar 2015

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.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES DE LA VIE

(Arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2014 par

Raphaël LEBLANC

**Rôle de l'autotaxine dans la dissémination
métastatique à l'os: implication des
plaquettes sanguines, de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ et
du protéoglycane syndecan-4**

INSERM U1033 :

« Physiopathologie, Diagnostic et Traitements des Maladies Osseuses »

Thèse dirigée par le Docteur Olivier PEYRUCHAUD

MEMBRES DU JURY :

Monsieur le Professeur Dominique HEYMANN	Président du jury
Monsieur le Docteur Daniel BOUVARD	Rapporteur
Monsieur le Docteur Jean-Sébastien SAULNIER-BLACHE	Rapporteur
Madame le Docteur Chantal DIAZ-LATOUD	Examineur
Monsieur le Docteur Olivier PEYRUCHAUD	Directeur de thèse
Monsieur le Docteur Philippe CLÉZARDIN	Directeur de l'unité U1033

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le laboratoire de Physiopathologie, Diagnostic et Traitements des Maladies Osseuses – INSERM UMR 1033 – grâce à un financement de la Ligue Contre le Cancer.

En premier lieu, je tiens à remercier M. le Docteur Philippe CLÉZARDIN, directeur de cette unité, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour ses conseils avisés.

Je tiens particulièrement à remercier M. Olivier PEYRUCHAUD qui a encadré ce projet et qui m'a accueilli au sein de son équipe dès mon premier stage de master. Tout au long de ces années de travail, son expérience, sa rigueur et la pertinence de son jugement m'ont permis d'apprendre énormément et de surmonter l'ensemble des difficultés rencontrées. Ses conseils et sa disponibilité m'ont permis d'avancer, plus que son genou et les deux miens ne nous l'ont permis ! Ce fut également très agréable d'échanger sur d'autres domaines tels que le sport, le cinéma ou de comparer nos avancées dans la rééducation !

Je remercie également le Dr. Jean-Sébastien SAULNIER-BLACHE et le Pr. Dominique HEYMANN pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu me porter en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse. Je tiens à exprimer mes remerciements au Dr. Daniel BOUVARD qui me fait l'honneur de présider le jury. Mes pensées vont également au Dr. Ulrich VALCOURT, qui a suivi l'avancée de ces travaux en ayant accepté d'être membre de chacun de mes comités de thèse mais également de ce jury.

Few words in English, to especially thank M. Debashish SAHAY, my coworker and English teacher too. It was a real pleasure to share jokes, laughs, lunches, dinners, and very weird bets all together with Sophie. I'll never forget this trip in US, the brilliant idea you had both together with Sophie in New York, to do a bus tour while it was -5°C. Or your very good prediction in Miami 'I think we should take off soon' ... whereas we finally took off 33 hours later!!! I wish you all the best for your future and a good adventure in Houston!

Je remercie également M. Johnny « doigts de fée » RIBEIRO. Sa bonne humeur, ses « blagues légendaires » et son avis « éclairé » sur Disney et Britney Spears nous ont accompagné sur de nombreuses expériences, de la préparation des plaquettes à l'ensemble des expérimentations animales que nous avons conduites.

Je tiens également à remercier Mlle Marion DAVID, qui m'a guidé à mon arrivée dans ce laboratoire, a eu la patience de m'encadrer lors de mes premiers mois de stage et d'avoir eu la gentillesse de partager sa paillasse !

J'adresse un grand merci à tous les membres actuels et à ceux qui ont fait partie des équipes de l'unité 1033, pour tous les services rendus, les conseils et apprentissages de manips, et pour toutes les interactions, scientifiques et autres, que nous avons pu avoir

ensembles. Merci donc à Martine, Edith, Caroline, Chantal, Casina, Lise, Agnieszka, Sandra, Lamia, Mathilde, Anaïd, Tristan, François et Geoffrey ! J'adresse un merci particulier à Jean Paul du 6ème, qui a pris le temps de m'aider pour toutes les analyses d'images, à Jean Charles et à Cindy de HEH qui nous ont aidé Debashish et moi à réaliser nos tests ELISA.

Je tiens également à remercier deux amis qui m'ont accompagné depuis la licence : Bastien LAPERROUSAZ qui, au lieu de m'aider en travaux pratiques, préférait se filmer en train de flotter dans une piscine, et Guillaume MARGAILLAN qui a préféré délaisser la magnifique ville de Rillieux La Pape pour s'exiler au Canada !

Un immense merci à Mitaine et à mon petit Henri qui, après avoir manqué leur coup à l'aéroport de NY (soit disant que je me suis échappé ...), m'ont par la suite toujours soutenu et apporté ce dont j'avais besoin (et même toujours plus !). Vous avez toujours été présents, même dans les moments les plus difficiles et c'est grâce à vous si j'en suis arrivé jusque là. Un merci plus particulier à Mitaine qui a eu la « joie » de corriger l'orthographe de tous mes rapports !

Enfin je voudrais remercier « Chewi ». Tes côtés « brave et serviable » m'ont permis d'obtenir le sang nécessaire à mes expériences ! Je pense que nous avons dû énerver pas mal de monde à cause de nos fous rires et nos débats animés sur le cinéma (Drive est un navet) ou le sport (Federer est une légende, contrairement à Nadal). Tu réussis également l'exploit de me supporter au quotidien (même s'il faut avouer que tu n'es pas en reste non plus !). Merci de m'avoir soutenu dès le premier jour, de m'avoir « sauvé la vie :p » et pour l'aide que tu m'as et que tu continues à m'apporter. Je suis très fier de désormais t'accompagner et je compte bien t'emmerder un long moment !

Résumé

L'inhibition de la dissémination métastatique est un enjeu majeur en cancérologie car les métastases sont responsables de la mortalité liée aux cancers. Les patients atteints de cancer du sein et ceux atteints de cancer de la prostate développent notamment des métastases osseuses. Mon travail s'est inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux facteurs impliqués dans les événements précoces de la formation des métastases à l'os. L'autotaxine (ATX) est une glycoprotéine sécrétée qui grâce à son activité lysophospholipase D est à l'origine d'un lipide biologiquement actif, l'acide lysophosphatidique (LPA), dans la circulation sanguine. Notre laboratoire a montré que l'expression de l'ATX par les cellules tumorales contrôle la dissémination métastatique spontanée des cellules de cancer du sein et la formation des métastases osseuses. Au cours de cette thèse, nous avons dans un premier temps observé que le ciblage thérapeutique précoce de l'ATX dans un modèle animal préclinique, avec des inhibiteurs de l'activité lysophospholipase D, bloque de façon remarquable la dissémination métastatique des cellules de cancer du sein. Cependant les mécanismes moléculaires à l'origine de l'action du LPA sur les cellules tumorales sont mal caractérisés. Nous avons ici montré, via des expériences *in vitro* et *in vivo*, que l'ATX circulante d'origine non tumorale et plus particulièrement l'ATX libérée par les plaquettes sanguines sous l'action des cellules tumorales, contrôle les événements précoces de la dissémination métastatique. Cependant, le LPA est un lipide extrêmement sensible à l'action des phosphatases, présentes en grande quantité dans les milieux extracellulaires. L'hypothèse actuelle est que l'activité du LPA serait dépendante de sa production locale, au voisinage immédiat de ses récepteurs présents à la surface des cellules. Ces travaux de thèse ont ainsi démontré que le pouvoir pro-métastatique de l'ATX dépend à la fois de son interaction avec l'intégrine $\alpha V\beta 3$ exprimée par les cellules tumorales, mais également d'un protéoglycane, Syndecan-4 présent en surface cellulaire. En conclusion, le ciblage de l'activité lysophospholipase D et le ciblage de l'interaction entre ATX et $\alpha V\beta 3$ et/ou Syndecan-4 présentent un haut potentiel thérapeutique chez des patientes atteintes d'un cancer du sein à fort risque métastatique.

Mots clefs : Autotaxine, $\alpha V\beta 3$, Syndecan-4, Plaquettes, Dissémination métastatique

Abstract

Autotaxin in cancer cell dissemination to the bone: involvement of blood platelets, α V β 3 integrin and Syndecan-4

Bone metastases are a frequent complication of cancer, occurring in up to 70 percent of patients with advanced breast or prostate cancer. Despite the improvement of current therapies, the survival of bone metastasis patients is only 24 months. This study aims to find new mechanisms involved in bone metastasis formation. Autotaxin (ATX/NPP2) is a secreted glycoprotein that generates lysophosphatidic acid (LPA) through its lysophospholipase D activity. Our lab previously demonstrated that ATX is overexpressed in multiple types of cancers and together with LPA generated during platelet activation promotes skeletal metastasis of breast cancer. However, the pathophysiological sequelae of regulated interactions between circulating LPA, ATX and platelets remain undefined in cancer. In this work we show that ATX is stored in α -granules of resting human platelets and released upon tumor cell-induced platelet aggregation, leading to the production of LPA. Our *in vitro* and *in vivo* experiments using human breast cancers cells that do not express ATX demonstrate that non-tumoral ATX controls the early stage of bone colonization by tumor cells. However, LPA is extremely sensitive to phosphatases, which are highly expressed in extracellular environment and at cell membranes. The molecular mechanisms involved in the local production of LPA at the bone metastatic site are still not well characterized. The present results establish that binding of ATX to α V β 3 integrin and/or the proteoglycan syndecan-4 allow LPA delivery to its receptors present at the surface of tumor cells. These results may have important implications in the development of new therapies for patients with bone metastases.

Keywords: Autotaxin, α V β 3, Syndecan-4, blood platelets, bone colonization by tumor cells

Sommaire

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 13

LA PHYSIOLOGIE OSSEUSE 14

A. STRUCTURE DE L'OS.....	14
B. COMPOSITION DU TISSU OSSEUX.....	15
1. Les cellules osseuses.....	16
2. La matrice osseuse.....	21
C. LE REMODELAGE OSSEUX.....	22

LES METASTASES OSSEUSES..... 25

A. COLONISATION DE LA MOELLE OSSEUSE.....	26
1. La niche pré-métastatique.....	26
2. Extravasation des cellules tumorales : le rôle majeur des plaquettes.....	27
3. Migration/invasion des cellules métastatiques dans la moelle osseuse.....	29
4. Adaptation des cellules tumorales à l'environnement osseux.....	31
B. LES METASTASES OSSEUSES OSTEOLYTIQUES.....	31
1. Les stimulateurs de la résorption osseuse.....	33
2. Les inhibiteurs de la formation osseuse.....	34
3. Matrice osseuse et ostéolyse.....	34
C. LES METASTASES OSTEOCONDENSANTES.....	35
D. TRAITEMENTS DES METASTASES OSSEUSES.....	36
1. Les thérapies non-médicamenteuses.....	36
2. Les thérapies médicamenteuses.....	37

ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE ET AUTOTAXINE 38

A. L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE (LPA).....	38
1. Structure, transport et localisation.....	39
2. Métabolisme.....	40
3. Récepteurs et signalisation.....	42
B. L'AUTOTAXINE (ATX/NPP-2).....	45
1. La famille des NPPs.....	45
2. Structure et fonctions.....	46
3. Gène et isoformes.....	49
4. Régulation de l'activité de l'autotaxine.....	50
C. ROLE DE L'AXE ATX/LPA.....	51
1. Conditions physiologiques.....	51
2. Conditions pathologiques.....	55
D. ATX, LPA ET CANCERS.....	60

1. Le LPA dans la physiopathologie du cancer.....	60
2. L'implication des récepteurs du LPA	62
3. Les différents rôles de l'autotaxine.....	65
E. L'AXE ATX/LPA DANS LES METASTASES OSSEUSES	67
1. Implication dans les métastases ostéolytiques	67
2. Implication dans les métastases ostéocondensantes	69
F. CIBLES THERAPEUTIQUES	70

CHAPITRE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE 73

A. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHES.....	74
1. Contexte de l'étude	74
2. Hypothèses.....	74
B. MATERIELS ET METHODES	76
1. Etudes <i>in vitro</i>	76
2. Modèles <i>in vivo</i> de formation des métastases osseuses	86
C. ATX ET PRODUCTION LOCALE DE LPA.....	90
1. Interaction ATX/cellules tumorales dépendante de l'intégrine $\alpha V\beta 3$	90
2. Implication de Syndecan-4 dans le maintien à la membrane de l'ATX	95
D. ATX CIRCULANTE, PLAQUETTES ET METASTASES OSSEUSES.....	102
1. Les cellules tumorales induisent l'agrégation plaquettaire et la libération d'ATX.....	102
2. L'ATX exogène contrôle la prolifération, l'invasion et la transmigration des cellules tumorales.....	107
3. NT-ATX contrôle la dissémination à l'os des cellules de cancer du sein	109

CHAPITRE 3 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 114

A. CELLULES TUMORALES ET PRODUCTION LOCALE DE LPA.....	115
1. ATX et intégrines de la famille $\beta 3$	115
2. ATX et Syndecan-4	116
3. Vers une coopération intégrine $\alpha V\beta 3$ /SDC4 ?	118
B. ATX/LPA ET DISSEMINATION METASTATIQUE	119
C. ATX/LPA ET PATHOPHYSIOLOGIES OSSEUSES	122
1. Origine du LPA au site osseux ?.....	122
2. Implication dans les pathologies osseuses ?.....	123

CHAPITRE 4 : ANNEXES..... 125

1. Effet du composé CRT0161016 sur la croissance tumorale et la dissémination à l'os.....	126
2. Effet du composé CRT0161016 sur la progression des métastases osseuses et pulmonaires.....	128

CHAPITRE 5 : PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES..... 132

A.	LISTES DES PUBLICATIONS	133
B.	LISTE DES COMMUNICATIONS A DES CONGRES SCIENTIFIQUES.....	133
CHAPITRE 6 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		135

Table des illustrations

Figure 1.	Structure d'un os long.	15
Figure 2.	La différenciation ostéoblastique.	17
Figure 3.	Représentation schématisque d'un ostéoclaste mature.	19
Figure 4.	La différenciation des ostéoclastes.	20
Figure 5.	Représentation schématisque des 5 étapes du remodelage osseux.	23
Figure 6.	Type de métastases osseuses.	26
Figure 7.	Implication des plaquettes dans la survie et l'extravasation des cellules tumorales.	28
Figure 8.	Mécanisme moléculaire de la progression d'une métastase osseuse.	32
Figure 9.	Structures chimiques des différentes formes du LPA.	39
Figure 10.	Synthèse et dégradation de l'acide lysophosphatidique.	41
Figure 11.	Voies signalisation majeures en réponse au LPA.	44
Figure 12.	La famille des NPPs.	46
Figure 13.	Structure de l'autotaxine humaine.	47
Figure 14.	Les différents isoformes de l'autotaxine humaine.	49
Figure 15.	Migration lymphocytaire médiée par l'autotaxine.	52
Figure 16.	Rôle de l'axe ATX/LPA dans la formation d'athérome.	58
Figure 17.	L'intégrine $\alpha V \beta 3$ fonctionnellement active est nécessaire et suffisante à l'adhésion sur l'ATX.	91
Figure 18.	L'intégrine $\alpha V \beta 3$ fonctionnellement active permet la fixation de l'ATX en solution.	93
Figure 19.	La fixation à l'ATX est liée au niveau d'expression en intégrine $\alpha V \beta 3$.	94
Figure 20.	La fixation des cellules tumorales à l'ATX n'est pas dépendante que de $\alpha V \beta 3$.	96
Figure 21.	Syndecan-4 permet le maintien de l'ATX à la surface des cellules tumorales.	97
Figure 22.	Syndecan-4 est impliqué dans l'adhésion des cellules 4T1 sur l'ATX.	98
Figure 23.	L'implication de SDC4 dans la dissémination métastatique est dépendante de l'expression en ATX des cellules 4T1.	100
Figure 24.	L'implication de SDC4 dans la progression des métastases osseuses est dépendante de l'expression en ATX des cellules 4T1.	101
Figure 25.	L'autotaxine est stockée dans les plaquettes sanguines humaines.	103

Figure 26.	Les cellules tumorales favorisent la libération d'ATX par les plaquettes et la formation de LPA.	105
Figure 27.	Mécanismes de production du LPA suite à l'interaction entre plaquettes sanguines et cellules tumorales.	106
Figure 28.	Les cellules de cancer du sein expriment les récepteurs au LPA, mais pas l'ATX.	107
Figure 29.	L'ATX exogène contrôle la prolifération, l'invasion et la transmigration.	108
Figure 30.	NT-ATX contrôle la progression des métastases osseuses ostéolytiques.	110
Figure 31.	NT-ATX contrôle la colonisation spontanée des cellules tumorales à l'os.	111
Figure 32.	Inhibition de la colonisation spontanée à l'os par l'ATX inactivée pour son activité lysoPLD.	112
Figure 33.	Le composé CRT0161016 affecte la reprise tumorale et la dissémination à l'os des cellules tumorales.	127
Figure 34.	Le composé CRT0161016 affecte modérément la reprise tumorale.	128
Figure 35.	Le composé CRT0161016 affecte la dissémination métastatique à l'os, mais pas au poumon.	129

Liste des tableaux

Tableau 1.	Caractéristiques des récepteurs du LPA.	43
Tableau 2.	Phénotypes des souris invalidées pour les récepteurs du LPA ou pour l'ATX.	55
Tableau 3.	Liste non exhaustive des inhibiteurs des récepteurs du LPA et de l'ATX.	71
Tableau 4.	Lignées cellulaires utilisées.	77
Tableau 5.	Liste des amorces humaines.	85

Liste des abréviations

ALP	Phosphatase Alcaline	MAG	Monoacylglycerol
AP-1	Activator Protein 1	MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
ATX	Autotaxine	M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
BALF	Bronchoalveolar Lavage Fluid	MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
BMP	Bone Morphogenetic Protein	MEC	Matrice Extracellulaire
BMU	Basic Multicellular Unit	MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
BP	Bisphosphonate	MPP	Matrix Metalloproteinase
BSP	Bone Sialoprotein	Msx2	Msh Homeobox
CDDP	Cisplatine	NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B
CCL-2	Chemokine Ligand 2	NFATc1	Nuclear Factor of Activated T-cell
CFU	Colony Forming Unit	NT-ATX	Non-Tumoral Autotaxine
COX-2	Cyclooxygenase-2	NUC	Nucléase
CTGF	Connective Tissue Growth Factor	OPG	Osteoprotegerin
CXCR-4	Chemokine C-X-C Receptor 4	OPN	Osteopontin
DAG	Diacylglycerol	PA	Phosphatidic Acid
DKK-1	Dickkopf-related Protein 1	PAP	Prostatic Acid Phosphatase
Dlx5	Distal-less Homeobox 5	PC	Phosphatidylcholin
Edg	Endothelial Differentiation Gene	PDGF	Platelet Derived Growth Factor
EGF	Epidermal Growth Factor	PGE2	Prostaglandine E2
ET-1	Endothéline 1	PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase	PKC	Protein Kinase C
FGF	Fibroblast Growth Factor	PLA1/2	Phospholipase A1/2
GPCR	G Protein-Coupled Receptor	PLC	Phospholipase C
IGF	Insulin-like Growth Factor	PSA	Prostate-Specific Antigen
IL	Interleukin	PTH	Parathyroid Hormone
IP3	Inositol-triphosphate	PTHrP	Parathyroid Hormone-related Protein
LDL	Low Density Lipoprotein	RANK	Receptor Activator of NF- κ B
LCAT	Lecithin Cholesterol Acyl Transferase	RANK-L	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
LIF	Leukemia Inhibitory Factor	Runx2	Runt Related Transcription Factor 2
LPA	Lysophosphatidic Acid	S1P	Sphingosine-1-Phosphate
LPAAT	LPA-Acyltransferase	SMD	Somatomedine-B Domaine
LPC	Lysophosphatidylcholin	TGF β	Transforming Growth Factor- β
LPE	Lysophosphatidylethanolamine	TNF	Tumor Necrosis Factor
LPP	Lipid Phosphate Phosphatase	uPA	Urokinase-Type Plasminogen Activator
LPS	Lysophosphatidylserine	UUO	Obstruction Urétérale Unilatérale
LysoPLD	Lysophospholipase D	VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

LA PHYSIOLOGIE OSSEUSE

Pour comprendre les mécanismes impliqués dans la formation et la progression des métastases osseuses, il faut savoir que l'os est un système complexe, dynamique, en renouvellement permanent. La nature même du tissu osseux influence le devenir des cellules cancéreuses métastatiques dans cet environnement.

L'os, caractérisé par sa dureté et son apparente rigidité, assure différentes fonctions au sein de l'organisme. L'ensemble du squelette forme la charpente du corps sur laquelle sont insérés muscles, tendons et ligaments, facilitant ainsi le mouvement. Il supporte les contraintes mécaniques, assure une fonction de soutien du corps, et protège les organes vitaux et le système nerveux central. Les os renferment également dans leurs espaces médullaires la moelle hématopoïétique, dont les cellules souches sont à l'origine des 3 lignées de cellules sanguines (érythrocytes, leucocytes, thrombocytes) ¹. Enfin les os exercent une fonction métabolique, liée à leur capacité à stocker calcium, sels minéraux et graisse. Son organisation est donc complexe : il est constitué de tissu osseux, qui lui donne sa dureté et sa résistance, mais on y trouve aussi du tissu cartilagineux, hématopoïétique, adipeux, conjonctif, ainsi que de nombreux vaisseaux et nerfs.

A. Structure de l'os

L'ensemble du squelette représente une part importante du corps humain. On recense 206 os, de formes et de tailles variées, qui représentent 1/5^{ème} du poids humain. On les classifie en 3 catégories : les os longs (fémur, tibia, humérus), les os courts (carpes, tarses et vertèbres) et les os plats (crâne, sternum, côtes). Pour décrire sa structure macroscopique nous prendrons l'exemple d'un os long tel que le fémur (**Figure 1**). Sa partie centrale se nomme la diaphyse, les deux extrémités sont les épiphyses, l'une proximale, l'autre distale. La diaphyse est la partie la plus résistante de l'os. Elle est traversée par un conduit central, creusé dans l'épaisseur de l'os et appelé cavité médullaire, dans lequel se loge la moelle osseuse, qui est à la fois un centre de stockage des graisses (moelle jaune) et où se déroule l'hématopoïèse (moelle rouge). Elle 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

épiphyses sont, quant à elles recouvertes de cartilage articulaire. Les métaphyses sont les régions intermédiaires des os situées entre diaphyse et épiphyses. Chez l'enfant, entre l'épiphyse et la métaphyse, se trouve une zone de jonction, le cartilage de conjugaison, qui assure la croissance de l'os en longueur. Ce cartilage de croissance disparaît à l'âge adulte. 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. Les os sont pourvus de vaisseaux artériels et veineux qui les nourrissent. Ils possèdent aussi des nerfs, en plus de l'innervation du périoste.

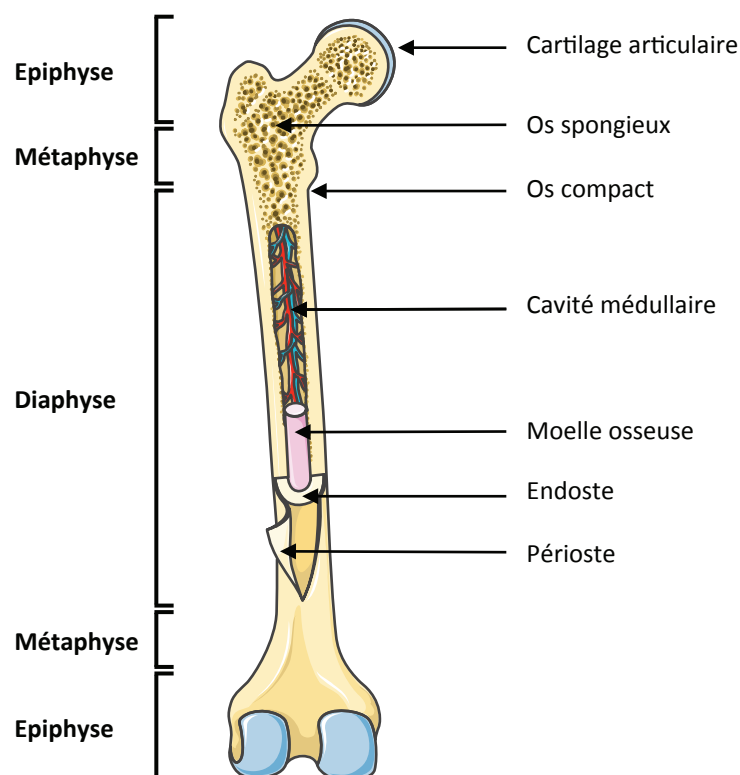


Figure 1. Structure d'un os long. Les extrémités (épiphyses) sont constituées d'os spongieux. La partie centrale (diaphyse) est constituée d'os compact.

B. Composition du tissu osseux

Le tissu osseux est une forme spécialisée de tissu conjonctif, d'origine mésenchymateuse, dont la substance fondamentale est prépondérante et fortement minéralisée. Il comprend une matrice osseuse, ainsi que des cellules osseuses impliquées dans le processus de remodelage osseux.

1. Les cellules osseuses

Le tissu osseux contient 4 types de cellules. Les ostéoblastes, les cellules bordantes et les ostéocytes sont impliqués dans la formation ou le maintien de la matrice osseuse. Les ostéoclastes sont quand à eux impliqués dans la destruction de l'os.

a) Les ostéoblastes

Organisation cellulaire et fonctions

Les ostéoblastes matures sont des cellules mononucléées de forme cuboïdale de 20 à 30 μm disposées en une monocouche cellulaire à la surface osseuse². Ils renferment un abondant réticulum endoplasmique granuleux responsable d'une importante basophilie du cytoplasme associée à une réactivité forte pour la phosphatase alcaline. Leur cytoplasme contient également de nombreuses mitochondries, un appareil de Golgi très développé, témoins d'une forte activité de synthèse protéique, et des vésicules de sécrétion. Les ostéoblastes possèdent des prolongements cytoplasmiques leur donnant la possibilité de contact avec d'autres ostéoblastes ou avec des ostéocytes via des jonctions communicantes. Les différentes étapes de maturation ostéoblastique sont marquées par l'expression de protéines associées à la synthèse de la matrice organique ou tissu ostéoïde (phosphatase alcaline, collagène de type I), puis par l'expression de marqueurs tardifs associés à la minéralisation osseuse (ostéocalcine, ostéopontine, sialoprotéine osseuse). A l'issue de la période de formation osseuse, la majorité des ostéoblastes meurent par apoptose (65%). Dans le cas contraire les ostéoblastes peuvent devenir des cellules bordantes ou subir une différenciation terminale en ostéocytes.

La différenciation ostéoblastique

Les progéniteurs ostéoblastiques sont des cellules souches mésenchymateuses, essentiellement présentes chez l'adulte dans le périoste et le stroma de la moelle osseuse. Ces cellules se caractérisent par une capacité proliférative élevée et une aptitude à se différencier en différents types cellulaires dont les ostéoblastes, les adipocytes et les chondrocytes, sous l'effet de facteurs de transcriptions spécifiques, d'interactions cellulaires et de facteurs systémiques locaux. L'expression du facteur Runx2/Cbfa-1 guide la différenciation de ces cellules souches dans la voie de différenciation ostéoblastique. Elle est également régulée par un ensemble moléculaire

complexe formé par Wnt: cette glycoprotéine se fixe au récepteur membranaire Frizzled, interaction qui peut être inhibée par la protéine DKK-1 et la sclérostine. L'interaction entre Wnt et Frizzled active la beta-caténine, dont l'expression marque l'entrée dans la voie ostéoblastique ³ (**Figure 2**).

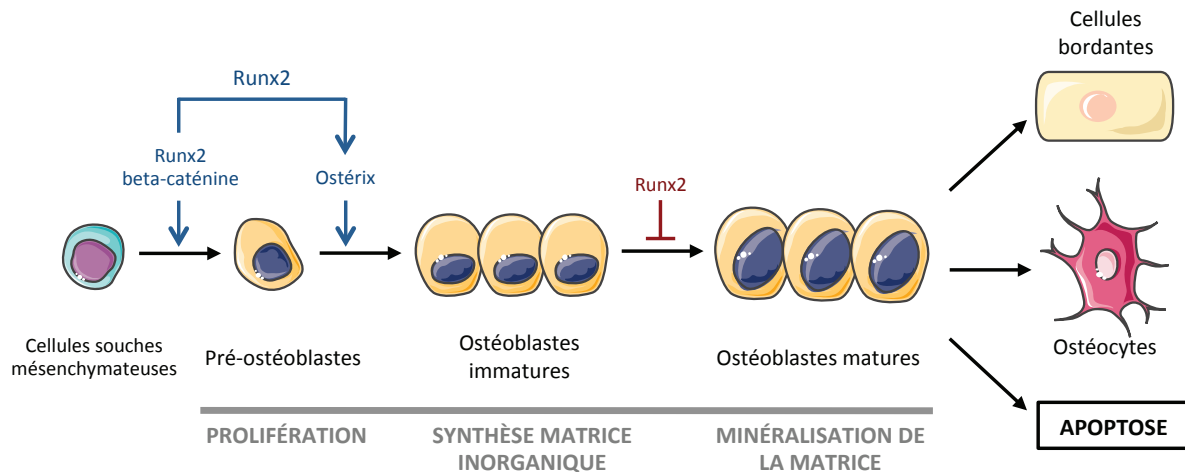


Figure 2. La différenciation ostéoblastique. L'action conjointe de différents facteurs tels que Runx2, la β -caténine et Ostérix notamment, les cellules progénitrices mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes matures capables de synthétiser de l'os.

Le facteur de transcription Ostérix, sous le contrôle de Runx2, permet le passage du stade pré-ostéoblaste à ostéoblaste immature ⁴. D'autres facteurs de transcription jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'ostéogénèse: Dlx5 (Distal-less homeobox) ⁵ et Msx2 (Msh Homeobox) ⁶ régulent positivement l'engagement des ostéoblastes vers le processus de différenciation. Les facteurs de la famille AP-1, notamment c-fos, participent au contrôle de la prolifération cellulaire aux stades précoces de la différenciation ⁷. Twist, quant à lui, est un régulateur négatif de l'ostéoformation car son inactivation fonctionnelle augmente la prolifération et la différenciation des ostéoblastes ⁸.

Plusieurs types d'interactions cellulaires ont un rôle inducteur ou permissif sur la différenciation ostéoblastique. La N-Cadhérine est par exemple impliquée dans l'induction des gènes de différenciation, dont Runx2, dans les ostéoblastes ⁹.

Enfin, plusieurs facteurs locaux sont d'importants régulateurs de la différenciation et de la fonction ostéoblastiques. Le TGF- β (Transforming Growth Factor- β), qui stimule la prolifération des ostéoblastes et inhibe la minéralisation, et les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) sont fondamentaux dans le contrôle de l'ostéogénèse, en agissant notamment sur l'expression de Runx2 ¹⁰.

b) Cellules bordantes et ostéocytes

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes inactivés ou quiescents, susceptibles, s'ils sont sollicités, de redevenir des ostéoblastes actifs ¹¹. Elles revêtent les surfaces osseuses qui, à un moment donné, ne sont soumises ni à la formation ni à la résorption osseuse. Ce sont des cellules aplaties et allongées, possédant peu d'organites, reliées entre elles et avec les ostéocytes voisins par des jonctions communicantes. Elles ont pour principale fonction d'assurer la communication entre la surface osseuse, l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse.

Certains ostéoblastes qui ne meurent pas par apoptose, se transforment en ostéocytes. Ce sont les cellules les plus abondantes de l'os, espacées régulièrement dans la matrice en formant un réseau de communication. Ces cellules, sensibles aux stimuli mécaniques, détectent le besoin d'une augmentation ou d'une diminution de la formation osseuse dans le processus d'adaptation fonctionnelle ou en cas de micro-fractures. Un fin réseau de canalicules affère à l'ostéoplaste, cavité qui contient l'ostéocyte. Les stimuli mécaniques sont transmis à l'ostéocyte via des flux liquidiens contenus dans ces canalicules. Par ailleurs, les ostéocytes régulent la formation osseuse via la sécrétion de sclérostine, un antagoniste de la voie Wnt. Cette protéine régule négativement l'activité et la différenciation des ostéoblastes ¹². Enfin, il semblerait que l'apoptose des ostéocytes soit le facteur déclenchant l'ancrage des ostéoclastes à la surface osseuse et par conséquent, la mise en place du processus de résorption ¹³.

c) Les ostéoclastes

Organisation cellulaire et activité de résorption

Les ostéoclastes sont des cellules géantes (50 à 100 μm) plurinucléées qui reposent sur le tissu osseux calcifié. Ils fonctionnent de manière cyclique, alternant des phases migratoires le long de la surface osseuse et des phases de résorption active créant des lacunes osseuses. L'ostéoclaste mature est polarisé. Son pôle apical est au contact de la matrice osseuse : il comprend une zone d'attachement ¹⁴, et délivre par une bordure en brosse (ruffled border) des enzymes lysosomales (TRAP, cathepsine K) et des métalloprotéases (MMP-9) qui vont dégrader la matrice¹⁵. Une structure dynamique complexe constituée d'un anneau d'actine (sealing zone) permet l'isolement d'une chambre de résorption étanche (lacune de Howship) pouvant atteindre un pH de 4.5 (**Figure 3**). L'acidité de ce compartiment est entretenue par des pompes à protons

ATPasiques spécifiques qui expulsent les ions H^+ ¹⁶. Le pôle baso-latéral est en rapport avec le microenvironnement : il a pour fonction essentielle le maintien de l'équilibre électrochimique de l'ostéoclaste via des excréteurs d'acide et de base qui acidifient le cytoplasme.

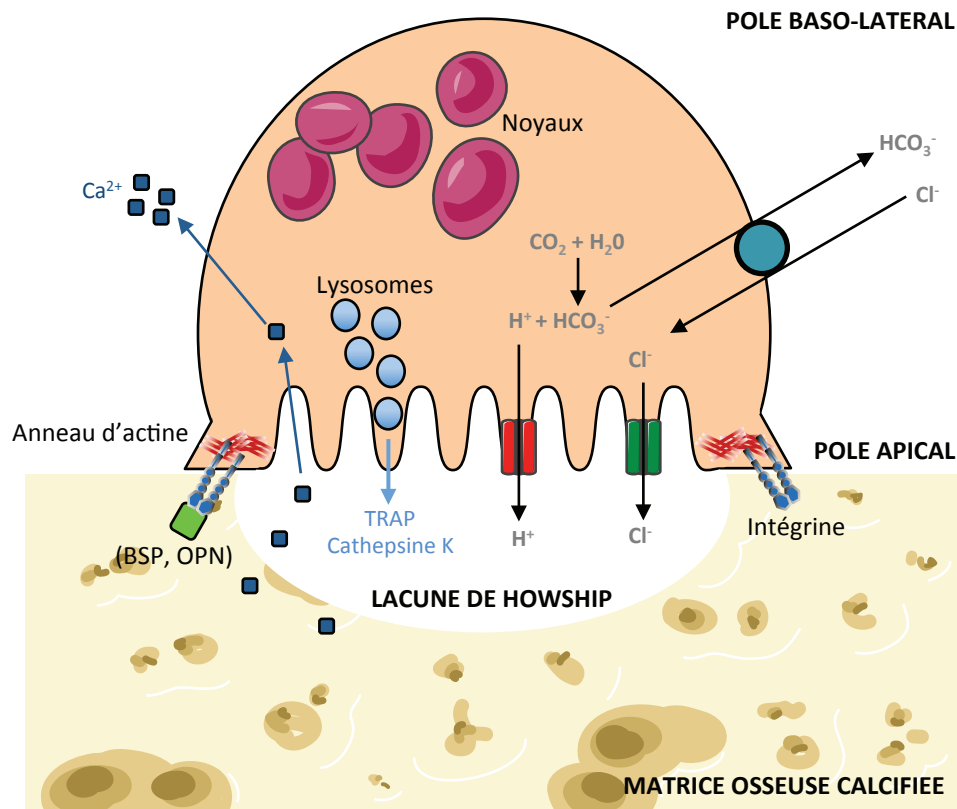


Figure 3. Représentation schématique d'un ostéoclaste mature. Après adhérence à la matrice, l'ostéoclaste va créer un environnement acide (libération de proton) au niveau de la chambre de résorption. Cette acidité va dissoudre la matrice minérale, entraînant un relargage de calcium et de facteur de croissance. L'action de protéases spécifiques des ostéoclastes (TRAP, Cathepsine K) va dégrader la matrice organique.

La motilité des ostéoclastes et leur attachement à la matrice osseuse via la sealing zone sont contrôlés par la réorganisation du cytosquelette d'actine et par la distribution des podosomes. Ces structures d'adhérence sont constituées de protéines membranaires de types intégrines ($\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha 2\beta 1$) qui, en interagissant avec des protéines adhésives (Ostéopontine, Sialoprotéine osseuse, Fibronectine), permettent l'adhésion des ostéoclastes à la matrice¹⁷. Les podosomes sont sous le contrôle de nombreux facteurs de transduction du signal tel que c-Src, FAK (Focal Adhésion Kinase) ou la PI3 kinase qui jouent un rôle déterminant dans l'assemblage et le désassemblage des structures d'adhérence¹⁵.

Origine et différenciation

Les ostéoclastes dérivent des cellules souches hématopoïétiques commune aux cellules de la lignée monocyte-macrophage. La spécification des pro-monocytes en ostéoclastes se fait sous l'influence de 3 principaux facteurs : M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), RANK-L (Receptor Activator of NF- κ B ligand) et son antagoniste l'ostéoprotégérine (OPG) ¹⁸⁻²⁰. La maturation des ostéoclastes et l'acquisition de leur fonction spécifique se font après leur migration vers la surface osseuse et leur fusion asynchrone, entraînant la formation d'une cellule multinucléée (**Figure 4**).

La différenciation des ostéoclastes ne peut se réaliser qu'en présence de M-CSF, sécrété par les précurseurs ostéoblastiques. En se fixant sur son récepteur CSF1R/cfms (Colony Stimulating Factor 1 Receptor), il stimule la prolifération et la survie des précurseurs ostéoclastiques. Il induit également la production du récepteur RANK, une protéine transmembranaire qui appartient à la famille des récepteurs du TNF (Tumor Necrosis Factor).

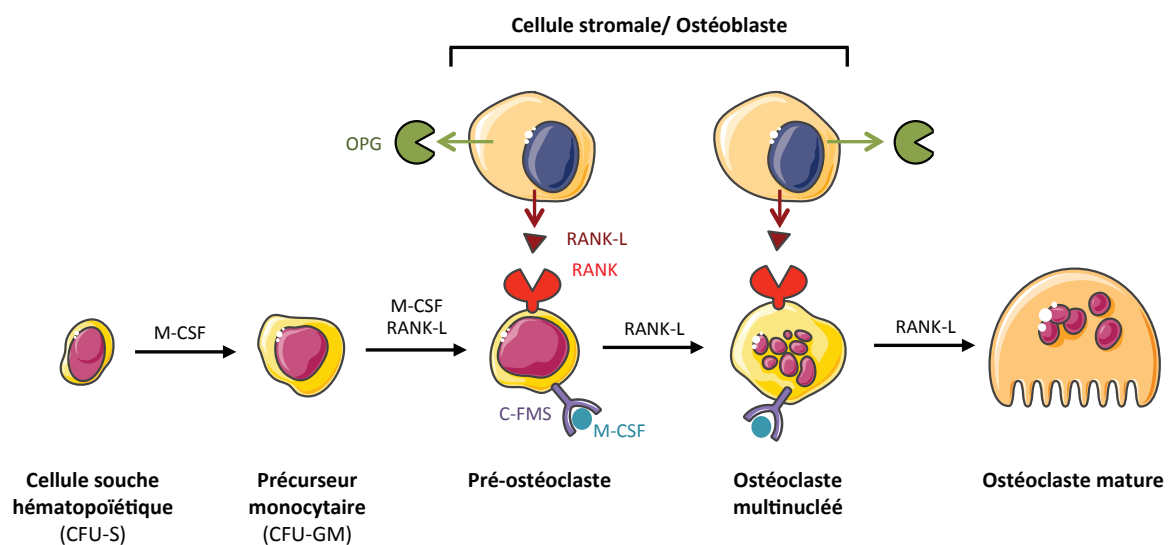


Figure 4. La différenciation des ostéoclastes. Sous l'action des facteurs M-CSF et RANK-L, les cellules souches hématopoïétiques CFU-S vont se différencier en ostéoclaste mature capable de dégrader la matrice osseuse.

Dans l'os, RANK-L est principalement synthétisé par les cellules mésenchymateuses du stroma-médullaire et les ostéoblastes. RANK-L se fixe sur le récepteur RANK ce qui stimule alors la fusion des précurseurs ostéoclastiques et la synthèse de protéines essentielles à l'activation de la résorption osseuse (intégrine α V β 3, récepteur à la calcitonine, cathepsine K) ²¹. L'ostéoprotégérine (OPG) est un récepteur leurre, inhibiteur naturel de RANK-L. Elle se lie à RANK-L et empêche son interaction avec RANK. Elle est synthétisée sous forme soluble par les cellules de la lignée ostéoblastique.

Sa sécrétion augmente d'autant plus que le degré de différenciation des cellules est élevé. OPG inhibe la différenciation, la survie et la fusion des précurseurs des ostéoclastes. C'est le rapport de sécrétion OPG/RANK-L par les ostéoblastes qui contrôle le processus de résorption osseuse ²¹.

2. La matrice osseuse

La matrice extracellulaire comprend une fraction organique (25%) et une fraction inorganique minérale (65%). Sa teneur en eau est d'environ 10% mais reste variable selon la pièce osseuse, le degré de minéralisation et l'âge. L'ostéoblaste synthétise la matrice osseuse et régule sa minéralisation.

La fraction organique de cette matrice est composée à 90% de collagène de type I organisé en fibres pour former un réseau collagénique. L'orientation des fibres de collagène confère à l'os son élasticité et sa capacité à résister aux tensions. Des protéines non collagéniques (PNC) sont associées à cette matrice organique : la plupart d'entre elles établissent un échafaudage pour la minéralisation osseuse. On distingue en premier lieu des protéines endogènes, groupe comprenant des glycoprotéines, des protéoglycanes et des gla-protéines. La glycoprotéine la plus représentée est l'ostéonectine qui fournit des sites permettant l'ancrage de cristaux d'hydroxyapatite à la matrice et qui sont impliqués dans la croissance et la fixation des ostéoblastes. D'autres glycoprotéines, tels que l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse ou la fibronectine, sont impliquées dans la maturation des ostéoblastes ou dans l'attachement des ostéoclastes à la matrice osseuse. Elles renferment en effet un motif arginine-glycine-acide aspartique (RGD) reconnues par certaines protéines membranaires de la famille des intégrines ²². Certains protéoglycanes (biglycan, décorine) interagissent avec des facteurs de croissance et sont impliqués dans l'agencement des fibres de collagènes. Parmi les gla-protéines, l'ostéocalcine, marqueur de l'activité ostéoblastique, est la plus abondante. Elle favorise la fixation du calcium à la matrice osseuse et sa concentration dans le sang circulant est utilisée comme indice de formation osseuse ^{23,24}. On retrouve aussi des protéines plasmatiques, qui s'accumulent dans l'os du fait de leur affinité pour l'hydroxyapatite (albumine, α 2-HS glycoprotéine) ^{25,26}. Des facteurs de croissance ou des cytokines (TGF- β , Insulin-like Growth Factor, BMPs) sont présents en petites quantités dans la matrice osseuse et jouent un rôle important dans le couplage entre formation et résorption osseuse ²⁷.

La matrice organique formée, appelée tissu ostéoïde, est minéralisée dans un second temps. La fraction minérale confère à l'os sa rigidité, sa résistance mécanique et constitue la principale réserve de l'organisme en minéraux. 99% du calcium, 85% du phosphore et entre 40 à 60% du sodium et magnésium sont incorporés dans cette matrice minérale. Elle est essentiellement composée de phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite $[\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, de formes hexagonales et aplaties, disposés dans les espaces inter-fibrillaires. La minéralisation se fait au niveau du front de minéralisation, c'est-à-dire à la jonction entre tissu ostéoïde et tissu minéralisé.

C. Le remodelage osseux

Que ce soit dans l'os compact ou trabéculaire, le tissu osseux est en constant renouvellement. Le remodelage osseux permet la substitution d'un os primaire infantile en os adulte plus résistant, la conservation des propriétés mécaniques, la réparation des fractures et le maintien de l'homéostasie calcique. Des anomalies du remodelage osseux mènent à divers troubles squelettiques. La perte osseuse inflammatoire dans les arthrites et des maladies parodontales est le résultat d'une stimulation de la résorption et d'une inhibition de la formation par des cytokines et des prostaglandines. IL-1, IL-6, TNF et d'autres facteurs de croissance sont eux impliqués dans l'ostéoporose, l'hyperparathyroïdie ou la maladie de Paget. Ces pathologies sont caractérisées à la fois par une sur-activation de la résorption et une stimulation de la formation osseuse ²⁷.

L'observation du tissu osseux amène à la conception d'une unité fonctionnelle de remodelage BMU (Basal Multi Cellular Unit), formée de deux équipes de cellules comprenant un sous-groupe ostéoblastique et un sous-groupe ostéoclastique dont les activités métaboliques sont couplées dans l'espace et le temps. Le résultat du travail d'une unité fonctionnelle est une unité structurale appelée ostéon. Les unités de remodelage ne sont pas synchrones, ce qui permet d'adapter la quantité d'os et son architecture en fonction de plusieurs facteurs, d'origine systémique, par intervention de la parathormone, de la vitamine D ou de facteurs locaux. Le processus de remodelage osseux se divise en 5 étapes distinctes (**Figure 5**).

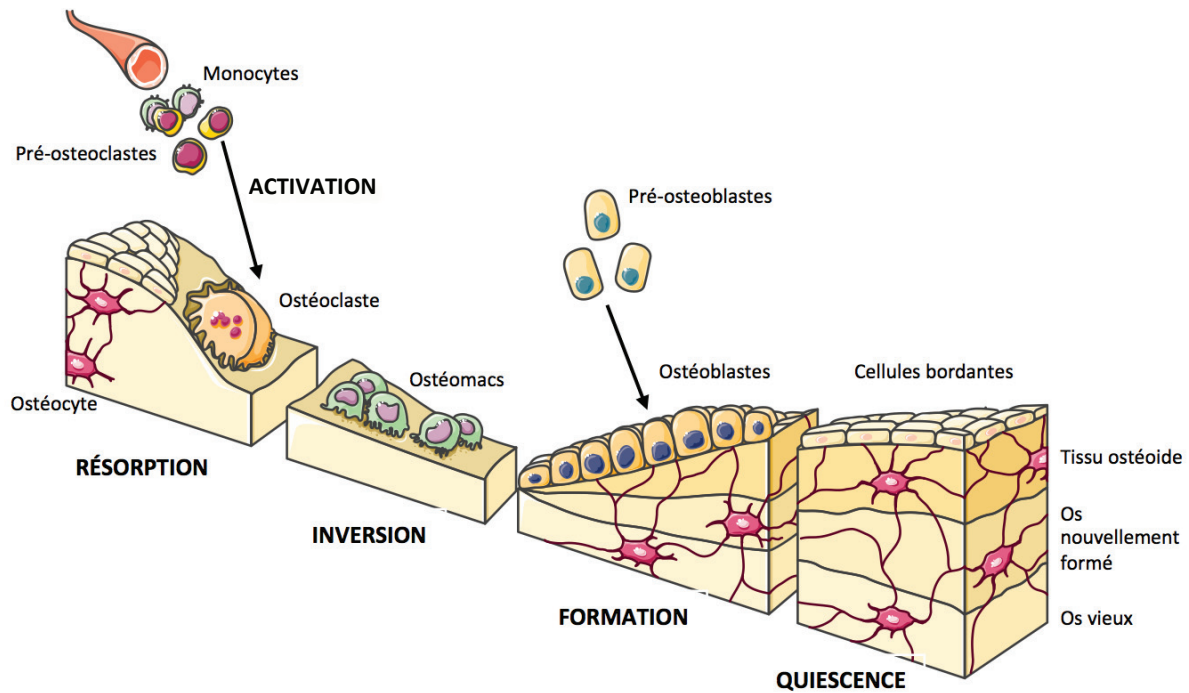


Figure 5. Représentation schématique des 5 étapes du remodelage osseux.

Phase d'activation

Le remodelage osseux est initié par la détection de signaux qui peuvent être de natures mécaniques (fracture, prise de poids), hormonales (estrogènes, PTH) ou nerveuses ²⁸. Ces changements sont repérés par les ostéocytes ²⁹ qui sécrètent de façon basale du TGF β , un inhibiteur de l'ostéoclastogénèse. Les dommages au niveau de la matrice osseuse entraîne l'apoptose des ostéocytes qui s'accompagne d'une diminution du niveau de TGF β , permettant à l'ostéoclastogénèse de débiter ³⁰. Les ostéocytes sécrètent également des protéines comme la sclérostine ou des protéines de la famille DKK, capables d'inhiber les ostéoblastes ³¹. Par ailleurs, la surface osseuse est normalement recouverte de cellules bordantes qui empêchent l'accès des ostéoclastes à la MEC. Sous l'action de facteurs ostéorésorbants (hormone parathyroïdienne (PTH), vitamine D3 et prostaglandine E2), les cellules bordantes se rétractent et libèrent l'accès aux ostéoclastes qui peuvent adhérer à la matrice osseuse.

Phase de résorption

Les ostéoblastes sont indispensables à la mise en place du programme de différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes actifs. Ils vont favoriser la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures via la production de cytokines telles que l'interleukine 6 (IL-6) et 11 (IL-11), le MCSF ou le RANK-L. Ces facteurs pro-résorptifs sont également sous le contrôle de la PTH qui diminue

l'expression d'OPG et favorise la production de M-CSF et RANK-L. Une fois ancré à la matrice osseuse, l'ostéoclaste mature déverse des enzymes protéolytiques dont le fonctionnement optimal est à pH acide (collagénase, cathépsine K, MMPs) ³². 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.

Phase d'inversion

Les mécanismes initiateurs de cette phase restent encore à découvrir. La dégradation de la matrice osseuse entraîne cependant une augmentation du niveau de calcium intracellulaire des ostéoclastes. On observe alors une désorganisation des podosomes, suivi d'un détachement des ostéoclastes qui entrent finalement en apoptose. Des cellules de réversions, appelées « ostéomacs », appartenant au lignage ostéoblastique, positive pour la phosphatase alcaline et négative pour le marqueur monocyte-macrophage MOMA-2 (monocyte + macrophage antibody-2), remplacent les ostéoclastes et éliminent les derniers débris de matrice au fond de la lacune de Howship ³³. Lors du processus de résorption, des facteurs de croissance sont libérés, tel que des IGFs, des Fibroblast Growth Factors (FGFs), des BMPs, ou le TGFβ ³⁴, et vont activer la différenciation des ostéoblastes. Ces derniers produisent de l'OPG qui va inhiber la différenciation ostéoclastique.

Phase de formation

Les cellules ostéoprogénitrices présentes à la surface de la matrice érodée, au fond de la lacune, se divisent et se différencient en ostéoblastes. Les ostéoblastes matures synthétisent et déposent une nouvelle matrice, l'ostéoïde, comblant ainsi la lacune de résorption. Plusieurs hormones, notamment les estrogènes, les androgènes et la vitamine D stimulent la production de matrice osseuse. Après un délai de 15 jours, la matrice se minéralise à la jonction entre tissu ostéoïde et tissu minéralisé.

Phase de quiescence

Une fois la phase de formation terminée, la majorité des ostéoblastes meurt par apoptose, certains se différencient en ostéocytes et d'autres en cellules bordantes. Le signal de terminaison qui informe la machinerie de remodelage est encore peu connu, même si un rôle des ostéocytes commence à émerger.

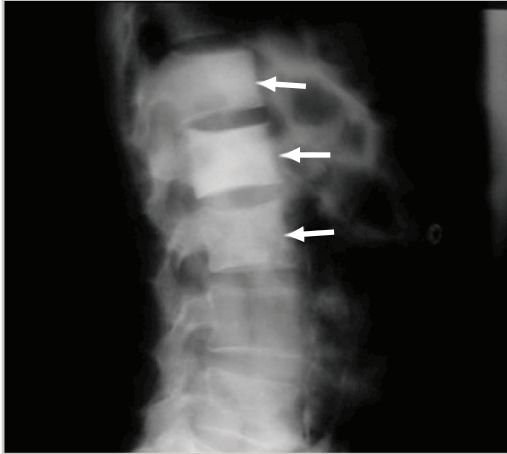
LES METASTASES OSSEUSES

Le squelette est le quatrième site métastatique après les ganglions, le poumon et le foie. Les métastases osseuses sont des complications fréquentes des cancers du sein, de la prostate, du poumon, du rein et de la thyroïde. Les sites les plus touchés sont le rachis lombaire et thoracique, puis le bassin, les côtes, le sternum, les fémurs, les humérus et enfin le crâne. Elles sont responsables, sur le plan clinique, de complications particulières telles que des fractures pathologiques, une hypercalcémie et des douleurs qui peuvent engager le pronostic vital ou aggraver rapidement la qualité de vie des patients ³⁵. Ces métastases sont le plus souvent ostéolytiques, amenant à une perte osseuse, parfois ostéocondensantes, amenant à une augmentation de la masse osseuse, ou mixtes (**Figure 6**). Les cellules tumorales ne dégradent pas l'os par elles-mêmes : elles sécrètent différents facteurs qui dérèglent les fonctions normales des ostéoclastes et des ostéoblastes, altérant alors l'équilibre existant entre la formation et la résorption osseuse ³⁶. Le tissu osseux joue également un rôle important dans la formation des métastases : c'est un réservoir de facteurs de croissance et de calcium qui, une fois libérés de la matrice résorbée, exercent une action mitogène sur les cellules tumorales. Les métastases osseuses sont ainsi le siège d'un cercle vicieux qui s'établit entre le développement tumoral et l'activité des cellules osseuses ³⁷.

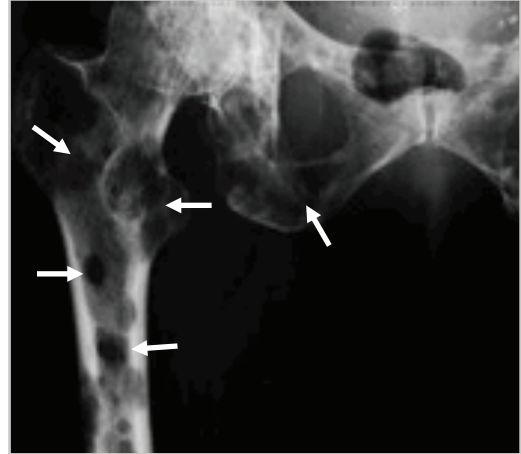
La formation des métastases osseuses dépend de la succession d'étapes complexes dont certaines sont communes aux processus généraux de dissémination métastatique de la plupart des cancers (mise en place d'une niche métastatique dans le tissu hôte, chimiotactisme des cellules tumorales vers le tissu hôte, extravasation des cellules tumorales de la circulation sanguine au site secondaire) et d'autres particulières liées à la spécificité du tissu osseux (invasion, nidation des cellules tumorales dans l'environnement osseux, ostéomimétisme).

A.

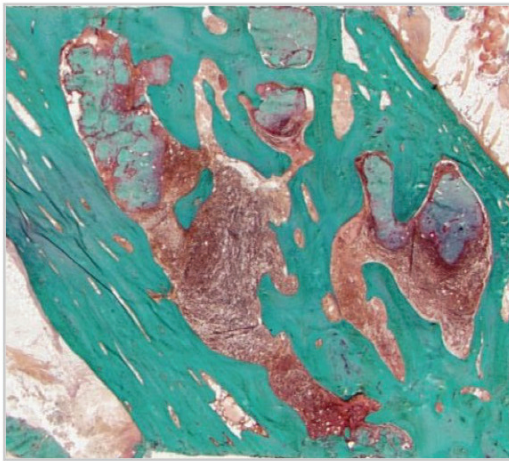
MÉTASTASE OSTÉOCONDENSANTE



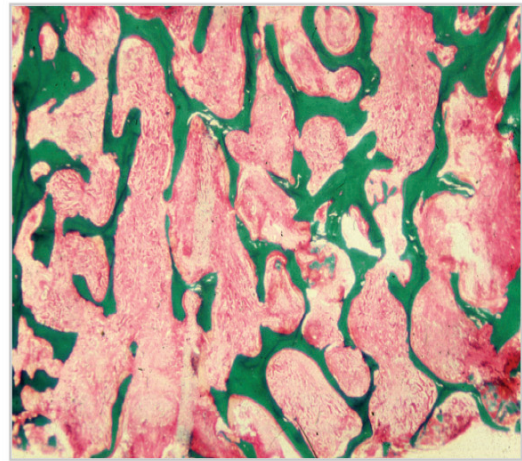
MÉTASTASE OSTÉOLYTIQUE



B.



Cancer de la prostate



Cancer du sein

Figure 6. Type de métastases osseuses. A: Images radiographiques de métastases osseuses. Métastases ostéocondensantes (à gauche), vertèbre « ivoire ». Métastases ostéolytiques (à droite), plages d'ostéolyses au niveau du fémur et de la hanche. B: Images histologiques caractéristiques de métastases osseuses après coloration au trichrome de Goldner. L'os minéralisé apparaît en vert et les composants cellulaires de la moelle osseuse en rose. Dans le cas du cancer de la prostate, le déséquilibre est en faveur de la formation osseuse. Il s'agit d'une métastase ostéocondensante avec épaissement des travées osseuses. Dans le cas du cancer du sein, le déséquilibre est en faveur de la résorption : on distingue une destruction des travées osseuses.

A. Colonisation de la moelle osseuse

1. La niche pré-métastatique

En 1889, Stephen Paget introduisait la théorie de la graine et du sol ³⁸ (*seed and soil theory*) selon laquelle les métastases ne sont pas distribuées par hasard dans l'organisme, mais ne peuvent croître que dans un environnement approprié : on parle dorénavant de niche pré-métastatique. La tumeur primitive crée les conditions favorables à la formation d'un foyer métastatique, sous l'effet de régulations génétiques,

de la production de facteurs solubles et de protéases. Dans le cadre des métastases osseuses, la plupart des études montrent que la tumeur primaire conditionne l'environnement osseux en sécrétant des facteurs circulants qui ciblent les cellules du microenvironnement osseux. De nombreuses tumeurs sécrètent par exemple de l'OPN, qui participe au recrutement des cellules de la moelle osseuse ³⁹, ou de la PTHrP (Parathyroid Hormone-related Protein), qui favorise la résorption osseuse et la production de facteurs locaux dans la moelle osseuse telle que la chemokine CCL2 ⁴⁰. Le VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) et le PIGF (Placental Growth Factor) mobilisent également les cellules mésenchymateuses et les cellules endothéliales progénitrices de la moelle osseuse. Ces dernières constitueront, respectivement, la matrice extracellulaire de la niche et sa vascularisation. Les cellules fibroblastiques de la niche pré-métastatique libèrent en retour des facteurs (CXCL-12, S100A8, S100A9) qui attirent les cellules tumorales dans cette niche ⁴¹.

2. Extravasation des cellules tumorales : le rôle majeur des plaquettes

La dissémination métastatique au tissu cible se fait principalement par la circulation sanguine. Via leur adhésion aux cellules métastatiques, les plaquettes sanguines leur confèrent une protection face aux cellules du système immunitaire et face aux contraintes mécaniques exercées par la circulation sanguine. La déplétion plaquettaire induit en effet une diminution de la formation de métastases pulmonaires et osseuses dans des modèles de xénogreffes et de tumeurs syngéniques chez la souris ⁴². En raison de la production d'un certain nombre de facteurs tels que la thrombine, des cystéines protéases ou de l'ADP, les cellules tumorales induisent non seulement l'activation des plaquettes mais provoquent également l'agrégation plaquettaire (**Figure 7**).

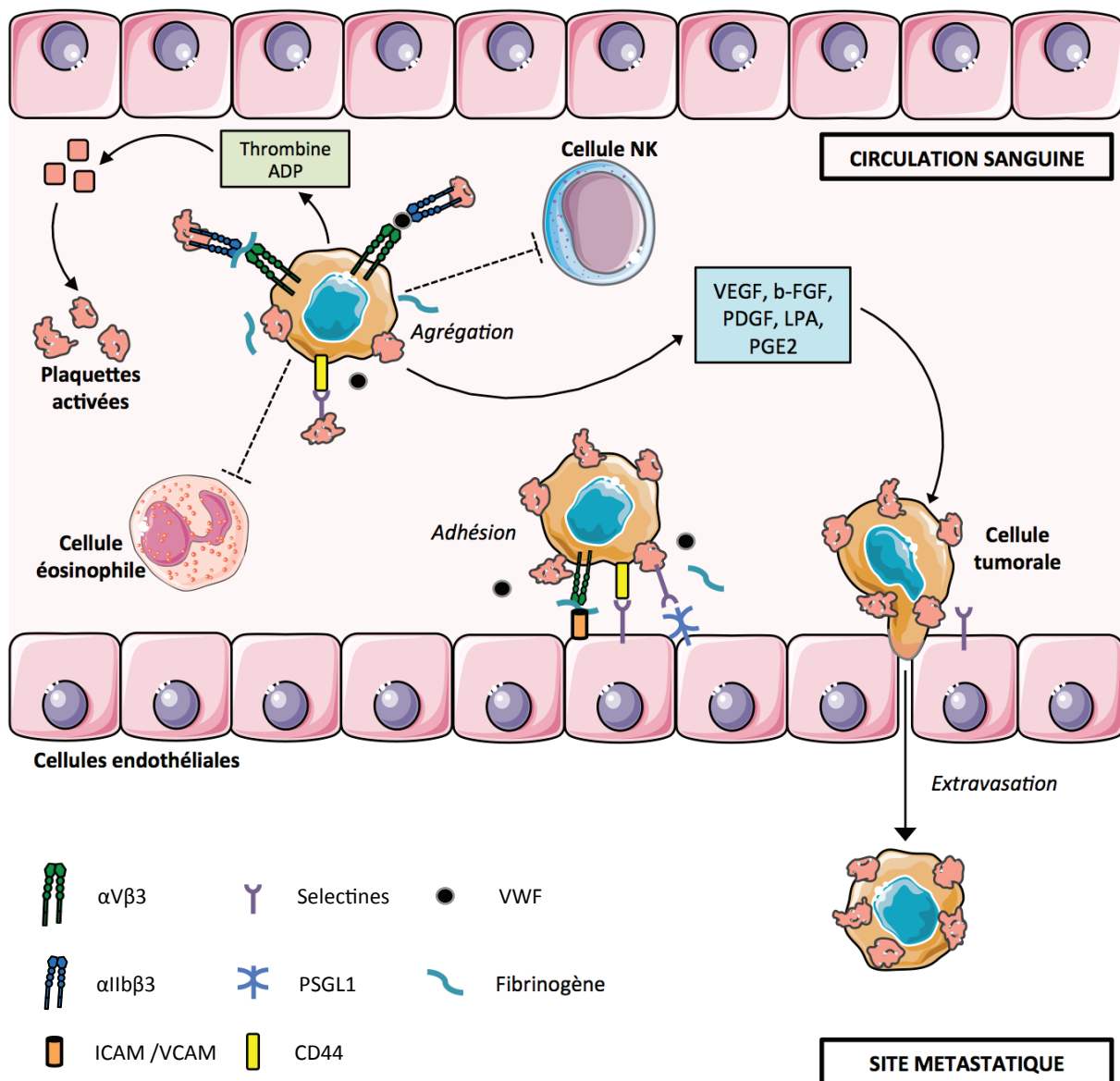


Figure 7. Implication des plaquettes dans la survie et l'extravasation des cellules tumorales. Les cellules tumorales activent les plaquettes via la sécrétion de facteurs tels que la thrombine ou l'ADP. Les plaquettes vont alors s'agréger aux cellules tumorales grâce à différents récepteurs (intégrines plaquettaires et tumorales, sélectine, CD44). L'agrégation plaquettes/cellules tumorales va permettre la survie des cellules tumorales dans la circulation sanguine, favoriser l'adhésion aux récepteurs des cellules endothéliales (ICAM/VCAM, PSGL1, intégrines), et stimuler la production de différents facteurs (VEGF, LPA, ...) impliqués dans l'extravasation des cellules tumorales à travers l'endothélium vasculaire.

L'intégrine $\alpha IIb \beta 3$, dont l'expression est restreinte à la lignée mégacaryocyto-plaquettaire, est le récepteur du fibrinogène qui permet la formation du clou plaquettaire. L'activation des plaquettes induit la libération de nombreux récepteurs de surface tels que la P-sélectine, et permet d'activer l'affinité de $\alpha IIb \beta 3$ vis-à-vis de ses ligands. À l'aide de chambres de perfusion qui permettent de reproduire *in vitro* l'environnement dynamique de la circulation sanguine, Konstantopoulos a montré que

les cellules tumorales sont capables de se fixer aux plaquettes : la P-sélectine plaquettaire interagit d'abord avec les récepteurs CD44 des cellules tumorales, ce qui permet le « Rolling » des plaquettes sur les cellules et induit un faible attachement. Puis, les intégrines $\alpha\text{IIb}\beta 3$ convertissent ce faible attachement en une adhésion ferme ⁴³. Les travaux de Felding-Habermann ont également montré une implication de l'intégrine $\alpha\text{V}\beta 3$ tumorale dans l'attachement des plaquettes aux cellules tumorales. L'utilisation d'anticorps dirigés contre $\alpha\text{V}\beta 3$ bloque efficacement l'interaction des cellules de cancer du sein avec les plaquettes en condition de flux, tandis que l'utilisation d'anticorps dirigés contre $\alpha\text{IIb}\beta 3$ abolit complètement cette interaction ⁴⁴. Ces résultats suggèrent un partenariat entre ces deux intégrines lors de l'interaction cellules tumorales/plaquettes.

Les plaquettes activées participent également à l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium vasculaire et à leur sortie de la circulation sanguine. Suite à l'agrégation, les plaquettes libèrent leurs contenus granulaires, notamment celui des granules- α qui comprennent du VEGF, du PDGF, de la PGE2 et du b-FGF. Les plaquettes activées relarguent également de l'Acide Lysophosphatidique (LPA), dont l'origine encore méconnue sera l'un des sujet d'étude de cette thèse. L'ensemble de ces molécules sont impliquées dans l'hyperméabilité vasculaire et l'extravasation⁴⁵. L'interaction des cellules tumorales avec l'endothélium fait intervenir d'autres molécules présentes à la surface des cellules endothéliales (sélectines, épireguline, galectine-3) : elles induisent une rétraction de l'endothélium vasculaire, permettant l'ancrage des cellules tumorales et des agrégats plaquettaires à la matrice extracellulaire sous-jacente et favorisent ainsi l'invasion des cellules métastatiques.

3. Migration/invasion des cellules métastatiques dans la moelle osseuse

L'axe CXCR4/CXCL-12

La dissémination des cellules métastatiques de la circulation sanguine vers la moelle osseuse fait intervenir différents facteurs qui sont produits par les ostéoblastes et les cellules stromales de la moelle osseuse. Une forte expression de CXCL-12 a ainsi été détectée au niveau des cellules endothéliales de la moelle osseuse : elle favorise la migration des cellules de cancer de la prostate et stimule leur production en MMP-9 et en intégrine $\alpha\text{V}\beta 3$ ⁴⁶. L'expression de CXCR4, récepteur de CXCL-12, par les cellules cancéreuses métastatiques a donc un rôle majeur dans leur migration à l'os. Elle est

associée à une forte production en IL-11 et en MMP-11, qui stimule la résorption osseuse en stimulant la synthèse de RANK-L par les ostéoblastes, et en CTGF/CCN2 qui stimule la prolifération des ostéoblastes et la néo angiogenèse ⁴⁷. Il a également été montré que l'inhibition pharmacologique de CXCR4 par le CTCE-9908 freine la dissémination métastatique des cellules MDA-MB-231 au poumon et à l'os démontrant le potentiel thérapeutique du ciblage de CXCR4 ⁴⁸.

Le RANK-L

Cette cytokine intervient dans la colonisation de la moelle osseuse par les cellules métastatiques. En plus de sa capacité à activer la différenciation ostéoclastique, il a été montré que RANK-L est capable d'interagir avec les cellules tumorales de plusieurs types de cancer (sein, prostate) qui expriment RANK : RANK-L peut en effet être libéré sous forme soluble grâce à l'action protéolytique de métalloprotéases matricielles (MMP-7, MMP-13) ou membranaires (MT-MMP-1) qui sont produites lors de la formation des métastases osseuses, et favoriser ainsi la migration cellulaire ⁴⁹. RANK-L stimule aussi indirectement l'invasion tumorale, soit en réprimant l'expression d'un inhibiteur endogène des sérines protéases, la maspine, favorisant ainsi la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire par les cellules néoplasiques ou/et en stimulant l'expression du récepteur membranaire CD147. Sa surexpression dans les tumeurs conduit à une stimulation de l'expression de la métalloprotéase MMP-9, favorisant l'invasion tumorale *in vitro* et la formation des métastases osseuses *in vivo* ⁵⁰.

Les protéases

Les métalloprotéases sécrétées par les cellules tumorales peuvent également intervenir dans les processus de migration et d'invasion cellulaire. Nous avons vu précédemment que MMP-7 et MMP-13 favorisent la libération de RANK-L. Des études de Kang ont également mis en évidence que des sous-clones ostéophiles de la lignée MDA-MB-231 surexprimant MMP-1 induisent une formation précoce des métastases osseuses vis à vis de la lignée parentale ⁴⁷. La cathepsine K est une protéase spécifique des ostéoclastes, capable de dégrader les fibres de collagène. Il a toutefois été montré que les cellules tumorales MDA-MB-231/B02 à fort tropisme osseux, expriment cette protéase et le traitement de ces cellules avec un antagoniste de la cathepsine K inhibe *in vitro* l'invasion tumorale ⁵¹.

Les intégrines

En plus de leur rôle dans la survie et l'extravasation des cellules tumorales, les intégrines permettent de créer des liaisons spécifiques avec la matrice osseuse et les cellules stromales. Notre laboratoire a notamment montré que l'expression de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ confère aux cellules tumorales une haute capacité à former des métastases osseuses ^{52,53}. Elle stimule l'adhésion et la migration des cellules tumorales, via l'interaction avec des composants de la matrice osseuse contenant l'adhésiotope RGD tels que l'ostéopontine (OPN), la fibronectine et la sialoprotéine osseuse (BSP). D'autres intégrines sont impliquées dans le tropisme osseux. Les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 4\beta 1$, respectivement récepteurs de la fibronectine, du collagène de type I et de VCAM-1, sont impliquées dans l'interaction des cellules de cancer du sein, de la prostate et des myélomes avec la matrice osseuse ⁵⁴.

4. Adaptation des cellules tumorales à l'environnement osseux

Le tissu osseux est un environnement hostile aux cellules métastatiques. Elles doivent donc s'adapter à cet environnement pour ultérieurement y proliférer. C'est probablement pour cette raison que les DTCs (Disseminated Tumor Cells) qui colonisent la moelle osseuse restent pendant plusieurs années en état de dormance avant d'être réactivées. Les cellules tumorales s'adaptent à l'environnement osseux en exprimant des gènes normalement exprimés par les cellules osseuses. L'analyse immuno-histochimique des métastases osseuses d'une patiente atteinte d'un cancer du sein révèle l'expression de protéines osseuses (cathepsine-K, ostéonectine, cadhérine-11, connexine-43 et Runx2) ⁵⁵. De même, l'analyse de métastases osseuses de cancer de la prostate montre que les cellules métastatiques ont acquis des propriétés ostéoblastiques, essentiellement via l'expression du récepteur Notch-1 ⁵⁶. Ce processus est appelé ostéomimétisme.

B. Les métastases osseuses ostéolytiques

Les métastases osseuses ostéolytiques sont, avec une proportion d'environ 75 %, les métastases osseuses les plus fréquentes. Les tumeurs primitives sont la plupart du temps des carcinomes des seins, des poumons, des reins ou de la thyroïde. Grâce au développement de modèles animaux reproduisant de façon satisfaisante la pathologie chez l'homme, il a pu être démontré que les métastases osseuses sont le siège d'un cercle

vicieux ³⁷ (**Figure 8**). Les cellules métastatiques présentes dans la cavité médullaire sécrètent de nombreux facteurs qui stimulent directement ou indirectement l'activité de résorption des ostéoclastes. Au cours de la résorption osseuse, des facteurs de croissance et du calcium emprisonnés dans la matrice osseuse, vont être libérés et stimuler à leur tour la croissance des cellules tumorales.

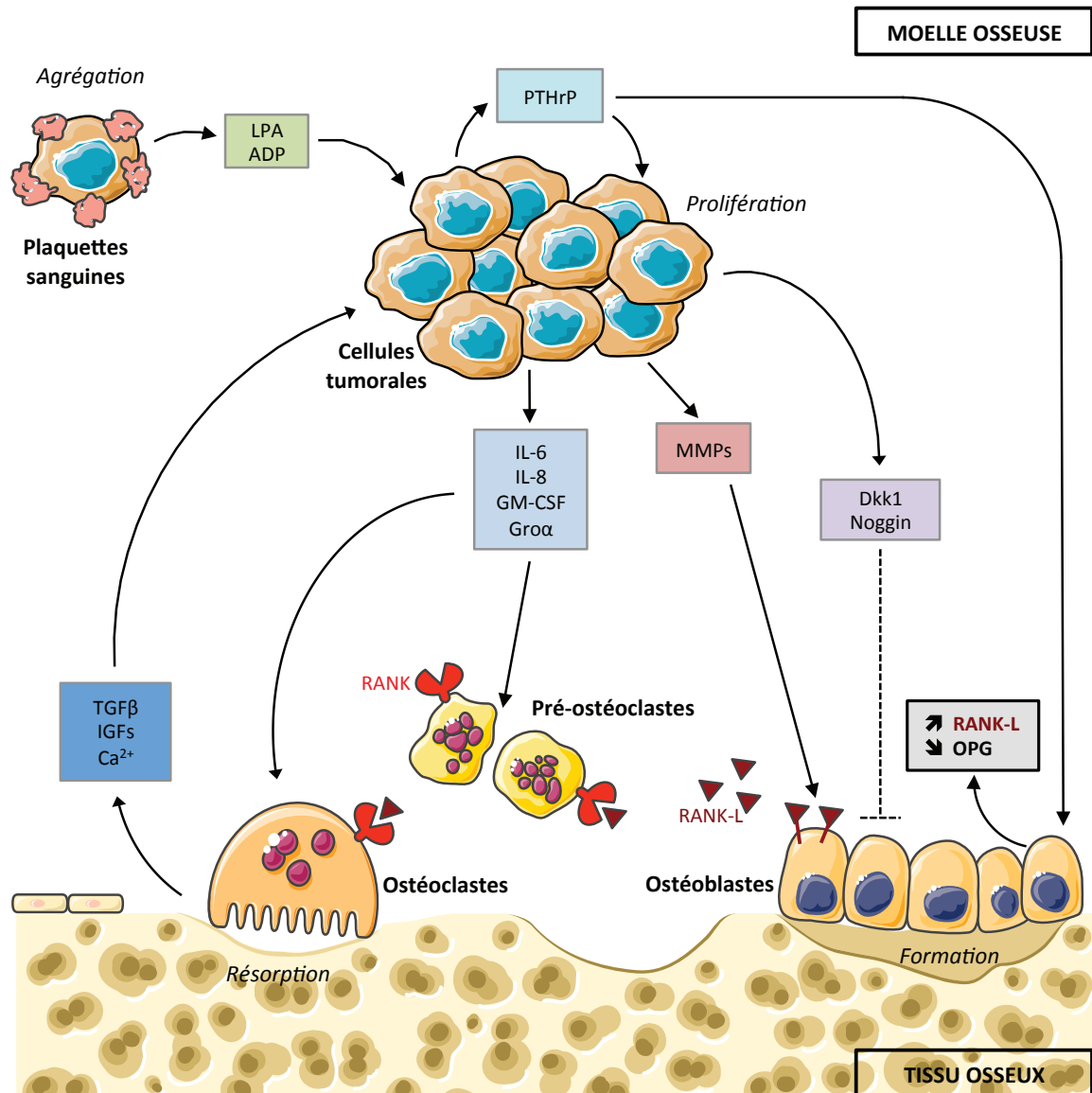


Figure 8. Mécanisme moléculaire de la progression d'une métastase osseuse. Les cellules de cancer du sein sécrètent différents facteurs (PTHrP, cytokines) qui stimulent la résorption osseuse dépendante des ostéoclastes. Elles produisent également des facteurs qui vont agir sur les ostéoblastes pour inhiber la phase de formation osseuse (Dkk1, Noggin) ou favoriser la production et la libération de RANK-L (MMPs). La matrice osseuse résorbée va libérer à son tour des facteurs de croissance (TGFβ, IGFs) et du calcium qui vont favoriser la prolifération des cellules tumorales. Les cellules tumorales présentes dans la cavité médullaire induisent également l'agrégation des plaquettes sanguines et la formation de LPA. Ce dernier va stimuler la croissance tumorale et la production de facteurs stimulant les ostéoclastes par les cellules tumorales (IL-6, IL-8, GM-CSF, Gro-α)

1. Les stimulateurs de la résorption osseuse

Les cellules tumorales sécrètent différents facteurs qui stimulent l'activité des ostéoclastes ou qui favorisent l'expression de RANK-L par les ostéoblastes.

La PTHrP est un peptide qui présente une homologie structurale avec la PTH, hormone clé du métabolisme phosphocalcique. Des études ont montré que 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 ⁵⁷. On sait désormais que ce peptide est capable de se fixer au récepteur de la PTH (PTH-1R) présent à la surface des ostéoblastes : cette interaction stimule l'expression de RANK-L, réprime l'expression en OPG, ce qui conduit indirectement à la formation de nouveaux ostéoclastes et donc à une stimulation de la résorption osseuse. La PTHrP peut aussi agir de façon autocrine sur les cellules métastatiques, en stimulant la production de CTGF (Connective Tissue Growth Factor) qui va encourager la formation d'ostéoclastes et la résorption osseuse ⁵⁸.

Les cellules tumorales sont capables de libérer de nombreux autres facteurs que la PTHrP dans l'environnement osseux, tels que les interleukines IL-6, IL-8, IL-11 ou le GM-CSF. IL-6 est une cytokine clé dans la régulation de l'inflammation aiguë et chronique. Dans le contexte osseux, elle favorise l'ostéolyse de nombreuses façons : elle stimule la production de RANK-L par les ostéoblastes et induit l'expression par les cellules tumorales de PTHrP, IL-8, IL-11 et Cox-2 (Cyclooxygénase-2). Enfin, en stimulant l'expression d'inhibiteur de la formation osseuse tel que Dkk-1, IL-6 déséquilibre l'homéostasie osseuse en faveur de la dégradation ⁵⁹. L'interleukine-11, quant à elle, est une cytokine multifonctionnelle, notamment impliquée dans la maturation des mégacaryocytes. Sa surexpression dans les cellules de carcinome mammaire MDA-MB-231 induit une augmentation de l'incidence des métastases osseuses. De plus, les patientes qui ont des tumeurs IL-11 positives sont plus susceptibles de développer des métastases osseuses que des patientes IL-11 négative ⁶⁰. Enfin, une étude menée au laboratoire a montré que les métastases osseuses ostéolytiques sont le siège d'un second cercle vicieux impliquant l'interaction des plaquettes sanguines avec les cellules tumorales. Cette interaction induit l'agrégation plaquettaire et la production par les plaquettes activées, d'un lipide biologique, le LPA. Il agit sur les cellules tumorales en stimulant leur prolifération et la sécrétion de facteurs

pro-ostéoclastiques. Cette partie sera développée plus loin dans la partie ATX, LPA et cancers.

2. Les inhibiteurs de la formation osseuse

En plus de stimuler l'activité des ostéoclastes, les cellules tumorales inhibent celle des ostéoblastes. Il en résulte un déséquilibre accru entre résorption et formation osseuse, conduisant ainsi à une ostéolyse majeure. L'inhibition de l'activité des ostéoblastes est liée à la production par les cellules tumorales de facteurs solubles qui inhibent principalement les voies de signalisation Wnt et BMP, qui sont impliquées dans la différenciation ostéoblastique. La protéine Dkk-1 est l'acteur majeur de cette inhibition. Elle a été initialement découverte comme étant sécrétée par les plasmocytes tumoraux chez des patients atteints de myélome multiple. Elle est également exprimée dans les cellules tumorales qui induisent des lésions ostéolytiques chez les animaux ⁶¹. Cette protéine est un antagoniste de la voie Wnt et inhibe ainsi l'ostéoblastogénèse. Les cellules tumorales produisent d'autres facteurs solubles inhibiteurs de la différenciation des ostéoblastes, comme la sclérostine (inhibiteur de la voie Wnt) ou Noggin (inhibiteur de la voie BMP) ⁶².

3. Matrice osseuse et ostéolyse

La matrice osseuse résorbée sous l'action des ostéoclastes libère en retour de nombreux facteurs, tels que des IGFs, du TGF β et du calcium ionisé, affectant la localisation et la croissance de la tumeur. Le calcium, qui est abondant dans le tissu osseux, a un effet considérable sur les cellules tumorales. Les cellules de cancer du sein et de la prostate expriment le récepteur CASR (Calcium-Sensing Receptor) ⁶³ : la fixation du calcium stimule leur prolifération, conduit à une inhibition de l'apoptose cellulaire et favorise la résorption osseuse via la surexpression de PTHrP ⁶⁴. Le TGF β , qui est sécrété par les ostéoblastes et inclus dans la matrice osseuse, est également libéré lors du processus de résorption. Via son interaction avec des récepteurs de haute affinité de type II, il agit directement sur les cellules tumorales en augmentant la production de PTHrP et de prostaglandine E2 ce qui induit en retour une stimulation de la résorption osseuse ⁶⁵. Il a été démontré que la transfection d'un récepteur T β RII dominant négatif inhibe l'expression de PTHrP par le TGF1 β *in vitro*, et freine le développement des métastases osseuses induites par les cellules tumorales MDA-MB-231 ⁶⁶. Enfin, les IGF-I et -II

stimulent *in vitro* la migration et la prolifération des cellules tumorales et le traitement d'animaux avec un anticorps anti-IGF-II bloque la croissance au site osseux des cellules de la lignée humaine de carcinome prostatique MDA-PCa-2b ³⁵. Ces résultats montrent donc l'importance du rôle joué par le tissu osseux dans la mise en place d'une métastase osseuse.

C. Les métastases ostéocondensantes

Ce type de métastases est détecté dans plus de 80 % des lésions osseuses induites dans les cancers de la prostate ³⁵, mais les mécanismes moléculaires mis en jeu dans leur formation sont encore méconnus. Les cellules de carcinome prostatique LNCap et C4-2B constituent actuellement les meilleurs modèles de métastases ostéocondensantes ⁶⁷. Elles expriment RANK-L, mais produisent également forte quantité de son antagoniste OPG. Ce dernier joue un rôle majeur *in vivo* en inhibant la formation de métastases osseuses expérimentales induites chez l'animal ⁶⁷. L'ensemble de ces résultats indique que, par le biais de RANK-L, les cellules de carcinome prostatique stimulent directement l'ostéoclastogénèse et suggère que la phase d'ostéocondensation des métastases nécessite une phase d'ostéolyse.

Par ailleurs, des taux circulants d'ET-1 (endothéline-1) chez les patients ayant un cancer de la prostate métastatique sont très élevés par rapport à des patients ayant un cancer localisé ⁶⁸. Cette protéine stimule la prolifération des ostéoblastes et inhibe l'activité des ostéoclastes. Certaines cellules de cancer du sein, comme les cellules humaines ZR-7-51, sont aussi capables de former des métastases ostéocondensantes chez les souris. Le traitement des animaux avec un antagoniste du récepteur ET-A de l'endothéline-1 bloque l'ostéocondensation induite par ces cellules ⁶⁹.

Les cellules métastatiques ostéocondensantes produisent également des facteurs de la famille Wnt qui stimulent la différenciation des ostéoblastes *in vitro* et induisent des lésions ostéoblastiques *in vivo*. Ces cellules sécrètent également l'inhibiteur soluble de Wnt, DKK-1. L'expression de DKK-1 au niveau précoce du développement métastatique favoriserait la phase préliminaire d'ostéolyse précédant la phase d'ostéocondensation. Le changement dans la nature de la métastase dépendrait alors de la chute d'expression de DKK-1 permettant l'émergence de l'activité pro-ostéoblastique des protéines de la famille Wnt ⁶⁸.

Comme les cancers du sein, les cancers de la prostate produisent eux aussi de la PTHrP qui, au niveau de l'os, stimule la résorption. Toutefois, la PTHrP produite par les cellules de carcinome prostatique est dégradée par la PSA (Prostate Specific Antigen), une molécule exprimée spécifiquement par les cellules de la prostate. Certains fragments protéolytiques de la PTHrP (PTHrP1-16, PTHrP1- 23) pourraient alors être capables d'agir directement sur le récepteur ET-A de l'endothéline-1 pour stimuler la formation osseuse ⁶⁸. Enfin, les cellules de cancer de la prostate sécrètent de nombreux facteurs de croissance qui stimulent la prolifération (VEGF, PDGF) ou la différenciation (BMP2) des ostéoblastes ⁶⁸. À l'inverse, différents facteurs produits par les ostéoblastes (TGF β , IGF-1) sont capables, par le biais de leurs récepteurs respectifs, d'agir sur les cellules tumorales et d'induire l'expression du facteur de transcription Runx-2, facteur déterminant de la différenciation ostéoblastique ⁷⁰. Runx-2 stimule la production de protéines osseuses (OCN, BSP, SPARC, biglycan) par les cellules métastatiques ⁷⁰. L'ensemble de ces travaux suggère que la métastase ostéocondensante est également le siège d'un cercle vicieux au niveau duquel les cellules tumorales stimulent l'activité des ostéoblastes qui, en retour, par l'action de facteurs de croissance stimulent le développement tumoral.

D. Traitements des métastases osseuses

Les stratégies thérapeutiques sont multiples et peuvent avoir pour visée de soulager la douleur, consolider les fractures ou cibler la tumeur.

1. Les thérapies non-médicamenteuses

La chirurgie

L'ostéosynthèse vise à rapprocher les deux parties d'un os fracturé ou à haut risque de fracture à l'aide de vis ou de plaques. En cas de compression médullaire, elle peut également être complétée d'une laminectomie qui permet d'enlever une ou plusieurs parties postérieures et latérales d'une vertèbre ⁷¹.

La radiologie interventionnelle

La cimentoplastie est indiquée en cas de lésions vertébrales et consiste à injecter dans la lésion osseuse du ciment chirurgical constitué d'une résine de polyméthylcrylate. Cette technique permet également de boucher la néo-vascularisation tumorale pour induire la

nécrose tumorale. Elle permet de soulager la douleur pendant 3 à 8 mois et peut être reproduite, même si elle perd en efficacité par la suite.

La radiofréquence

Elle a pour but de détruire la tumeur et ainsi obtenir un effet antalgique, via l'insertion d'aiguilles et d'électrodes directement dans la tumeur. Cette technique est douloureuse et son utilisation réduite : elle ne peut pas être réalisée pour des lésions proches de la moelle épinière, du cerveau, de la vessie et du côlon ⁷².

La radiothérapie

La radiothérapie, qu'elle soit externe ou isotopique, permet un soulagement des douleurs chez environ 70 à 80% des patients. Elle consiste à ioniser les molécules d'ADN des cellules tumorales : elle induit la formation de radicaux hydroxyl toxiques pour l'ADN cellulaire ⁷³. L'irradiation externe peut être réalisée une seule fois ou fractionnée et ses effets dépendent de la localisation de la lésion ciblée ⁷³. La radiothérapie isotopique utilise deux isotopes : le strontium-89 ⁷⁴ et le samarium-153-EDTMP ⁷⁵. Le premier dispose de l'autorisation de mise sur le marché ^{69 69} dans le cas de métastases osseuses des cancers de la prostate, le second est utilisé pour traiter la douleur dans tous les types de cancer.

2. Les thérapies médicamenteuses

Les thérapies médicamenteuses sont réparties en deux groupes : les médicaments spécifiques de la douleur (antalgiques, corticoïdes, anti-inflammatoires non stéroïdiens) et les médicaments qui agissent sur un acteur identifié de la physiopathologie osseuse. Ce groupe contient notamment les anti-RANK-L et les bisphosphonates.

Les bisphosphonates

Ce sont des analogues structuraux du pyrophosphate inorganique. Le premier fut synthétisé en 1865 et ce sont actuellement les principaux traitements des pathologies induisant une ostéolyse. Les bisphosphonates (BP) présentent une forte affinité pour l'os : lors de la résorption osseuse, ils sont internalisés par les ostéoclastes, ce qui provoque un arrêt de l'activité ostéoclastique et l'inhibition de la résorption osseuse ⁷⁶. On distingue désormais trois générations de BP qui diffèrent selon leur structure. La 1^{ère} génération ne contient pas de base azotée, au contraire des deux autres. Suite à leur incorporation dans les ostéoclastes, les BP de 1^{ère} génération (clodronate, étidronate)

sont convertis en analogue de l'ATP qui interfère avec la membrane des mitochondries ⁷⁶. Ces organites sont déstabilisés et initient alors le processus d'apoptose des ostéoclastes. Les BPs de 2ème et 3ème générations (alendronate, risédronate et acide zolédronique) interfèrent avec la voie du mévalonate en inhibant la farnesyl pyrophosphatase. Cette enzyme est normalement responsable de modifications post-traductionnelles de certaines protéines, parmi lesquelles les GTPase, telles que Rho ou Ras, qui sont essentielles à l'intégrité structurale des ostéoclastes et dans l'inhibition de l'apoptose. L'acide zolédronique est le plus puissant des BPs de dernières générations pour le traitement des métastases osseuses ⁷⁷. En plus de diminuer l'ostéolyse, certaines études *in vitro* ont montré qu'il induit l'apoptose des cellules cancéreuses, réduit l'angiogenèse et inhibe le développement de métastases viscérales ⁷⁷.

Toutefois, les BPs engendrent des effets secondaires. Ils provoquent notamment d'importantes ostéonécroses de la mâchoire, qui apparaissent dans environ 5% des cas pour des patients traités pour des myélomes, cancers du sein ou de la prostate ⁷⁸.

Le denosumab

Le dénosumab est un anticorps monoclonal humain dirigé contre le RANK-L et par conséquent un puissant inhibiteur de la résorption osseuse ⁷⁹. Des études ont montré qu'une seule dose de dénosumab, injectée en sous-cutané, réduit la résorption osseuse. Le denosumab est capable de diminuer la résorption osseuse même chez des patients ayant répondu faiblement à l'administration de BP. Cependant il provoque tout de même de graves effets délétères tels que des ostéonécroses de la mâchoire ⁷⁹. Toutefois, une étude clinique de phase II a révélé que le denosumab avait un potentiel anti-résorptif supérieur à celui des BPs, pour des effets secondaires similaires (toxicité rénale, ostéonécrose de la mâchoire, ...) ⁸⁰.

ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE ET AUTOTAXINE

A. L'acide lysophosphatidique (LPA)

L'acide lysophosphatidique est un lysophospholipide connu depuis plusieurs décennies comme intermédiaire métabolique de la synthèse des lipides neutres et des phospholipides membranaires ⁸¹. Depuis maintenant plusieurs années, il a toutefois été montré que le LPA se comporte aussi comme un médiateur biologique puissant capable

de réguler diverses fonctions cellulaires (motilité, croissance, survie) consécutives à l'activation de récepteurs spécifiques de surface couplés aux protéines G ⁸². Différentes enzymes et protéines impliquées dans la synthèse, la dégradation et le transport du LPA, contrôlent sa biodisponibilité. Mais la contribution de chacune de ces voies est encore controversée. Même si les plaquettes sont actuellement considérées comme étant la principale source de LPA dans le sérum, on le retrouve également présent dans le plasma dans des situations physiopathologiques ainsi que dans les liquides extracellulaires non plasmatiques, ce qui suggère l'implication d'autres types cellulaires dans sa production.

1. Structure, transport et localisation

L'acide lysophosphatidique ou acyl-sn-glycerol-3-phosphate est un phospholipide polaire composé 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). Les acides gras composant le LPA chez les mammifères sont majoritairement à longues chaînes saturées (C18 :0, C16 :0) ou insaturées (C18 :1, C20 :4) ⁸³ (**Figure 9**).

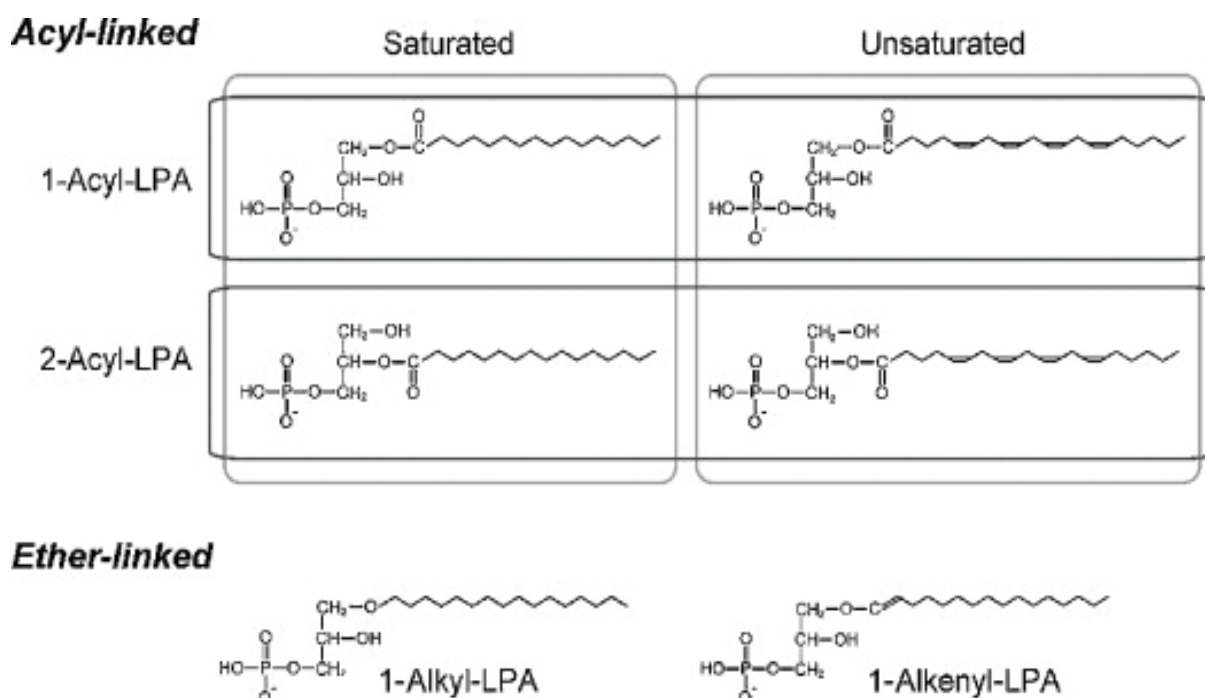


Figure 9. Structures chimiques des différentes formes du LPA. Issu de Ishii et al., 2009

Le LPA est présent dans le sérum et le plasma, non pas sous forme libre, mais associé à des protéines de transport telles que l'albumine ou la gelsoline ^{84,85}. On en détecte

également de forte concentration dans les ascites prélevées chez des patientes atteintes de cancer ovarien ⁸⁶. On retrouve sa trace dans le liquide folliculaire associé à des lipoprotéines de faible densité, ainsi que dans le milieu interstitiel du tissu adipeux sous-cutané humain avec comme origine cellulaire les adipocytes ⁸⁷. Enfin, de petites quantités de LPA sont présentes dans l'humeur aqueuse et le liquide lacrymal après blessure de la cornée, mais aussi dans la salive et le cerveau ⁸⁸.

2. Métabolisme

La présence de LPA dans les milieux biologiques extracellulaires ne peut résulter que d'un transfert actif ou d'une synthèse dans le milieu extracellulaire. Il existe des protéines de liaison du LPA, mais aucun transporteur transmembranaire n'a encore été mis en évidence ⁸⁹.

Synthèse

On distingue deux voies de synthèse majeures (**Figure 10**). Le premier mécanisme implique l'hydrolyse des acides phosphatidiques (PA) par les phospholipases A1 et A2 (PLA1 et PLA2) ⁹⁰. Les PAs sont présents en grande quantité dans les microvésicules membranaires. L'implication de phospholipases dans la production extracellulaire de LPA nécessite que les PAs soient situés sur le feuillet externe de la membrane ou dans le milieu extracellulaire. Dans des conditions normales, les PAs sont majoritairement sur le feuillet interne de la membrane, mais en conditions inflammatoires, les membranes de certaines cellules (plaquettes, érythrocytes) peuvent subir de profonds remaniements (flip-flop ou production de micro vésicules), rendant les PAs accessibles ⁹⁰. Il existe également des phospholipases sécrétées, comme PLA2s, dont l'action est dépendante d'une fixation à la membrane plasmique ⁹¹.

La seconde voie, plus récemment identifiée, paraît prédominante dans beaucoup de contextes paracrines en particulier dans l'adipocyte ou dans les tumeurs ⁹². Il met en jeu un type particulier de PLD (phospholipases D), l'autotaxine (ATX) ⁹⁰. Elle est à l'origine de la production du LPA dans la circulation sanguine. Le sérum et le plasma dépourvu d'ATX ne présente en effet aucune trace de LPA ⁹³. Son principal substrat est la lysophosphatidylcholine (LPC), notamment libérée par les plaquettes activées ⁹⁴. On retrouve également le LPC, surtout sous une forme liée à l'albumine, dans divers liquides biologiques, ascites, ou liquide folliculaire ⁹⁵. A titre d'exemple, dans le plasma, le LPC est

produit à partir de la PC (Phosphatidylcholine) contenue dans les lipoprotéines sous l'action combinée de la LCAT (Lécithine-Cholestérol-Acyl-Transférase) et de la PLA2 ⁹⁵. Enfin, il existe deux autres voies de synthèse du LPA : l'acylation du glycérol 3-posphate par la GPAT (Glycerolphosphate Acyltransferase) et la phosphorylation du monoacylglycérol (MAG) par les MAG-kinase (Monoacylglycerol Kinase). Cependant, le LPA produit à partir de ces voies ne semble servir que de précurseurs pour la synthèse des glycérolipides, plutôt que comme une source de molécules de signalisation extracellulaire ⁹⁶.

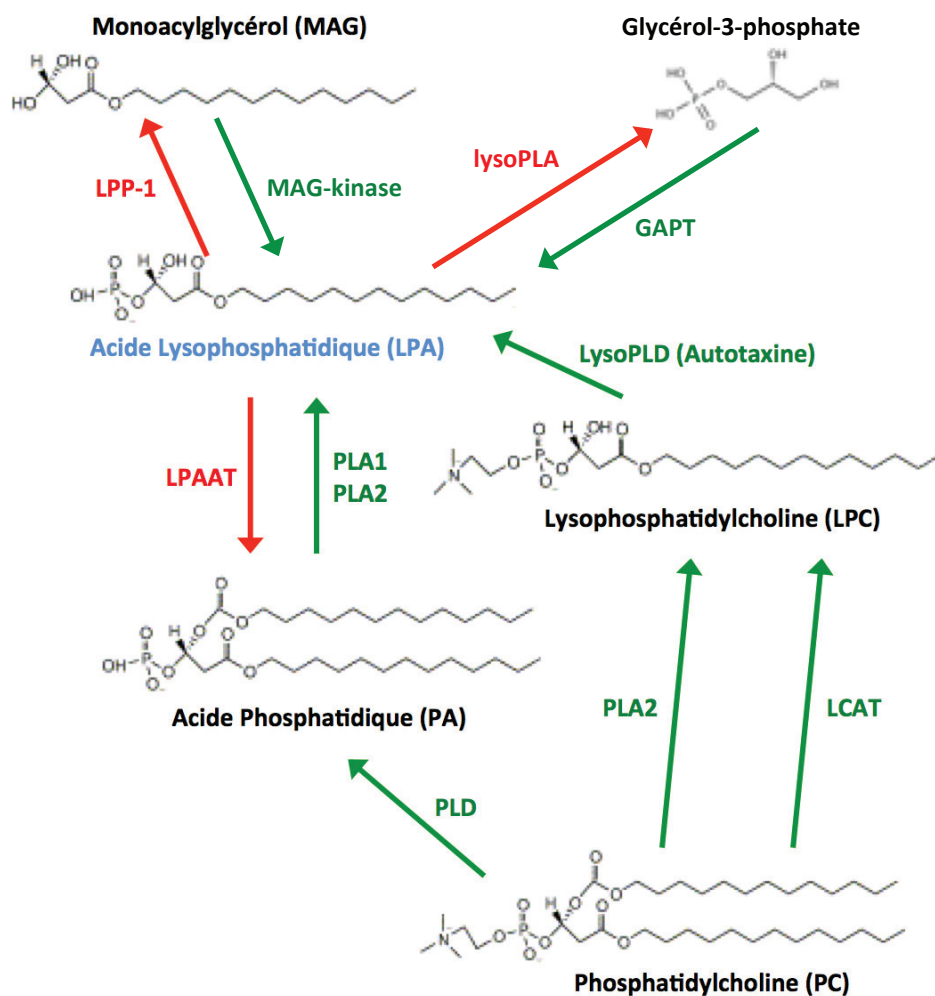


Figure 10. Synthèse et dégradation de l'acide lysophosphatidique. Le LPA est principalement produit à partir du PA sous l'action des PLA1 et PLA2, soit à partir de LPC sous l'action de la LysoPLD (ATX).

Dégradation

Parallèlement à sa synthèse, le LPA subit un important catabolisme. Le LPA peut rapidement être converti en PA sous l'action de la LPA-acyltransférase (LPAAT) que l'on retrouve essentiellement au niveau des membranes plasmiques et des microsomes ⁹⁷. Le

LPA peut également être converti en MAG par de nombreuses PAPs (Prostatic acid phosphatase) ⁹⁸. Parmi elles, on retrouve notamment la LPP1 (Lipid, Phosphate Phosphohydrolase-1) capable d'hydrolyser le LPA extracellulaire ^{99,100}. Enfin le LPA peut être hydrolysé et converti en glycerol-3-phosphate par des lysophospholipases (lysoPLA) spécifiques du LPA ¹⁰¹ (**Figure 10**).

3. Récepteurs et signalisation

Structure et distribution

La diversité d'action du LPA peut s'expliquer par le fait que ce phospholipide est capable de se lier à un grand nombre de récepteurs membranaires : on dénombre à ce jour 6 récepteurs spécifiques du LPA (**Tableau 1**). Ce sont des récepteurs à 7 traversées transmembranaires, dont la partie cytoplasmique interagit avec des protéines G hétérotrimériques ($\alpha\beta\gamma$). Ils sont divisés en deux grandes familles : les récepteurs Edg (Endothelial differentiation gene) et les récepteurs purinergiques.

Les récepteurs de la famille Edg se distinguent par leur sélectivité respective pour le LPA et la sphingosine-1-phosphate. On distingue trois sous-types de récepteurs au LPA : LPA₁ (Edg2), LPA₂ (Edg4) et LPA₃ (Edg7) ¹⁰². Les compositions en acides aminés des récepteurs LPA₂ et LPA₃ sont homologues à 46% et 54% avec celle du récepteur LPA₁ ¹⁰². Chez l'Homme, le récepteur LPA₁ est exprimé à un niveau basal dans la plupart des tissus, avec une très forte expression au niveau du système nerveux ¹⁰³. L'expression des récepteurs LPA₂ et LPA₃ est bien plus faible. On retrouve toutefois LPA₂ au niveau des leucocytes, de la rate et des organes reproducteurs masculins, et LPA₃ au niveau du cœur, du pancréas, de la prostate et du foie ¹⁰³.

La deuxième famille de récepteurs du LPA est apparentée à la famille des récepteurs purinergiques, capables d'être stimulés par des nucléotides comme l'ADP ou l'ATP. Ce groupe comprend trois membres LPA₄ (p2y9/GPR23), LPA₅ (GPR92/GPR93) et LPA₆ (p2y5) qui partagent entre eux 35% d'homologie dans leur composition en acides aminés ¹⁰⁴. Chez l'Homme, LPA₄ est majoritairement exprimé au niveau du cœur et du foie ¹⁰⁴. Chez la souris, le gène *Lpar4* est impliqué dans le développement et on le retrouve aussi au niveau du cœur, des ovaires, de la peau et dans la moelle osseuse ¹⁰⁵. LPA₅ est fortement exprimé dans la rate, mais une légère expression basale au niveau du cœur, du colon, du foie et du placenta est détectée. Le récepteur LPA₆ est le dernier à avoir été classé parmi les récepteurs du LPA ¹⁰⁴. Il présente une très forte homologie de

séquence avec les récepteurs P2Y. Il est le seul à l'heure actuelle à être impliqué dans une pathologie humaine, l'hypertrichose simple, une maladie liée à la surcroissance capillaire ¹⁰³. Enfin, lorsqu'un type cellulaire exprime différents sous-types de récepteurs, leur contribution relative dans la sensibilité au LPA n'est pas encore bien connue.

Transduction du signal

Les récepteurs du LPA activent un grand nombre de voies de transduction du signal en fonction de la nature des protéines G auxquelles ils sont couplés (**Tableau 1**).

RECEPTEURS	PROTEINES G	REPONSES CELLULAIRES
LPA₁/Edg2	G _{i/o} , G _{q/11} , G _{12/13}	Rétraction des neurites ¹⁰⁶ , Inhibition AC ¹⁰² , Activation SRE ¹⁰⁶ , Augmentation du [Ca ²⁺] _i , Production IP, Activation des MAPK ¹⁰² , Formation des fibres de stress, Incorporation du BrdU, ¹⁰⁶ Inhibition de l'apoptose, Libération d'acide arachidonique ¹⁰²
LPA₂/Edg4	G _{i/o} , G _{q/11} , G _{12/13}	Rétraction des neurites ¹⁰² , Inhibition AC ¹⁰⁷ , Activation SRE, Augmentation du [Ca ²⁺] _i ¹⁰⁷ , Production IP ¹⁰² , Activation des MAPK ¹⁰² , Formation des fibres de stress, Incorporation du BrdU, Inhibition de l'apoptose, Libération d'acide arachidonique
LPA₃/Edg7	G _{i/o} , G _{q/11}	Inhibition AC ¹⁰² , Augmentation du [Ca ²⁺] _i , Production IP, Activation des MAPK, Libération d'acide arachidonique ¹⁰²
LPA₄/p2y9/GPR23	G _{q/11} , G _{12/13} , G _s , (G _i)	Stimulation AC, Augmentation du [Ca ²⁺] _i ¹⁰⁸ , Activation zif268, Rétraction des neurites, Agrégation cellulaire ¹⁰⁸ , Formation des fibres de stress ¹⁰⁹
LPA₅/GPR92/GPR93	G _{q/11} , G _{12/13}	Stimulation AC, Augmentation du [Ca ²⁺] _i , Production IP, Rétraction des neurites ¹¹⁰
LPA₆/p2y5	G _{12/13} , (G _s), (G _i)	Activation CRE, Rétraction des neurites, Bourgeonnement des membranes ¹¹¹

Tableau 1. Caractéristiques des récepteurs du LPA. AC, adénylate cyclase ; BrdU, bromodeoxyuridine ; CRE, cAMP response element ; IP, inositol phosphate ; MAPK, mitogen-activated protein kinase ; SRE, serum response element.

Comme on peut le constater dans la **figure 11**, selon le récepteur engagé, une ou plusieurs sous unités Gα (G_{12/13}, G_{q/11}, G_{i/o} et G_s) va/vont interagir avec le domaine intracellulaire du récepteur et permettre l'activation de multiples voies de signalisation ¹¹². L'activation de ces voies permet notamment de mobiliser le calcium intracellulaire, d'inhiber ou d'activer l'adénylate-cyclase, de stimuler la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) par des voie sensibles (G_{i/o}) ou insensibles (G_{q/11} et G_{12/13}) à la pertussis toxin ou d'augmenter la concentration intracellulaire en AMP cyclique ¹⁰³. Selon le récepteur mobilisé par le LPA, les réponses cellulaires sont donc variées. Elles sont référencées dans le **tableau 1**, ce qui nous permet de se rendre compte de la complexité de l'activité biologique du LPA.

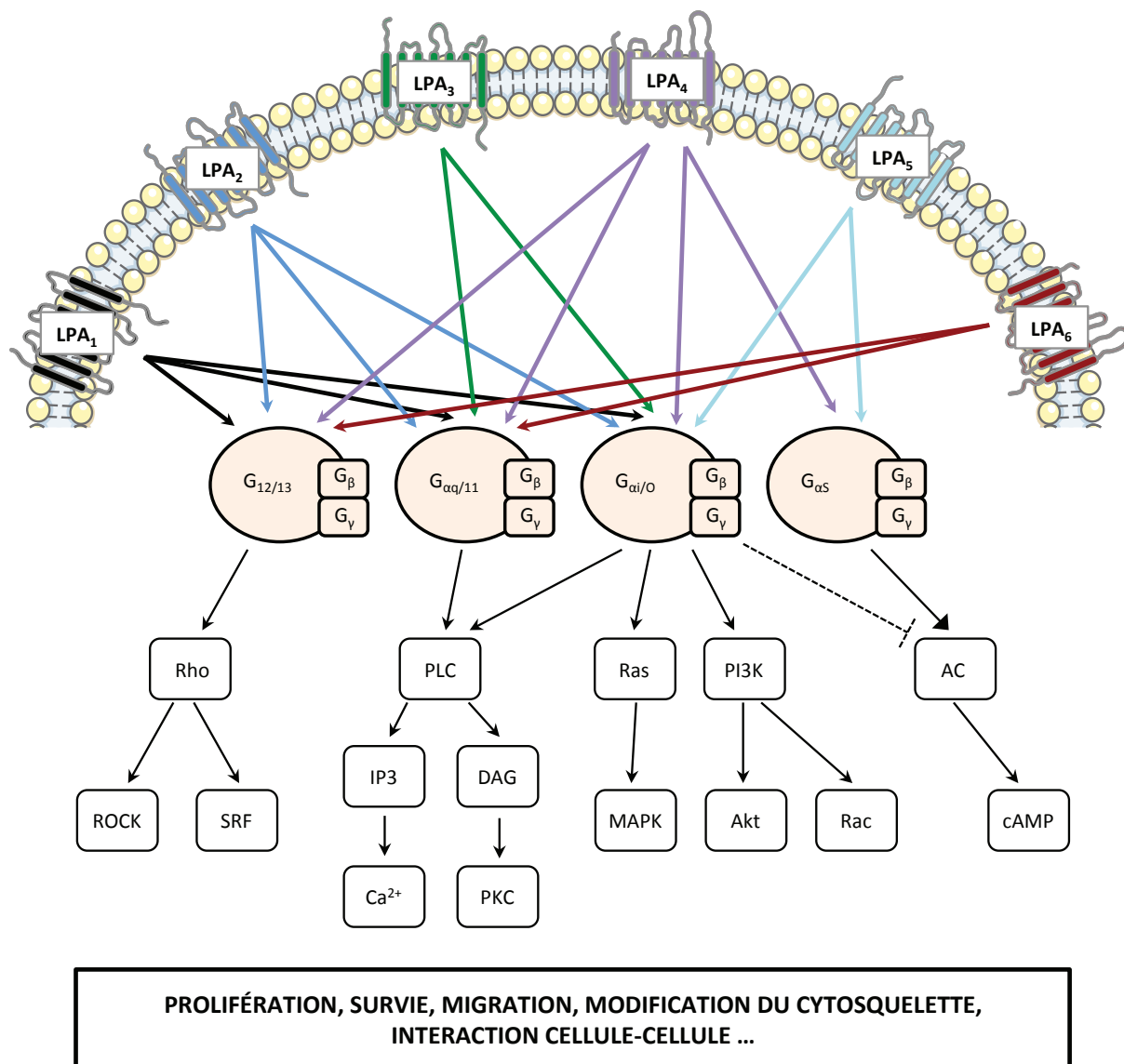


Figure 11. Voies signalisation majeures en réponse au LPA. Interaction des récepteurs du LPA avec les différentes familles de protéines G et les effets en aval sur les seconds messagers. AC, adénylate-cyclase; cAMP, cyclic adénosine monophosphate; DAG, diacylglycérol; MAPK, mitogen-activated protein kinase; IP3, inositol 1,4,5- triphosphate; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protéine kinase C; PLC, phospholipase C; Rock, Rho- associated kinase; SRF, serum response factor

En plus de son rôle de médiateur extracellulaire, le LPA pourrait agir comme messager intracellulaire en activant le récepteur nucléaire PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma) et induire ainsi la transcription de gènes impliqués dans le remodelage vasculaire ¹¹³. Il a également été montré que le récepteur LPA₁ peut être transloqué dans le noyau où il pourrait réguler la transcription de protéines impliquées dans l'inflammation comme COX12 ¹¹⁴. Ces résultats sont cependant très controversés et n'ont toujours pas été confirmés à ce jour.

Enfin, la structure du LPA semble influencer sa liaison avec ses récepteurs. Les espèces biologiquement actives contiennent un acide gras à chaîne longue et les formes

insaturées sont plus actives que les saturées. Pour exemple, LPA₁ possède une affinité préférentielle pour la forme 18:2, LPA₂ et LPA₃ interagissent plus fortement avec la forme 18:3, tandis que PPAR γ ne répond qu'aux formes insaturées. Cette affinité spécifique des récepteurs pour certaines formes de LPA laisse penser qu'il existe un niveau de complexité supplémentaire dans la signalisation induite par le LPA ¹¹⁵.

B. L'autotaxine (ATX/NPP-2)

L'autotaxine est une glycoprotéine identifiée comme facteur de mobilité autocrine de 125 kDa dans le milieu conditionné des cellules de mélanome A2058 humain ¹¹⁶. L'équipe d'Umezo-Gotto a montré que, via son activité lysophospholipase D (lysoPLD), l'autotaxine hydrolyse la LPC permettant la formation du LPA ⁹². De fortes quantités en ARNm d'ATX sont détectées dans le cerveau, les poumons, l'utérus et au niveau du placenta ¹¹⁷. Elle est également présente au niveau des cellules endothéliales des ganglions lymphatiques, où elle contrôle l'entrée des lymphocytes ¹¹⁸. L'autotaxine est abondamment exprimée dans divers fluides comme le plasma, le sérum, l'urine, les fluides séminaux et les fluides cérébrospinaux. Elle est aujourd'hui décrite comme étant la source majeure de LPA dans la circulation sanguine. Sa demi-vie dans la circulation sanguine est cependant très courte, l'ATX étant rapidement métabolisée dans le foie ¹¹⁹.

1. La famille des NPPs

L'autotaxine appartient à la famille des NPPs (Nucléotides Pyrophosphatases Phosphodiesterases) qui, en règle générale, hydrolysent les ponts pyrophosphates et phosphodiester des nucléotides. Sept ecto-enzymes sont membres de cette famille. Ils agissent préférentiellement en convertissant l'ATP directement en AMP mais certains NPPs peuvent réaliser la déphosphorylation en passant par l'intermédiaire ADP d'une manière "NTPDase-like" ¹²⁰. L'ATX se distingue des membres de sa famille car elle est la seule à posséder une activité lysoPLD. Les NPPs ont des structures similaires, avec un large domaine catalytique. Les membres mammaliens NPP1 et 3 sont des glycoprotéines constituées d'un domaine transmembranaire et sont orientées vers l'extérieur de la cellule. NPP-4 à NPP-7 sont orientés vers l'intérieur de la cellule. NPP-4 et 5 possèdent un domaine transmembranaire, tandis que NPP-6 et 7 sont attachés à la membrane via une ancre GPI ¹²⁰. L'autotaxine, elle, est une protéine sécrétée. Elle possède un domaine

hydrophobique en N-terminal, qui fonctionne comme un peptide signal. Elle est ainsi synthétisée sous forme de pré-enzyme avant d'être clivée puis sécrétée ¹²¹ (**Figure 12**).



Figure 12. La famille des NPPs. Les sept Nucléotides Pyrophosphatase Phosphodiesterases possèdent un domaine catalytique nucléase structuellement similaire (NUC). NPP1 et NPP3 sont dirigés vers l'extérieur de la cellule, alors que NPP4 à 7 sont dirigés vers l'intérieur. NPP2 (ATX) est la seule protéine de la famille à être sécrétée. Le trait rouge représente le site catalytique. DT, domaine transmembranaire ; PS, peptide signal ; SMB, somatomédine-B ; PDE, phosphodiesterase

2. Structure et fonctions

L'autotaxine est constituée de deux domaines somatomédine-B (SMB) en N-terminal, un domaine catalytique central phosphodiesterase (PDE) (d'environ 400 acides aminés) et un domaine nucléase catalytique (NUC) inactif en C-terminal ¹²². Deux études cristallographiques ont récemment été réalisées, révélant une organisation complexe : le domaine central PDE interagit à la fois avec les domaines SMB d'un côté et avec le domaine NUC de l'autre. La rigidité structurelle du domaine catalytique est renforcée par la présence de N-glycosylation (N542) et d'un pont disulfure entre le domaine PDE et NUC, mais est également due au fait que la fin du domaine PDE forme une sorte de « lasso » qui s'enroule autour du domaine NUC et qui pénètre le pli ainsi formé de l'autre côté ¹²². Le domaine NUC contient plusieurs domaines « EF Hand » capables de fixer les ions Ca^{2+} , dont les fonctions sont encore inconnues ¹²² (**Figure 13**). Enfin, l'autotaxine

est fortement N-glycosylée, notamment en N410 et en N524. Cette dernière est un résidu très conservé du domaine catalytique et semble essentielle à l'activité de l'ATX ¹²³.

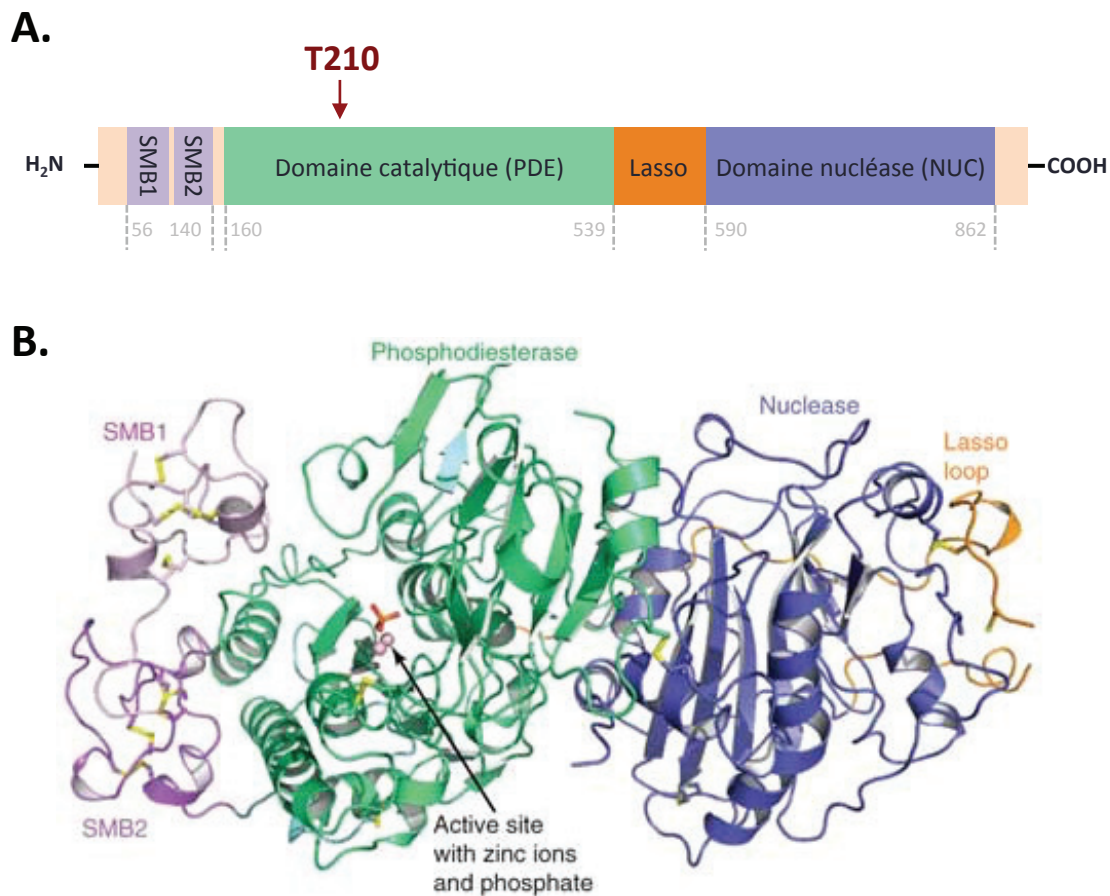


Figure 13. Structure de l'autotaxine humaine. A: Vue schématique des différents domaines de l'ATX B: Représentation de la structure quaternaire de l'autotaxine. Les domaines somatomédine-B (SMB) sont colorés en violet, le domaine phosphodiesterase (PDE) en vert, le domaine nucléase (NUC) en bleu et le lasso en orange. Ce dernier interagit avec le reste de la protéine via 18 liaisons hydrogènes, et 8 ponts salins et un pont disulfure situés entre le résidu 566 et 666. Schéma issu de Hausmann et al., 2011. T210, Threonine en position 210

La poche hydrophobique, siège de l'activité lysoPLD

NPP-1 et l'ATX ont un domaine catalytique structuralement similaire. Leur activité se localise au niveau d'une Thréonine nucléophile, en position 210 pour l'ATX humaine et en position 256 pour NPP-1. Elle est située à proximité de 2 ions Zn^{2+} et entourée de deux chaînes latérales constituées de résidus His (Histidine) et Asp (Acide aspartique) bien conservés. Ces acides aminés s'organisent pour former un sillon peu profond, capable de fixer des substrats nucléotidiques pour NPP-1 ou des groupements glycérol de substrats lysophospholipidiques pour l'ATX ¹²⁴. Contrairement à NPP-1 ou aux autres phospholipases, le domaine catalytique de l'ATX est également constitué d'une poche hydrophobique, située en dessous du sillon. D'un volume de 800Å³ et d'une profondeur

de 15Å, cette poche montre une forte plasticité structurelle permettant l'accueil de différents phospholipides, comme le LPC circulant ou différentes formes de LPA ¹²⁴. Cette structure est donc facilement accessible, ce qui contraste avec l'organisation habituelle des autres phospholipases. Leur site actif est en effet fermé par un « couvercle » ou une boucle inhibitrice, qui est ouverte uniquement lors de l'interaction avec les membranes plasmiques, comme c'est le cas pour PLA2s ⁹¹.

Le « tunnel ouvert » : distribution du LPA ?

Le sillon et le domaine catalytique sont séparés par une sorte de « tunnel ouvert », majoritairement hydrophobique même si une de ses parties est hydrophile ^{122,124}. On pense actuellement que ce tunnel permet la sortie et le relargage du LPA à proximité de ses récepteurs GPCRs. Sa proximité avec le site catalytique laisse penser qu'il pourrait aussi être impliqué dans l'activité catalytique de l'autotaxine et/ou dans l'attraction du LPC ¹²⁵.

Les domaines de fixation aux autres protéines : une production locale de LPA ?

Les domaines SMB sont impliqués dans les interactions protéine-protéine : on les retrouve par exemple au niveau de la fibronectine, où ils permettent la fixation de PAI (Plasminogen Activator Inhibitor-1) ¹²⁶. Les deux domaines SMB de l'autotaxine sont en contact physique direct avec le domaine catalytique. SMB1 et SMB2 sont structurellement identiques mais assurent différentes fonctions intra- et intermoléculaires : SMB1 est impliqué dans la formation du tunnel ouvert, tandis que du fait de sa position, SMB2 permet la fixation de partenaires protéiques. Il a en effet été montré que l'ATX se fixe à l'intégrine α IIb β 3 plaquettaire via la partie N-terminal de SMB2. Ce domaine contient un motif RGD, normalement impliqué dans la fixation des intégrines de la famille β 3. Des études de mutagénèses dirigées, dont celles réalisées au cours de cette thèse, ont cependant montré que la fixation de l'ATX est indépendante de ce motif, qui semble ici être dépourvu de la flexibilité nécessaire à l'interaction ¹²³. Il semblerait que l'interaction dépende de deux acides aminés, d'un Acide glutamique en position 109 et d'une Histidine en position 119 ¹²⁷. L'ATX se lie également aux lymphocytes activés via l'intégrine α 4 β 1 : cette interaction favorise leur entrée dans les ganglions lymphatiques. Le site de fixation aux intégrines de la famille β 1 est encore inconnu, même si on note la présence, au sein du domaine PDE, d'un motif Leucine-Acide aspartique-Valine (LDV) spécifique de la fixation à cette famille d'intégrines ¹¹⁸.

L'ensemble de ces données nous permet de penser que l'ATX est maintenue à proximité des membranes cellulaires, favorisant la production locale du LPA qui pourrait agir de façon autocrine ou paracrine sur ses récepteurs. Il est cependant peu probable que les récepteurs du LPA se localisent toujours au voisinage des intégrines, en particulier au niveau de la membrane basolatérale de cellules adhérentes polarisées. Lorsque les cellules adhèrent à la MEC, les intégrines sont en effet mobilisées au sein de complexes d'adhésion focale et ne sont donc pas disponibles ¹²⁸. Il est bien établi que l'ATX peut être purifiée par chromatographie d'affinité via l'utilisation de colonne d'héparine. De plus, des études de résonance plasmonique de surface ont montré que l'ATX se fixe à l'héparine, suggérant qu'elle pourrait potentiellement interagir avec des heparanes sulfates protéoglycanes (HSPGs) en surface cellulaire ou dans la matrice ¹²⁵ et ainsi contribuer à la production locale du LPA.

3. Gène et isoformes

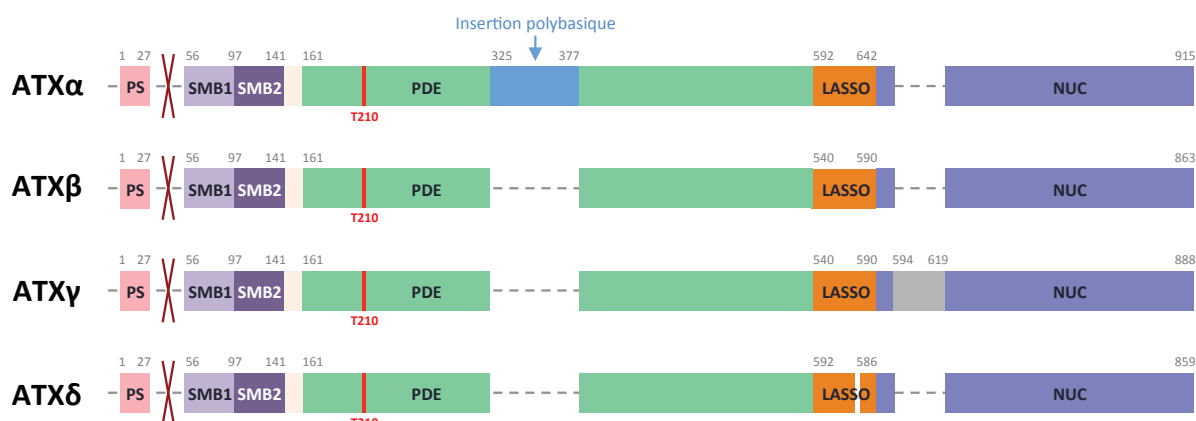


Figure 14. Les différents isoformes de l'autotaxine humaine. Les variants d'épissage α , β et γ diffèrent par la présence ou l'absence de séquences codées par les exons 12 et 21. L'ATX δ est dépourvue de 12pb en 3' de l'exon 19, qui encodent pour 4 acides aminés au niveau du « lasso ». L'insertion polybasique (bleu) contient un site de clivage par les furines. PS, peptide signal ; SMB, somatomédine-B ; PDE, phosphodiesterase ; NUC, domaine nucléase.

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 quatre isoformes différentes, aussi bien dans leur structure que dans leur localisation d'expression (**Figure 14**). Les formes α , β et γ diffèrent par la présence ou l'absence de séquences codées par les exons 12 et 21 ¹²⁹. L'isoforme δ a été identifiée plus récemment. Sa structure est similaire à la forme β , mais elle est dépourvue de 4 acides aminés au niveau du « lasso » qui connecte les domaines PDE et NUC ¹³⁰. L'ATX β est la forme canonique majoritaire, identifiée comme étant la lysoPLD plasmatique. Elle est à l'origine de la production de LPA dans la circulation

sanguine ¹³¹, même si l'ATX δ peut également y contribuer. L'isoforme long, l'ATX α , est le « facteur de mobilité autocrine » isolé à partir des cellules de mélanomes. Cette forme est peu exprimée et est caractérisée par l'insertion d'une séquence polybasique (codée par l'exon 12) au sein du domaine catalytique. Cette insertion est riche en résidus Arginine et Lysine qui sont impliqués dans la fixation de l'ATX à l'héparine et aux HSPGs. Cette insertion contient également un site de clivage par les furines, mais sa fonction est encore inconnue ¹³². L'ATX γ , spécifique du cerveau, contient une insertion de 25 acides aminés (codées par l'exon 21) à proximité du domaine NUC. Actuellement, on ne sait pas si ces isoformes sont spécifiquement associées à des conditions physiologiques et/ou pathologiques particulières.

4. Régulation de l'activité de l'autotaxine

L'analyse cinétique *in vitro* de l'hydrolyse de substrats lysophospholipidiques fluorescents, tels que le FS-3, montre que l'ATX a une activité catalytique relativement lente. Alors que la fixation du FS-3 à l'ATX est rapide ($k_1 \geq 500 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), son hydrolyse est lente: sa constante catalytique k_{cat} , qui représente le nombre de moles de produits formées par seconde et par mole d'enzyme est seulement de 0.024s^{-1} ¹³³. Par ailleurs, il a été montré que l'ATX fixe le LPA bien plus fortement que son propre substrat, le LPC ^{134,135}. Ces données laissent penser que le relargage du LPA s'effectue lentement. On pourrait ainsi imaginer que l'ATX contrôle la biodisponibilité du LPA, en le transportant et en le distribuant à ses récepteurs. Mais ces résultats soulèvent également la question du contrôle du relargage et/ou du contrôle de l'activité lysoPLD de l'ATX.

Un des mécanismes de régulation pourrait être la fixation de l'ATX aux intégrines : elle pourrait orienter les domaines SMB et ainsi contrôler la vitesse de catalyse et/ou la distribution du LPA. Les résultats obtenus par l'équipe de S. Smith semble confirmer cette théorie : une augmentation de la production de LPA médiée par l'ATX est observée lorsque les cellules CHO surexpriment l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ¹²⁷.

L'acide lysophosphatidique pourrait lui même intervenir dans le contrôle de l'activité catalytique de l'ATX. De fortes concentrations en LPA ou en S1P (Sphingosine-1-Phosphate) inhibent en effet *in vitro* l'activité lysoPLD ¹³⁵. La situation *in vivo* reste cependant vague. Dans la circulation sanguine par exemple, même si le niveau de LPC est élevé (100-200 μM) et l'ATX constitutivement active, le LPA nouvellement formé est rapidement dégradé par les phosphatases membranaires et le LPA reste à un niveau

basal. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre réellement le rôle du LPA dans ce phénomène de rétrocontrôle ¹²⁵.

C. Rôle de l'axe ATX/LPA

1. Conditions physiologiques

a) Développement embryonnaire

Comme référencé dans le **tableau 3**, les souris invalidées pour le gène *Enpp2* ne sont pas viables et meurent au stade embryonnaire E9,5 ^{93,136}. Cette létalité est due à des défauts de formation des vaisseaux sanguins au niveau du sac embryonnaire et de l'embryon lui-même, et à une malformation du tube neural ^{93,136}. Le phénotype des souris *Enpp2*^{-/-} est similaire aux phénotypes des souris déficientes pour le gène codant la protéine Gα13. Les défauts des souris déficientes pour *Enpp2* semblent ainsi liés à une perte de la migration dépendante de Gα13-RhoA, activée par les récepteurs du LPA ^{136,137}. Les phénotypes des souris invalidées pour les différents récepteurs du LPA sont eux moins sévères : les invalidations des récepteurs LPA₁ à LPA₃, LPA₆ ou le triple KO *lpar1/lpar2/lpar3* ne sont pas létales et ne présentent pas de malformations vasculaires. Néanmoins, la viabilité des souris déficientes *lpar4*^{-/-} est réduite et ces animaux présentent des hémorragies et/ou des œdèmes dans de nombreux organes à différents stades embryonnaires ¹³⁸. Ainsi, même si on peut envisager l'existence d'autres récepteurs au LPA qui expliqueraient le phénotype des souris KO pour l'ATX, une partie de celui-ci pourrait être attribué au récepteur LPA₄.

L'axe ATX/LPA intervient également dans la neurogénèse : les défauts de fermeture du tube neural chez les animaux *Enpp2*^{-/-} sont attribués à une carence locale en ATX. De manière intéressante, l'injection exogène de LPA permet la fermeture du tube neural ¹³⁹. Des études chez le poisson zèbre ont également montré une implication de l'ATX dans la différenciation des oligodendrocytes lors du développement du cerveau postérieur ¹⁴⁰. Enfin, les souris hétérozygotes *Enpp2*^{+/-} sont viables, mais l'expression dans le sérum en ATX et en LPA est diminuée de moitié par rapport aux conditions physiologiques normales. Ces animaux sont cependant hyper-sensibles à la vasoconstriction induite par l'hypoxie et développe une hypertension pulmonaire ¹⁴¹.

b) Migration lymphocytaire

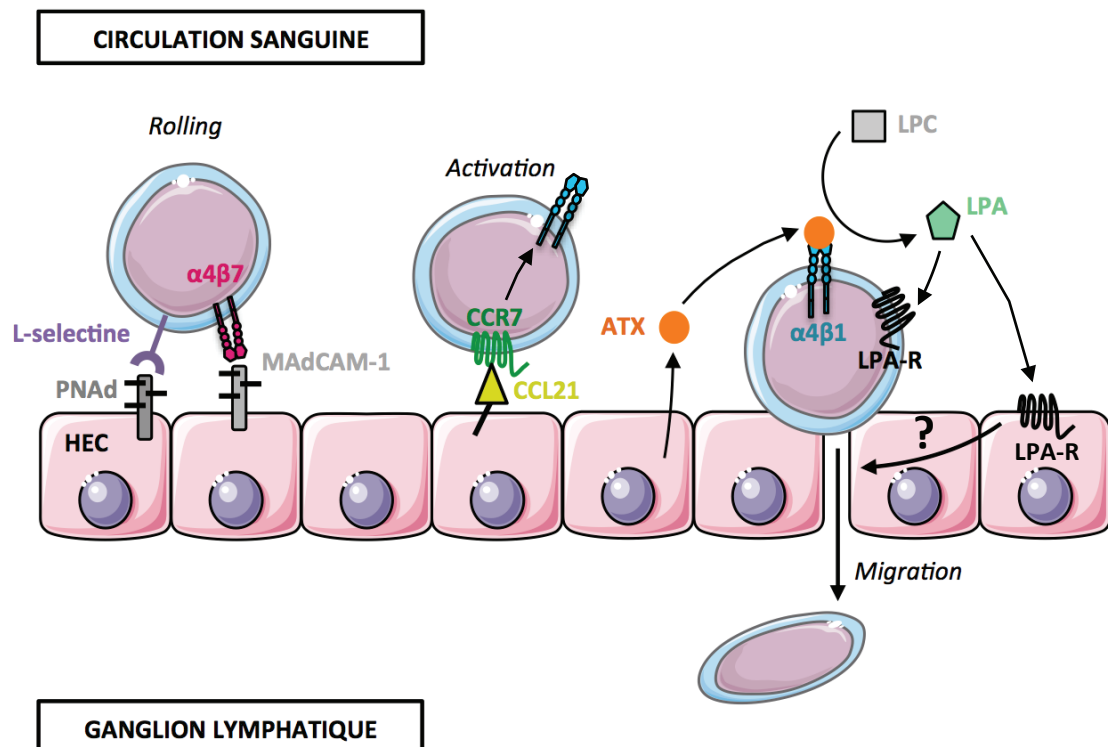


Figure 15. Migration lymphocytaire médiée par l'autotaxine. La capture des lymphocytes est initiée par la L-selectine et l'intégrine $\alpha 4 \beta 7$, qui fixe respectivement les adressines PNA^d et MAdCAM-1. La fixation de la cytokine CCL21 à son récepteur CCR7 permet l'activation des intégrines et notamment de $\alpha 4 \beta 1$. L'autotaxine (ATX) sécrétée par les cellules endothéliales (HEC) se fixe à l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ lymphocytaire et produit de l'acide lysophosphatidique (LPA) qui en retour facilite l'entrée des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques. On pense actuellement que le LPA peut aussi affecter la perméabilité membranaire des cellules endothéliales (HECs) et favoriser la pénétration des lymphocytes. LPC, Lysophosphatidylcholine

L'équipe de H. Kanda a récemment montré que l'ATX a un rôle important dans le trafic des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques (**Figure 15**)¹¹⁸. Les veinules à endothélium épais (HEVs) des ganglions lymphatiques ou des plaques de Peyer sont spécialisées dans la capture des lymphocytes circulants dans le sang. Les cellules endothéliales (HECs) des HEVs libèrent de grandes quantités d'ATX qui sont captées, selon un mécanisme dépendant des intégrines $\alpha 4 \beta 1$, par les lymphocytes activés. Le LPA produit agit alors localement sur les lymphocytes T, induit la sécrétion de cytokines par les cellules T et favorise leur migration à travers les HECs. Il a également été montré *in vitro*, que le LPA induit un changement morphologique des lymphocytes et favorise leur adhésion aux HECs¹⁴². Par ailleurs, l'injection aux souris d'ATX inactivée pour son activité lysoPLD atténue le homing des lymphocytes T d'une manière dominante négative¹¹⁸. On sait la part importante que jouent les cellules du système immunitaire

dans la progression tumorale. L'action de l'ATX sur ces cellules pourrait être prépondérante dans ce phénomène.

c) Rôle émergent dans le remodelage osseux

Au cours de la dernière décennie, une série d'études a montré que l'acide lysophosphatidique est l'un des régulateurs paracrines qui influence le remodelage osseux.

LPA et ostéoblastes

On observe une expression différentielle des récepteurs du LPA au niveau des cellules osseuses. LPA₁ est exprimé de façon constante par les cellules des lignées ostéoblastiques d'origine murine ou humaine, quel que soit le stade de différenciation ¹⁴³, ainsi qu'au niveau de lignées cellulaires ostéoblastiques telles que UMR 106-1, G292, MC3T3-E1 ou des cellules d'ostéosarcomes MG-63 ¹⁴³. Ces lignées cellulaires expriment plus faiblement LPA₂ et LPA₃ et on ne retrouve l'expression de LPA₄ qu'au niveau des ostéoblastes matures ¹⁴³. Les cellules de la lignée ostéoblastique sont donc sensibles au LPA. Les travaux de Panupinthu ont par ailleurs montré qu'elles sont capables de stimuler la production de LPA via l'activation du récepteur aux nucléotides P2X7 ¹⁴⁴.

Les réponses des ostéoblastes aux LPA sont multiples et semblent dépendre essentiellement de LPA₁ : il stimule en effet la prolifération des ostéoblastes primaires ¹⁴⁵, exerce une action chimio-attractante, et agit en synergie avec la vitamine D pour favoriser leur maturation ¹⁴⁶. Lorsque l'on traite *in vitro* des lignées ostéoblastiques avec de la pertussis toxin, un inhibiteur de la voie de signalisation dépendante de la protéine Gi, on observe une diminution de la prolifération et un blocage de la différenciation en ostéoblastes matures ¹⁴⁵. De même, l'utilisation de Ki16425, antagoniste des récepteurs LPA₁ et LPA₃, conduit à une diminution de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) et à une diminution de la prolifération et de la maturation des ostéoblastes ¹⁴⁶. Ces résultats suggèrent que ces mécanismes sont dépendants du récepteur LPA₁, via une activation de la protéine Gi. L'analyse phénotypique des souris invalidées pour le récepteur LPA₁ confirme son rôle dans l'ostéogénèse : on observe des défauts d'ossification du sternum et des côtes, et une perte de masse osseuse ¹⁴⁷. Les analyses tomographiques et histologiques montrent également une ostéoporose trabéculaire et corticale ¹⁴⁷. Enfin, les cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de ces souris ont une vitesse de prolifération diminuée et une faculté moindre à minéraliser ¹⁴⁷.

LPA₁ n'est toutefois pas le seul récepteur à agir sur les ostéoblastes. LPA₄, seulement exprimé par les ostéoblastes matures, contrôle en effet la fin de différenciation ostéoblastique ¹⁴³. Les souris *lpar4*^{-/-} présentent par ailleurs une augmentation du volume osseux et du nombre de travées osseuses ¹⁴³. Les récepteurs LPA₁ et LPA₄ semblent donc avoir une action coordonnée dans le temps, LPA₁ étant impliqué dans la prolifération et la maturation des ostéoblastes, tandis que LPA₄ permet l'arrêt de l'ostéoblastogénèse. Toutefois, les mécanismes de contrôle de l'expression de ces récepteurs, permettant d'obtenir une masse osseuse optimale, restent inconnus.

LPA et ostéoclastes

Une étude de notre laboratoire récemment publiée, montre que, mis à part LPA₆, le récepteur LPA₁ est majoritairement exprimé dans les ostéoclastes. Son expression augmente au fur et à mesure de la différenciation ostéoclastique pour atteindre une valeur plateau ¹⁴⁸. Les récepteurs LPA₂, LPA₄ et LPA₅ sont plus faiblement exprimés mais possèdent un profil d'expression similaire à LPA₁ au cours de l'ostéoclastogénèse.

Les cellules de moelles osseuses extraites des souris *lpar1*^{-/-} ont une capacité réduite à se différencier en ostéoclastes matures, contrairement aux cellules extraites de souris sauvages ou de souris *lpar2*^{-/-} et *lpar3*^{-/-}. Il a par ailleurs été montré que le traitement des ostéoclastes matures avec du LPA conduit à une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, des changements morphologiques par remaniement des fibres d'actines et une activation du facteur de survie NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T-cell) ¹⁴⁹. L'utilisation de l'antagoniste Ki16425 inhibe l'expression de NFATc1, diminue l'expression des marqueurs ostéoclastiques et empêche la fusion mais pas la prolifération des précurseurs ostéoclastiques ¹⁴⁸. La taille de la ceinture de podosomes et de la chambre de résorption sont également fortement réduites au niveau des ostéoclastes matures traités avec le Ki16425 ou des ostéoclastes matures *lpar1*^{-/-} ¹⁴⁸. L'inhibition de LPA₁ affecte également la mobilité des précurseurs ostéoclastiques et finalement la résorption osseuse. L'ensemble de ces résultats démontrent que LPA₁ est essentiel pour l'activité des ostéoclastes *in vitro* et *in vivo*. De façon intéressante, l'expression en LPA₁ augmente au niveau des ostéoclastes chez des souris ayant subi une ovariectomie, mais le traitement systémique avec du Debio0719, un stéréo-isomère du Ki16425, prévient la perte osseuse induite par l'ovariectomie ¹⁴⁸. LPA₁ apparaît par

conséquent comme une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement de pathologies associées à une perte osseuse excessive.

GENES	LETALITE	PHENOTYPES ANIMAUX DEFICIENTS
<i>Lpar1</i>	Semi-létal	Problème lors de l'allaitement Taux de croissance post-natal diminué et taille réduite Dysmorphie cranio-faciale Apoptose accrue des cellules nerveuses de Schwann du nerf sciatique ¹⁵⁰ Défauts de neurotransmetteurs (Schizophrénie) ¹⁵¹ Inhibition de la douleur neuropathique (Inhibition de la démyélinisation) Inhibition de la différenciation adipocytaire ¹⁵² Croissance du cortex cérébral ¹⁵³ Inhibition de la fibrose rénale ¹⁵⁴ Inhibition de la fibrose pulmonaire ¹⁵⁵
<i>Lpar2</i>	Viable	Sensibilité accrue aux radiations de la crypte intestinale Atténuation de la tumorigénèse dans le colon ¹⁵⁶
<i>Lpar3</i>	Viable	Retard dans le développement embryonnaire Implantation embryonnaire retardée Altération de l'espacement dans les embryons Hypertrophie du placenta ¹⁵⁷
<i>Lpar4</i>	Semi-létal	Migration accrue des fibroblastes lors d'une stimulation par le LPA Dilatation des vaisseaux sanguins et lymphatiques Oedème sévère Epanchement péricardique, Hémorragie ¹⁵⁸ Augmentation du volume osseux ¹⁴³
<i>Lpar5</i>	N/C	N/C
<i>Lpar6/p2y5</i>	N/C	Hypotrichose ¹⁵⁹
<i>Enpp2</i>	Létal	Défaut de vascularisation ⁹³ Défaut dans la fermeture du tube neural ¹³⁹

Tableau 2. Phénotypes des souris invalidées pour les récepteurs du LPA ou pour l'ATX. N/C, non communiqué

2. Conditions pathologiques

L'axe ATX/LPA est impliqué dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques de la fibrose à la colite, dans les troubles neuronaux et dans le cancer. Une liste non exhaustive est présentée dans cette partie.

a) Asthme et fibrose pulmonaire

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique, caractérisée par un bronchospasme et une obstruction réversible des voies respiratoires. Les interleukines IL-4, IL-5 et IL-13, dérivées des cellules Th2, jouent un rôle crucial dans la réponse inflammatoire asthmatique ¹⁶⁰. Le LPA augmente la chimiotaxie de ces cellules, favorise l'expression de IL-13 et augmente l'activité transcriptionnelle de son promoteur ¹⁶¹. Plus récemment,

une augmentation des taux d'ATX a été détectée dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF) de patients asthmatiques, après provocation allergénique. Les souris transgéniques pour l'ATX présentent également un phénotype asthmatique plus sévère, associé à une augmentation significative de IL-4 et IL-5 ¹⁶². L'utilisation de l'inhibiteur de l'ATX GWJ-A-23 permet toutefois une atténuation de ce phénotype ¹⁶².

L'axe ATX/LPA est également impliqué dans la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Les souris *lpar1*^{-/-} sont notamment protégées vis-à-vis de cette maladie (**tableau 3**). On retrouve également une augmentation en LPA dans les BALF de patients atteints de FPI et dans les modèles murins, et le traitement de ces souris avec l'inhibiteur de LPA₁ AM966 inhibe cette fibrose ¹⁶³. La délétion génétique conditionnelle de l'ATX dans les cellules épithéliales et les macrophages des bronchioles diminue la gravité de la fibrose et l'inhibiteur GWJ-A-23 atténue la progression de la maladie dans les modèles murins de FPI ¹⁶⁴.

b) Obésité

L'accumulation excessive de tissu adipeux est un facteur clé conduisant au diabète de type II. Le rapport des cellules précurseurs d'adipocytes en adipocytes différenciés est étroitement contrôlée chez les personnes ayant un poids normal. La prolifération et la différenciation des pré-adipocytes sont modulées par de nombreux facteurs et plusieurs études suggèrent aujourd'hui une implication de l'axe ATX/LPA. Le récepteur LPA₁ est le sous-type le plus abondant dans le tissu adipeux. Le LPA stimule la motilité et la prolifération des pré-adipocytes ⁸⁷ mais inhibe leur différenciation en adipocytes (adipogenèse) ¹⁵². Cet effet anti-adipogénique se caractérise par une inhibition de l'accumulation de triglycérides et une diminution d'expression de gènes adipocytaires et notamment du facteur de transcription PPAR γ 2 ¹⁵². Les préadipocytes isolés du tissu adipeux de souris invalidées pour le récepteur LPA₁ possèdent une plus grande propension à se différencier en adipocytes que ceux issus de souris sauvages ¹⁵². Les souris *lpar1*^{-/-} présentent une augmentation significative du pourcentage de masse grasseuse comparativement aux souris sauvages ¹⁵². L'ensemble de ces observations suggère que le LPA (via son effet anti-adipogénique dépendant de LPA₁) produit dans le milieu extracellulaire des adipocytes, exerce un effet inhibiteur local sur le recrutement de nouveaux adipocytes au sein du tissu adipeux.

Par ailleurs il a été montré que l'ATX est sécrétée par le tissu adipeux et participe à la production extracellulaire en LPA ¹⁶⁵. La délétion génétique conditionnelle de l'ATX spécifique du tissu adipeux, conduit à une réduction de 38% des niveaux du LPA plasmatique et à une amélioration des niveaux de tolérance au glucose ¹⁶⁵. Lorsque ces animaux sont alimentés avec un régime riche en graisse, on observe une augmentation de la masse graisseuse et de la taille des adipocytes par rapport aux souris témoins. Ces résultats montrent que l'ATX est un régulateur négatif de l'expansion de la masse graisseuse en réponse à un régime riche en graisse ¹⁶⁵.

L'obésité ne se caractérise pas seulement par une hypertrophie et une hyperplasie des adipocytes ou par une infiltration de cellules inflammatoires. Elle s'accompagne également d'une fibrose du tissu adipeux, c'est à dire d'une production excessive de MEC et notamment de collagène. Le facteur de transcription HIF-1 α , associé à une augmentation de l'inflammation locale, initie cette fibrose ¹⁶⁶. Il a récemment été montré que le LPA est impliqué dans ce processus : il favorise la production de collagène par les adipocytes et conduit à une augmentation de l'expression de VEGF, un des gènes cibles de HIF-1 α . Les traitements *in vitro* et *in vivo* du tissu adipeux par le Ki16425, antagoniste des récepteurs LPA₁ et LPA₃, ou par le composé YC-1, inhibiteur de HIF-1 α , permettent de bloquer l'activité pro-fibrotique du LPA ¹⁶⁷. LPA₁ étant majoritairement exprimé par le tissu adipeux, ces résultats permettent de penser que l'action pro-fibrotique du LPA est dépendante de ce récepteur.

Dans l'ensemble, ces observations indiquent que l'ATX, par l'intermédiaire du LPA et de son récepteur LPA₁, intervient dans la régulation du tissu adipeux et la captation du glucose. L'axe ATX/LPA représente ainsi une cible pharmacologique d'intérêt dans le traitement des atteintes métaboliques associées à l'obésité.

c) Athérosclérose et thrombose

L'athérosclérose est une maladie due à l'accumulation de lipides dans les parois des vaisseaux artériels. L'athérome débute par un simple dépôt de graisse « la strie lipidique » au niveau de l'endothélium vasculaire. Avec le temps, cette strie grossit, se charge en lipides, en calcium et en cellules sanguines pour former une plaque d'athérome. L'inflammation joue un rôle actif à tous les stades de cette pathologie ¹⁶⁸. Le processus inflammatoire est initié dans les parois des cellules endothéliales en réponse aux lipoprotéines de basse densité (LDL) retenues par l'endothélium vasculaire. Les LDL

ont tendance à s'oxyder en particules. Ces dernières stimulent l'expression de cytokines et de molécules d'adhésion au niveau des cellules endothéliales, qui permettent le recrutement et l'accumulation de monocytes ¹⁶⁸. L'oxydation des LDL conduit notamment à la production locale de LPC, qui est ensuite converti en LPA par l'ATX ¹⁶⁹. Le LPA agit alors sur ses récepteurs exprimés par les cellules endothéliales et provoque la libération de CXCL1 (C-X-C motif Ligand 1) qui favorise le recrutement des monocytes (**Figure 16**). Le blocage des récepteurs LPA₁ et LPA₃ avec le Ki16425, freine la sécrétion de CXCL1 et empêche le recrutement des monocytes athérogènes ¹⁶⁹. Par ailleurs, il a été montré que le LPA présent dans les plaques d'athérosclérose déclenche une activation plaquettaire rapide grâce à la stimulation de récepteurs LPA₁ et LPA₃ ¹⁷⁰ et favorise la formation de l'athérome.

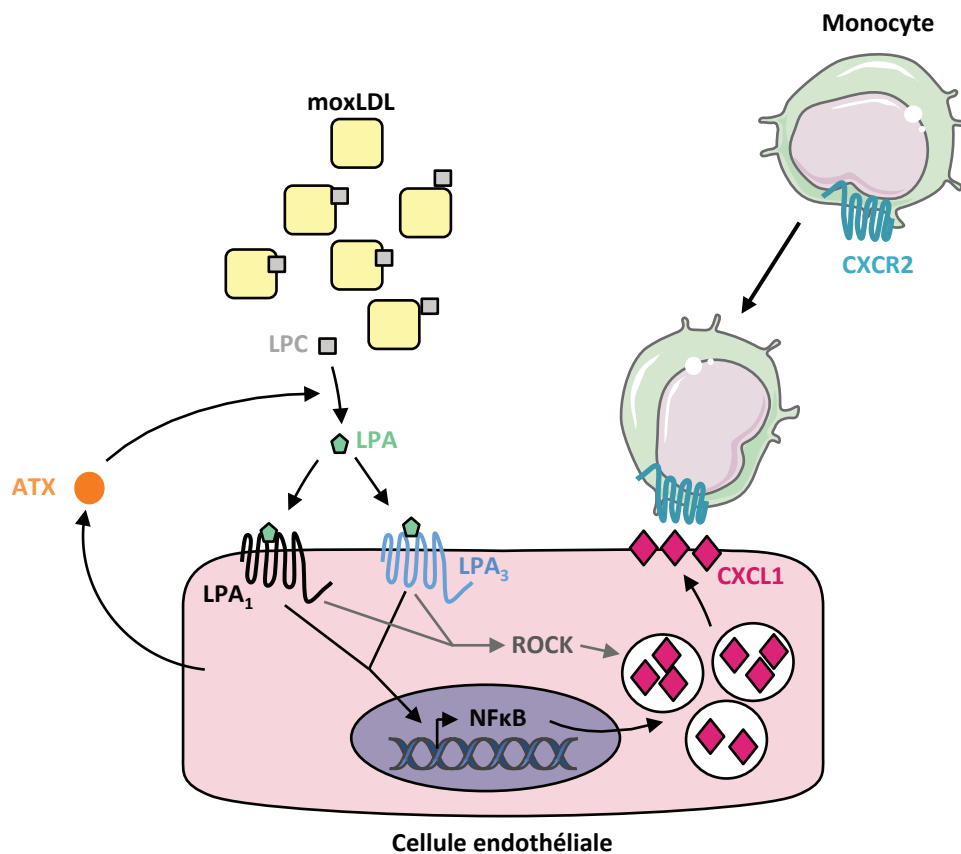


Figure 16. Rôle de l'axe ATX/LPA dans la formation d'athérome. L'oxydation des lipoprotéines de basse densité (moxLDL) permet la libération de lysophosphatidylcholine (LPC). L'autotaxine (ATX), sécrétée par les cellules endothéliales, hydrolyse le LPC en acide lysophosphatidique (LPA) qui agit en retour sur les récepteurs LPA₁ et LPA₃ des cellules endothéliales. L'activation de ces récepteurs stimule l'expression du facteur de transcription NFκB et de la voie de signalisation ROCK, qui induit la production et la sécrétion du chimioattractant CXCL1. Les monocytes qui expriment le récepteur CXCR2 sont attirés et vont participer à la croissance de l'athérome.

ATX et LPA sont également impliqués dans d'autres maladies cardiovasculaires (infarctus du myocarde, thrombose veineuse, ...) associées à une activation excessive

des plaquettes sanguines ¹⁷¹. Les plaquettes humaines activées relarguent du LPA : celui-ci initie une boucle de rétroaction positive qui conduit à une sur-activation et à l'agrégation des plaquettes sanguines, phénomène indispensable à la formation du clou plaquettaire ¹⁷¹. Les plaquettes activées sont également capables de fixer l'ATX selon un mécanisme dépendant de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ¹²⁷ et ainsi favoriser une production locale de LPA. Mais de manière inattendue, l'addition de LPA atténue l'agrégation des plaquettes murines, empêchant ainsi la thrombose ¹⁷². La surexpression de l'ATX dans des animaux transgéniques, ou l'administration intravasculaire de LPA prolonge en effet le temps de saignement et inhibe la thrombose chez les souris ¹⁷². Les souris hétérozygotes *Enpp2*^{+/-}, où le niveau de LPA plasmatique est diminué de moitié, sont également plus sensibles à la thrombose ¹²⁷. Par conséquent, l'axe ATX/LPA pourrait jouer un double rôle en tant que modulateur espèce-spécifique, de la fonction plaquettaire, de la thrombose et de l'hémostase. La différence d'action du LPA sur les plaquettes murines et humaines peut être attribuée à une expression différentielle des récepteurs du LPA, ayant pour résultat l'activation de différentes voies de signalisations.

d) Troubles hépatiques et rénaux

L'hépatite C est une maladie infectieuse transmissible par le sang et due au virus HCV qui s'attaque au foie. L'infection se caractérise par une inflammation du foie (hépatite) souvent asymptomatique, mais peut évoluer vers une hépatite chronique et plus tard vers une cirrhose (fibrose cicatricielle) et un cancer du foie. Les niveaux sériques en ATX et LPA sont augmentés chez les patients atteints d'hépatite C chronique et une corrélation a été établie entre les niveaux d'ATX/LPA et le grade histologique de la fibrose du foie ¹⁷³. On retrouve cette augmentation dans les modèles de rat pour la fibrose chronique du foie induite par le tétrachlorométhane, dans les fibroses aiguës induites par la diméthylnitrosamine ou dans 70% des rats ayant subi une hépatectomie ¹⁷⁴. Les niveaux d'ATX sériques sont actuellement considérés comme étant parmi les trois meilleurs biomarqueurs dans le diagnostic de la cirrhose du foie ¹⁷³. Ikeda et Yatomi ont proposé un mécanisme pour expliquer ce phénomène. En situation physiologique, l'ATX est captée par les sinusoides hépatiques pour être dégradée dans les cellules endothéliales sinusoidales. En cas de fibrose, les cellules étoilées du foie produisent de la MEC en excès, bloquant la fenestration des cellules endothéliales et donc la captation de l'ATX ¹⁷⁵.

Le prurit cholestatique est la sensation de démangeaisons dues aux maladies hépatiques. Ni l'histamine, ni la tryptase, ni la substance P, mais seule une augmentation de l'expression en ATX est corrélée avec l'intensité des démangeaisons des patients atteints de la gale cholestatique ¹⁷⁶. Chez la souris, le prurit peut être induit par une injection intradermique de LPA entraînant une augmentation transitoire de la concentration en Ca^{2+} dans les cellules neuronales ¹⁷⁶. Ce phénomène est inversé par l'administration de Ki16425, laissant penser une implication des récepteurs LPA_1 et/ou LPA_3 ¹⁷⁶.

Enfin, l'acide lysophosphatidique est impliqué dans la fibrose rénale, caractérisée par une production excessive de tissus conjonctifs fibreux dans le parenchyme rénal. Les effets du LPA ont été étudiés dans des modèles d'obstruction urétérale unilatérale (UUO), principaux modèles animaux de fibrose rénale. L'UUO conduit à une augmentation de l'expression en LPA_1 associée à une diminution de l'expression en LPA_3 ¹⁵⁴. On retrouve également une augmentation significative des niveaux en LPA dans les milieux conditionnés d'explants de reins ¹⁵⁴. Par ailleurs, le traitement au LPA de lignées cellulaires fibroblastiques rénales induit l'expression du facteur de croissance CTGF (Connective Tissue Growth Factor), acteur majeur de la fibrose ¹⁵⁴. Sans surprise, les souris *lpar1*^{-/-} sont beaucoup moins sensibles à cette pathologie, tout comme les animaux traités au Ki16425 ¹⁵⁴. L'effet pro-fibrotique du récepteur LPA_1 n'est pas limité au rein et au tissu adipeux, mais semble pouvoir être généralisé à tous les organes ¹⁷⁷. Il constitue par conséquent une cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement de la fibrose.

D. ATX, LPA et cancers

L'axe ATX/LPA est impliqué dans de nombreux cancers, du fait de son rôle majeur dans les processus de migration, d'invasion, de prolifération, de survie et dans l'angiogenèse¹¹².

1. Le LPA dans la physiopathologie du cancer

Rôle dans la progression tumorale

Les premières données montrant une implication du LPA dans le cancer remontent à 1991 et correspondent à la détection par spectroscopie par résonance magnétique (RMN) du LPA dans des biopsies de tumeurs du côlon, alors qu'il est absent des biopsies de côlons sains ¹⁷⁸. Plusieurs études ont ensuite indiqué un rôle du LPA dans l'initiation

et la progression des cancers ovariens, de la prostate, du sein, des mélanomes, des cancers intestinaux et thyroïdiens ¹⁷⁹. Une augmentation du taux sérique en LPA a également été retrouvée chez des patients atteints de myélomes multiples ¹⁸⁰. La relation entre progression tumorale et LPA est particulièrement bien représentée par le cancer ovarien : les liquides d'ascites des patientes contiennent de très fortes concentrations en LPA (1 à 80 μ M), dix fois supérieures à celles de patientes saines ¹⁸¹. Le LPA n'étant pas produit à des niveaux élevés par les cellules épithéliales ovariennes, la majeure partie de la production pourrait provenir des cellules tumorales elles-mêmes. Certaines lignées cellulaires de cancer ovarien sont notamment capables de produire du LPA *in vitro* ¹⁸². Elles n'expriment toutefois pas de fort taux en ARNm d'ATX, alors que l'on détecte une forte concentration en ATX dans les tumeurs ¹⁸². De manière surprenante, le LPA lui-même est capable d'agir de façon autocrine sur certaines cellules de cancers ovariens en augmentant sa production ¹⁸². L'ensemble de ces données suggère que de faibles quantités en ATX et LPA sont suffisantes pour induire une forte production en LPA dans les ascites et favoriser ainsi le développement tumoral. Les récepteurs LPA₂ et LPA₃ surexprimés dans la plupart des cellules de cancers ovariens contribuent à la réponse des cellules au LPA ^{181,183,184}.

Implications cliniques

L'utilisation de la mesure des taux circulants en LPA comme marqueur de la progression tumorale a été proposée. Des études préliminaires de purification par chromatographie gazeuse ont montré une augmentation de la quantité de LPA sérique dans 90% des cancers ovariens et autres cancers gynécologiques ¹⁸⁵. On retrouve une augmentation des niveaux sériques dans les cas de myélomes multiples, de cancers de l'endomètre, de cancers cervicaux, mais également chez les patients sous dialyse rénale ¹⁷⁹. Les niveaux de LPA ne sont cependant pas augmentés dans les cas de cancers du sein ou de leucémie. Toutefois, des études plus récentes de spectrométrie de masse, n'ont pas permis de détecter ces niveaux accrus en LPA dans le plasma de patients atteints de cancer de l'ovaire ¹⁷⁹. En l'état actuel, les altérations de niveaux plasmatiques en LPA comme marqueur diagnostique ou pronostique ne sont toujours pas exploitables en clinique.

2. L'implication des récepteurs du LPA

a) Expression aberrante des récepteurs du LPA

De nombreuses études ont montré que la signalisation dépendante des récepteurs au LPA participe à l'acquisition du potentiel tumoral. Leur distribution varie selon le type de cancer et engendre différentes réponses cellulaires. Les cancers humains ovariens, gastriques et du côlon surexpriment les ARNm codant pour LPA₁ et LPA₂ par rapport aux tissus sains ^{183,186,187}. Les cancers thyroïdiens papillaires et folliculaires présentent une expression aberrante du récepteur LPA₂ vis-à-vis des tissus thyroïdiens sains ¹⁸⁸, au même titre que les cancers du sein où son expression est augmentée de manière significative par rapport à celle détectée dans les glandes mammaires ¹⁸⁹. Il a également été reporté que les cancers colorectaux présentent une diminution de l'expression en LPA₁, une augmentation de LPA₂, alors que les niveaux de LPA₃ ne varient pas vis-à-vis du tissu sain ¹⁹⁰. Dans des modèles de rat de cancers du poumon et du foie induits par des carcinogènes, il a également été constaté une expression différentielle des récepteurs du LPA et une surexpression aberrante de certains vis-à-vis d'autres ¹⁹¹. Peu d'études relatent l'implication des récepteurs LPA₄ à LPA₆ dans les cancers. Il a toutefois été montré que LPA₅ a un rôle dans la chimiorépulsion, associée à une augmentation de l'expression en AMPc intracellulaire, des cellules murines de mélanomes B16F10 ¹⁹². Le récepteur LPA₆ est, quant à lui, associé aux tumeurs héréditaires de la vessie. Le gène *P2RY5* est situé à l'intérieur du gène suppresseur de tumeur de rétinoblastome RB1 (intron 17), dans une orientation inverse ^{193,194}. Dans le cancer de la vessie, la perte d'un segment de RB1, contenant le gène *P2RY5*, est associée à une expansion néoplasique ^{193,194}. Par ailleurs, des substitutions nucléotidiques dans le gène *P2RY5* représentent un facteur de prédisposition au cancer, en particulier lorsqu'elles sont combinées avec le tabagisme. Au contraire, l'introduction de *P2RY5* dans les cancers de la vessie où il est absent à l'origine, conduit à un arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose des cellules tumorales ^{193,194}. De plus, les familles à risques héréditaires de cancer du sein, du côlon, du poumon, de la prostate et de l'utérus sont porteuses d'une mutation germinale dans le gène *P2RY5* ¹⁹⁴. Par conséquent, ce gène peut être considéré comme un gène suppresseur de tumeur.

b) Réponses cellulaires

Prolifération et migration cellulaire

Les récepteurs du LPA sont impliqués dans la prolifération et la migration des cellules tumorales. Les différents récepteurs n'activent pas les mêmes voies de signalisation et n'engendrent donc pas les mêmes réponses cellulaires. Le traitement au LPA des cellules de cancer du côlon surexprimant LPA₁ stimule la prolifération, la migration et l'adhésion, alors que le LPA n'affecte ni la migration, ni l'adhésion, mais seulement la prolifération des cellules surexprimant LPA₂ ¹⁸⁷. De même, le LPA stimule seulement la migration des cellules tumorales gastriques surexprimant LPA₁, mais pas celles surexprimant LPA₂ ¹⁹⁰. Notre laboratoire a également montré que la surexpression de LPA₁ favorise la migration mais pas la prolifération des cellules de cancer du sein ¹⁹⁵. Ces résultats suggèrent que LPA₁ pourrait réguler de façon positive la migration des cellules tumorales. Il a toutefois été reporté que la signalisation dépendante de LPA₃ est aussi impliquée dans la migration et l'invasion de lignées cancéreuses hépatiques. Par ailleurs, l'invalidation de l'expression des récepteurs LPA₂ et LPA₃ par une technique d'ARN interférence (siRNA) inhibe l'invasion et la migration des cellules cancéreuses ovariennes ¹⁹⁶. Les réponses cellulaires au LPA sont donc différentes selon le récepteur engagé, mais elles changent également en fonction de la lignée cellulaire. Cette hétérogénéité de réponse pourrait être attribuée à l'expression et à l'activation simultanée de plusieurs récepteurs à la surface des cellules.

Invasion

Les récepteurs du LPA sont impliqués dans la production de MMPs. Ces enzymes protéolytiques jouent un rôle essentiel dans l'invasion tumorale et la formation de métastases. Le LPA stimule notamment l'invasion et la production de MMP-9 par les cellules de cancer ovarien, mécanisme dépendant de la signalisation Ras/Rho/ROCK ¹⁹⁷. La signalisation via LPA₁ favorise également l'invasion et la libération de MMP-9 des carcinomes hépatocellulaires humains ¹⁹⁸. Enfin, MMP-7 joue un rôle de régulateur de protéolyse important à la surface des cellules. Dans les cellules de cancers ovariens, le LPA, via le récepteur LPA₂, est capable de réguler sa sécrétion et son activation ¹⁹⁹.

Angiogenèse

Le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néo vascularisation) à partir de vaisseaux préexistants est une étape essentielle à l'échappement tumorale et à la formation de métastases. L'angiogenèse est régulée par de nombreux facteurs dont le plus important est le VEGF, facteur surexprimé par de nombreuses cellules tumorales ²⁰⁰. Le LPA stimule l'expression de VEGF dans les cellules de cancers ovariens selon un mécanisme impliquant le récepteur LPA₂ ²⁰¹. Les biopsies de tumeurs ovariennes montrent également une corrélation entre la production de VEGF et l'expression des récepteurs LPA₂ et LPA₃ ²⁰². Ces résultats ont récemment été confirmés par l'invalidation génétique de ces récepteurs, où l'expression en VEGF est réduite ¹⁹⁶. Les carcinomes rénaux sont eux principalement caractérisés par une angiogenèse aberrante : l'expression préférentielle du récepteur LPA₁ favorise la production des facteurs VEGF, b-FGF et IL-8 impliqués dans la néo vascularisation ²⁰³. LPA₁ et LPA₂ sont également associés à la production de facteurs pro-angiogéniques dans les cellules de cancer du côlon ¹⁹⁰. D'autres études ont mis en évidence le rôle de LPA₁ et LPA₃ dans la motilité des cellules endothéliales, phénomène nécessaire à la formation de néo-vaisseaux ²⁰⁴. Enfin, l'analyse d'animaux transgéniques a confirmé le rôle des récepteurs au LPA dans l'angiogenèse : les souris transgéniques MMTV-LPA₁, MMTV-LPA₂ et MMTV-LPA₃ développent spontanément des tumeurs mammaires particulièrement invasives. L'analyse phénotypique des glandes mammaires révèle une augmentation de la ramification latérale des vaisseaux sanguins par rapport aux souris sauvages et l'expression des différents transgènes est associée à l'augmentation de la production en VEGF ²⁰⁵.

c) Multi-résistances aux traitements

La résistance aux traitements anti-cancéreux se développe via différents mécanismes tels que la diminution de l'absorption du médicament, une augmentation de l'efflux de la drogue, l'activation de systèmes de détoxification, l'échappement à l'apoptose ²⁰⁶ ... Contrairement aux cellules cancéreuses ovariennes n'exprimant pas LPA₁, les cellules surexprimant spécifiquement ce récepteur développent une résistance à la cisplatine (CDDP), une drogue favorisant la mort par apoptose des cellules tumorales ¹⁸³. De manière surprenante, l'expression exogène de LPA₁ n'altère pas sa sensibilité à la CDDP ¹⁸³. Dans les carcinomes hépatiques et les cancers du sein l'expression exogène de LPA₃

favorise la survie des cellules vis-à-vis des traitements à la CDDP et à la doxorubicine ²⁰⁷. Cette résistance est associée à l'induction des gènes *Mdr1a* et *Mdr1b* impliqués dans l'expression de transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) ²⁰⁷, protéines transmembranaires dont le rôle est le transport unidirectionnel à travers la membrane plasmique de diverses substances. Enfin, les cellules de carcinome rénal expriment fortement le récepteur LPA₁ et sont actuellement traitées par le sunitib, un inhibiteur des tyrosines kinases. La co-administration de cette drogue avec du Ki16425 prévient et retarde l'apparition de la résistance au sunitib ²⁰³, renforçant le rôle du récepteur LPA₁ dans le développement de résistances.

3. Les différents rôles de l'autotaxine

Expression et régulation

On retrouve une forte expression en ATX dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses, dont les neuroblastomes ²⁰⁸, les glioblastomes ²⁰⁹, les carcinomes hépatiques ²¹⁰, rénaux ²¹¹ et thyroïdiens ²¹², les cancers du sein ²¹³ et du poumon non-à petites cellules ²¹⁴, les lymphomes à cellules B ²¹⁵ et les mélanomes ¹¹⁶. Dans certaines lignées de glioblastomes, l'ATX est présente aussi bien dans la tumeur primaire que dans les cellules invasives ²⁰⁹, alors que dans les cancers du poumon, une expression plus forte est détectée dans les tumeurs les plus faiblement différenciées ²¹⁴. Ces données permettent de penser que l'ATX favorise la manifestation des caractéristiques cellulaires nécessaires à l'agressivité d'une tumeur.

L'expression de l'ATX est régulée positivement ou négativement par plusieurs facteurs de croissance, cytokines, proto-oncogènes et des facteurs de transcription, qui diffèrent selon la lignée cellulaire. Par exemple, au niveau des cellules de carcinome de la thyroïde 1736, EGF et b-FGF favorise l'expression transcriptionnelle de l'ATX, alors que les cytokines IL-4, IL-1 β et le TGF β la réduisent ²¹². L'expression de l'ATX dans les carcinomes hépatocellulaires humains est sous le contrôle de l'axe TNF- α /NF κ B ²¹⁶. Sa surexpression est par ailleurs liée à une mutation de la β -caténine dans les tumeurs du rein de Wilms ²¹⁷, à une forte expression en Wnt1 dans les cellules épithéliales mammaires ²¹⁸ et à l'expression de v-Jun dans les fibroblastes transformés ²¹⁹. A contrario, son expression est réduite dans les neuroblastomes surexprimant le facteur N-Myc ²²⁰.

Dans les cellules de lymphomes de Hodgkin, une infection par le virus Epstein-Barr conduit à une induction de l'expression en ATX, associée à une forte production en LPA²¹⁵. Ces cellules présentent alors de fortes capacités de croissance et de survie. Une régulation négative spécifique de l'ATX, conduit à une diminution des niveaux en LPA et à une croissance et une viabilité réduite²¹⁵. Enfin, une surexpression de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-435 conduit à une stimulation de l'expression en ATX via le facteur de transcription NFAT1²²¹. Ce mécanisme pourrait expliquer l'effet stimulateur de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ sur la migration et l'invasion des cellules tumorales.

Rôle de l'activité lysoPLD dans la tumorigenèse et l'invasion

L'utilisation de cellules murines fibroblastiques NIH3T3 mutées pour *ras* et surexprimant l'ATX a mis en évidence, pour la première fois, le rôle de l'ATX dans la tumorigenèse *in vivo*²²². Sa surexpression se traduit par une croissance accrue de la tumeur, une forte agressivité tumorale et une importante angiogenèse. Les cellules surexprimant l'ATX mutée pour son activité catalytique (ATX/T210A), ne présentent pas le même profil invasif, ce qui prouve que son rôle dans la tumorigenèse est dépendant de son activité lysoPLD²²².

Plus récemment, notre laboratoire a également montré que la surexpression de l'ATX dans les cellules de carcinomes mammaires MDA-MB-231/B02 favorise la formation de métastases osseuses²²³, alors que l'inhibition de son expression dans le modèle murin de cancer du sein 4T1 freine la progression des métastases osseuses, sans toutefois affecter la croissance de la tumeur primaire²²³.

La létalité embryonnaire des souris déficientes pour l'ATX a entravé les études sur la progression tumorale. D'importantes informations ont cependant été acquises à travers l'étude d'animaux transgéniques : les souris MMTV-ATX développent spontanément, dans les glandes mammaires, des carcinomes invasifs et métastatiques associés à une forte inflammation²⁰⁵. L'expression du transgène ATX favorise la production de cytokines impliquées dans la croissance tumorale, tels que IL-8, et de facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF ou b-FGF, via l'activation des voies de signalisation PI3K-Akt et MAPKs²⁰⁵. Les souris transgéniques MMTV pour les récepteurs LPA₁ à LPA₃ présentent le même phénotype, ce qui renforce la notion selon laquelle le rôle de l'ATX

dans la tumorigenèse et l'invasion dépend de la production en LPA via son activité LysoPLD ²⁰⁵.

Implications cliniques

L'analyse de plusieurs ensembles de données de microarrays révèle une expression élevée en ATX dans certains cancers humains, en particulier dans les lymphomes à cellules B, les carcinomes rénaux, les cancers du foie et du pancréas ²²⁴.

Par ailleurs, les niveaux sériques en ATX dans les lymphomes folliculaires sont corrélés avec la masse tumorale et l'évolution clinique, ce qui suggère que l'ATX peut servir de biomarqueur dans les lymphomes folliculaires ²¹⁵. Une augmentation de l'activité sérique en ATX a également été rapportée chez des patients atteints de cancer du pancréas ²²⁵ et *ENPP2* est l'un des soixante-quatre gènes signatures associé à un faible taux de survie des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules de stade I ²²⁶. Enfin, il faut avoir conscience que cliniquement, une expression élevée en ATX n'est pas forcément liée à une augmentation des niveaux de LPA plasmatiques.

E. L'axe ATX/LPA dans les métastases osseuses

1. Implication dans les métastases ostéolytiques

LPA et cellules tumorales

Les cellules MDA-MB-231/B02, sous-clones des cellules humaines de carcinomes mammaires MDA-MB-231, ont été isolées pour leur fort ostéotropisme dans notre laboratoire ²²⁷. L'injection intraveineuse de ces cellules dans des souris Balb/C immunodéprimées conduit à la formation de lésions ostéolytiques très étendues. Ces cellules expriment les récepteurs LPA₁ et LPA₂ et prolifèrent en réponse à une stimulation par le LPA. Elles ont toutefois été transfectées pour surexprimer LPA₁ : leur traitement *in vitro* au LPA stimule la sécrétion des facteurs pro-ostéoclastiques IL-6, IL-8, GM-CSF, Gro- α et MCP1, et leur injection *in vivo* conduit à une augmentation de l'entendue des lyses osseuses vis-à-vis du contrôle ²²⁸. Inversement, l'inhibition de LPA₁ affecte considérablement la capacité des cellules à former des métastases osseuses ²²⁸. Ces résultats ont été confirmés par l'inhibition de la progression des métastases osseuses pré-établies chez les animaux traités avec le Ki16425. L'analyse histologique des membres postérieurs des animaux traités indique une diminution de la prolifération

tumorale et du nombre d'ostéoclastes ²²⁹. Par conséquent, le blocage des récepteurs LPA₁ constitue une nouvelle opportunité thérapeutique dans le traitement des métastases osseuses.

LPA et ostéoclastes

Au delà de son rôle sur les cellules tumorales, le LPA semble agir directement sur les ostéoclastes. La déplétion des lipides du sérum empêche l'ostéoclastogénèse *in vitro* stimulée par le RANK-L et le M-CSF. Le sérum contient en effet une grande quantité de LPA et l'ajout exogène de LPA (1 μ M) au sérum délipidé permet de restaurer l'ostéoclastogénèse ²²³. Le sérum renferme également de grande quantité de LPC, substrat de l'ATX ⁹⁵. L'ajout exogène d'ATX lors de l'ostéoclastogénèse en présence de sérum, amplifie le processus de différenciation ²²³. Le traitement au VPC8a202, inhibiteur de l'ATX, inhibe cette augmentation de l'ostéoclastogénèse induite par l'ATX exogène, démontrant que l'activité pro-ostéoclastique de l'ATX est dépendante de son activité lysoPLD ²²³. Le sérum contient lui-même de l'ATX de façon endogène, cependant le VPC8a202 n'est pas capable de bloquer l'ostéoclastogénèse induite par le sérum en présence de RANK-L/M-CSF. Ceci est vraisemblablement dû à la forte concentration en LPA dans le sérum. Dans le contexte des métastases osseuses, le LPA pourrait donc agir à la fois sur les cellules tumorales et sur les ostéoclastes pour favoriser la formation des métastases ostéolytiques.

Autotaxine et production locale de LPA

Comme nous l'avons vu précédemment, les niveaux en ATX sont la plupart du temps plus élevés dans les cancers que dans les tissus d'origine. Alors qu'elles expriment fortement LPA₁ et LPA₂ et qu'elles sont sensibles au LPA, les cellules MDA-MB-231/B02 n'expriment pas l'ATX et sont incapables de produire du LPA. L'expression *de novo* de l'ATX dans ces cellules leur permet d'acquérir cette faculté et leur capacité à former des métastases osseuses ostéolytiques est alors augmentée ²²³. Les cellules murines de carcinome mammaire 4T1 expriment quant à elles de façon endogène l'ATX et le récepteur LPA₁. L'inhibition de l'ATX par ARN interférence dans ces cellules, freine leur capacité à induire des métastases osseuses ostéolytiques, par rapport aux cellules parentales ²²³. Toutefois, l'origine du LPA et les mécanismes d'action de l'autotaxine dans la dissémination et dans le microenvironnement osseux restent méconnus. Les plaquettes sanguines sont connues pour contrôler la dissémination métastatique à des

stades précoces, mais elles contribuent également à l'expansion des métastases osseuses pré-établies via la libération de LPA ²³⁰. De manière intéressante, l'utilisation des cellules MDA-MB-231/B02 dans nos modèles *in vivo* a permis de mettre en évidence une production de LPA au site même de la métastase osseuse, suite à l'interaction entre cellules tumorales et plaquettes sanguines ²³¹. La question qui se pose est comment le LPA est-il produit ? Un élément de réponse peut venir de l'observation du groupe d'Aoki qui a montré que l'agrégation plaquettaire induit la libération de LPC, qui peut être converti en LPA sous l'action de l'ATX présente dans le plasma ²³². Il a par ailleurs été reporté que l'ATX est présente au niveau du thrombus plaquettaire selon un mécanisme dépendant de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ suggérant un rôle de l'ATX dans l'hémostase ²³³. Une partie du travail que j'ai réalisé a consisté à étudier le rôle de l'interaction entre plaquettes sanguines et ATX dans la dissémination métastatique à l'os.

2. Implication dans les métastases ostéocondensantes

Le rôle du LPA dans la formation des métastases ostéoblastiques est actuellement très peu référencé. Les différents rôles du LPA au niveau des ostéoblastes, décrits dans le paragraphe C. 1. c, laissent ainsi penser qu'il pourrait jouer un rôle important dans la formation des métastases ostéocondensantes. Par ailleurs, des expériences *in vitro* ont mis en évidence le rôle mitogénique du LPA sur les cellules de cancer de la prostate ²³⁴. Ces cellules sont également capables de produire du LPA suggérant l'implication d'une boucle de rétrocontrôle positive ²³⁵. Elles expriment fortement le récepteur LPA₃, mais son rôle dans cette pathologie n'a pas encore été exploré ²³⁴. Même si il est moins exprimé que LPA₃ par les cellules de cancer de la prostate, LPA₁ semble avoir un rôle prédominant dans la croissance et la progression tumorale ²³⁴. Li et Sarkar ont en effet montré que parmi les gènes des cellules PC3 androgéno-résistantes dont l'expression est diminuée par la géistéine (inhibiteur du cancer de la prostate), LPAR₁ est l'un des plus sensibles ²³⁶. La résistance à la privation androgénique est essentielle à l'acquisition d'un phénotype métastatique par les cellules de cancer de la prostate. Contrairement aux lignées PC-3 et DU145, les cellules LNCaP sont androgéno-sensibles, n'expriment pas le récepteur LPA₁ et ne répondent pas à une stimulation par le LPA. La transfection stable de LPA₁ leur permet de devenir sensible au LPA et de leur conférer la capacité à former des tumeurs chez la souris de façon autonome, sans co-injection de fibroblastes ²³⁷. L'interaction entre les cellules stromales et les cellules épithéliales est en effet

essentielle pour l'initiation et la progression des cancers des prostates. La co-culture, en présence de LPA, des cellules stromales prostatiques PS30 avec les cellules épithéliales LNCaP conduit à l'activation de la voie ERK/STAT3 et à la production de IL-6 par les cellules PS30 ²³⁸. Ces différentes études suggèrent ainsi que le LPA peut jouer un rôle direct et/ou indirect dans la progression et la dissémination des cancers de la prostate.

F. Cibles thérapeutiques

Les connaissances sur le rôle de l'axe ATX/LPA dans diverses pathologies, et notamment dans la progression de nombreux cancers, ont été approfondies grâce au développement d'une large gamme de composés ciblant cet axe (**Tableau 3**).

Le plus utilisé d'entre eux, le Ki16425, est un antagoniste des récepteurs LPA₁ et LPA₃ ²²⁹. Il inhibe *in vitro* la mobilisation de Ca²⁺, la migration et la prolifération de différents types cellulaires ²²⁹. Ce composé présente une activité faible mais non négligeable sur le récepteur LPA₂, ce qui a permis à certains auteurs de justifier le blocage de ce récepteur par un traitement au Ki16425 dans certaines conditions pathologiques, notamment dans le cancer du sein triple négatif ²³⁹. Notre laboratoire a également montré que le traitement avec le stéréoisomère R du Ki16425, qui correspond au Debio 0719, affecte de façon significative la dissémination métastatique des cellules murines de carcinome mammaire 4T1 aux poumons et aux os ¹⁹⁵. Divers analogues du LPA, tels que le VPC12249 qui est un antagoniste des récepteurs LPA₁ et LPA₃, ou le composé OMT qui est agoniste de LPA₃, ont également été utilisés dans diverses études *in vitro* et *in vivo* ²⁴⁰. Certains composés dérivés de phosphonates ou d'acide phosphatidique cyclique (cPA) ont également été développés ²⁴⁰. Plus récemment, un antagoniste spécifique du récepteur LPA₁, le composé AM966, a été développé et testé *in vivo* dans un modèle murin de fibrose pulmonaire idiopathique ¹⁶³. Le traitement *per os* des animaux avec ce composé réduit efficacement la fibrose et l'inflammation des poumons induit par la bléomycine. Son dérivé, le composé AM152/BMS-986202 a été testé dans le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique humaine, dans le cadre d'une étude clinique de phase I et en cours d'analyse dans un essai de phase II ²⁴¹.

En tant qu'enzyme extracellulaire, l'ATX est une cible thérapeutique très attractive. Les inhibiteurs de l'ATX sont répartis en deux grandes catégories. Basés sur la constatation que le LPA et la S1P inhibent l'activité de l'ATX *in vitro*, les analogues lipidiques ont été

utilisés en tant qu'inhibiteurs de l'ATX. Il a notamment été montré que le VPC8a202, analogue du LPA, inhibe l'augmentation de l'ostéoclastogénèse induite par l'ATX exogène ²²³. La forme phosphorylée du composé FTY720, analogue structural de la sphingosine, est également capable d'inhiber l'activité catalytique de l'ATX *in vitro*. L'injection de fortes quantités de cette drogue chez la souris conduit également à une légère diminution des taux plasmatiques d'ATX et de LPA ²⁴². Enfin, le composé S32826, dérivé de l'acide phosphonique, est l'un des inhibiteurs le plus puissant de l'activité catalytique de l'ATX *in vitro* ²⁴³. Néanmoins, ces analogues lipidiques ont une biodisponibilité limitée et leur efficacité en condition *in vivo* est faible.

COMPOSE	ACTIVITE	CARACTERISTIQUES	REFERENCES
Ki16425	Antagoniste des récepteurs LPA ₁ et LPA ₃	Dérivé isoxazole	Ohta, 2003
Debio 0719	Antagoniste des récepteurs LPA ₁ et LPA ₃	R-stéréoisomère du Ki16426	David, 2012
VPC12249	Antagoniste des récepteurs LPA ₁ et LPA ₃	Analogue du LPA	Heasley, 2004
OMPT	Agoniste du récepteur LPA ₃	Dérivé triphosphate du LPA	Okusa, 2003
AM966/BMS-986202	Antagoniste du récepteur LPA ₁	Analogue du LPA	Swaney, 2010
VPC8a202	Inhibiteur de l'activité lysoPLD	Analogue du LPA	East, 2010
FTY720	Antagoniste S1P, Inhibiteur de l'activité lysoPLD	Analogue du S1P	van Meeteren, 2008
S32826	Inhibiteur de l'activité lysoPLD	Dérivé de l'acide phosphonique	Ferry, 2008
PF-8380	Inhibiteur de l'activité lysoPLD	Dérivé pipéridine/pipérazine	Gierse, 2010
ONO-8430506	Inhibiteur de l'activité lysoPLD	Dérivé tétrahydro-β-carboline	Saga, 2014

Tableau 3. Liste non exhaustive des inhibiteurs des récepteurs du LPA et de l'ATX.

Les inhibiteurs non-lipidiques forment le second groupe d'inhibiteurs de l'ATX. Ils sont désormais considérés comme étant les inhibiteurs les plus prometteurs. Le criblage à haut débit a tout d'abord permis d'identifier les dérivés thiazolidinedione comme une nouvelle classe d'inhibiteurs ²⁴⁴. L'introduction d'un acide boronique, conçu pour cibler le résidu catalytique T210, a permis d'augmenter le potentiel inhibiteur de ces composés. Leur injection chez la souris conduit à une chute rapide des taux de LPA circulant ²⁴⁴. Au même titre que les analogues lipidiques, la biodisponibilité de ces composés reste limitée. Contrairement à ces molécules, le PF-8380, un dérivé pipéridine/pipérazine, et le composé ONO-8430506, un dérivé tétrahydro-β-carboline, peuvent être administrés par voie orale et induisent eux aussi une diminution rapide des taux plasmatique de LPA dans des modèles murins d'inflammation ^{245,246}. Il a récemment été montré que

l'inhibition de l'activité lysoPLD de l'ATX par le composé ONO-8430506 retarde la prise tumorale des cellules de carcinome mammaire 4T1 et diminue leur dissémination au poumon ²⁴⁷.

L'ensemble de ces travaux montre que le ciblage de l'activité lysoPLD de l'ATX présente désormais un haut potentiel thérapeutique. Il ne faut toutefois pas oublier que la production de LPA est également dépendante d'autres voies de production (PLA1/2, LCAT) ⁹⁵. Il serait donc intéressant de tester *in vivo* des combinaisons entre inhibiteurs d'ATX et antagonistes des récepteurs du LPA.

CHAPITRE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE

A. Objectifs des travaux de recherches

1. Contexte de l'étude

La dissémination métastatique est la principale cause de mortalité de patients atteints de cancers. Les traitements actuels des patients ayant des métastases osseuses utilisant des anti-résorptifs puissants tels que les bisphosphonates bloquent efficacement la perte osseuse mais sont largement inefficaces sur la survie des patients, qui reste similaire à celle des patients ne recevant pas de traitements (≤ 24 mois) ²⁴⁸. Ceci indique que d'autres facteurs, indépendant de la résorption osseuse, contribuent à la progression des métastases osseuses. Il est donc nécessaire de les identifier afin de pouvoir envisager de nouvelles approches thérapeutiques.

Notre laboratoire a montré par le passé que l'acide lysophosphatidique (LPA) produit par les plaquettes sanguines suite à l'interaction avec les cellules tumorales stimule la progression des métastases osseuses en raison de la stimulation de la prolifération tumorale et de la sécrétion de facteurs pro-ostéoclastiques (IL-6, IL-8, GM-CSF, Gro- α) par les cellules tumorales ²³¹. L'origine du LPA dans le contexte des métastases osseuses reste toutefois assez floue. On sait que grâce à son activité lysophospholipase D, l'autotaxine (ATX/NPP2) synthétise le LPA à partir de lysophosphatidylcholine ¹³¹. L'augmentation d'expression en ATX a été reportée dans les tumeurs primaires de nombreux cancers, dont le cancer du sein. Notre laboratoire a montré récemment que l'expression d'ATX contrôle la dissémination métastatique des cellules de cancer du sein et confère à ces cellules une capacité accrue à former des métastases ostéolytiques via la formation de LPA ²²³. Cependant, le mode d'action d'ATX au site métastatique est complètement inconnu.

2. Hypothèses

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été rassemblés sous forme de thèmes et n'ont pas la même organisation que les manuscrits acceptés ou en cours de préparation.

a) Mécanismes de production locale de LPA

Le LPA est très sensible aux phosphatases qui sont présentes en fortes quantités dans les liquides biologiques. La production de LPA doit donc être locale, à proximité de ses cibles cellulaires. Cela laisse donc penser qu'il existe des partenaires de l'ATX qui permettent son maintien au voisinage de la cellule et favorisent ainsi une production

locale de LPA. C'est pourquoi nous nous sommes dans un premier temps intéressés aux intégrines. Ce sont des récepteurs membranaires hétérodimériques qui contrôlent la prolifération, la survie, la migration et l'adhésion cellulaire. Notre laboratoire a démontré que l'intégrine $\alpha\beta3$ contrôle la capacité des cellules cancéreuses à former des métastases osseuses ⁵². De plus l'interaction métastatique avec les plaquettes sanguines induit une production de LPA ²³¹: celle-ci est contrôlée par les intégrines $\alpha\beta3$ tumorales et $\alpha\text{IIb}\beta3$ plaquettaires. D'autre part, il a été montré récemment que l'ATX se fixe sur les plaquettes sanguines via un mécanisme dépendant de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta3$ ¹²⁷. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'ATX pourrait agir localement au niveau du site métastatique en se fixant aux intégrines $\alpha\beta3$ exprimées par les cellules tumorales métastatiques. Cette interaction permettrait la production de LPA au voisinage immédiat de ses récepteurs membranaires, favorisant la progression des métastases ostéolytiques.

Toutefois, d'autres molécules pourraient être impliquées dans le maintien de l'ATX à la surface des cellules tumorales. Selon Moolenaar et Perrakis, les récepteurs du LPA ne pourraient pas toujours se situer au voisinage des intégrines, en particulier au niveau de la membrane basolatérale de cellules adhérentes polarisées. Il est par ailleurs bien établi que l'ATX peut être purifiée par chromatographie d'affinité via l'utilisation de colonne d'héparine. Des études de résonance plasmonique de surface ont également montré que l'ATX se fixe à l'héparine, suggérant qu'elle pourrait potentiellement interagir avec des heparanes sulfates protéoglycanes (HSPGs) en surface cellulaire ou dans la matrice ¹²⁵ et ainsi contribuer à la production locale du LPA. Nous avons ainsi décidé d'explorer l'interaction potentielle entre l'autotaxine et les heparane-sulfates protéoglycanes membranaires exprimés par les cellules tumorales, dans le contexte des métastases osseuses.

b) Rôle de l'autotaxine circulante dans la formation des métastases osseuses

L'autotaxine est une glycoprotéine sécrétée à un niveau basal dans la plupart des tissus chez l'Homme. Les études menées chez des souris hétérozygotes *Enpp2^{+/-}* ont démontré que l'ATX est responsable de la présence du LPA dans la circulation sanguine ⁹³. Toutefois, les fonctions physiopathologiques d'ATX et du LPA présents dans la circulation sont totalement inconnues. Par ailleurs, notre laboratoire a montré que l'agrégation plaquettaire induite par les cellules tumorales est à l'origine de la

production de LPA au site osseux ²³¹. L'agrégation plaquettaire induit également la libération de LPC, qui peut être converti en LPA sous l'action de l'ATX présente dans le plasma ²³². De manière intéressante, il a été reporté que l'ATX est présente au niveau du thrombus plaquettaire selon un mécanisme dépendant de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ²³³. Nous avons émis l'hypothèse que l'ATX circulante, donc non tumorale, pouvait être mobilisée par les plaquettes sanguines ou les cellules tumorales via l'interaction avec les intégrines $\alpha\text{IIb}\beta 3$ et $\alpha\text{V}\beta 3$, favoriser la production locale de LPA et contribuer au processus métastatique.

B. Matériels et méthodes

1. Etudes *in vitro*

Anticorps, produits et réactifs

L'anticorps monoclonal murin dirigé contre l'intégrine $\alpha\text{V}\beta 3$ humaine a été acheté chez MerckMillipore (Darmstadt, Allemagne). L'anticorps polyclonal de lapin anti-lysophospholipase D (LysoPLD) et l'autotaxine recombinante humaine (hATX) proviennent de chez Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). L'anticorps monoclonal de rat clone 4F1 dirigé contre l'autotaxine est un don généreux de J. Aoki (Tohoku University, Sendai, Japan). L'anticorps monoclonal murin dirigé contre la sous-unité $\beta 3$ humaine (clone SZ.21) a été acheté chez Chemicon (Temecula, CA, USA). L'anticorps monoclonal murin dirigé contre la sous-unité αIIb (clone SZ.22) et les anticorps monoclonaux murins dirigés contre syndecan-4 humain (clone 5G9) et syndecan-1 humain (clone DL-101) proviennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). L'anticorps monoclonal de rat anti-syndecan-4 (clone KY/8.2) a été acheté chez Becton Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA). L'anticorps MOPC21 provient de ICN Pharmaceuticals (Paris, France) et l'anticorps anti-IgG murin et anti-IgG de rat couplés au fluorochrome FITC ont été achetés chez Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). La lysophosphatidylcholine (1-Lyso-PC 6:0) et l'acide lysophosphatidique (LPA, Oleoyl C18:1) proviennent de chez Interchim (Montluçon, France) et le Ki16425 de chez Cayman Chemical. Le ReoPro® Abciximab (Janssen Biologics, Pays-Bas) est un don généreux du Dr. C. Paillet (Hospice Civils de Lyon, Lyon, France). Le clopidogrel a été acheté chez Mylan (Canonsburg), le PF-8380 (ATX inhibitor III) et la palmostatine B (APT1 inhibitor) chez MerckMillipore (Darmstadt, Allemagne). Les peptides

synthétiques Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) et Arg-Gly-Glu-Ser (RGES) ont été synthétisés par Proteogenix (Schiltigheim, France). L'Apyrase provient de chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) et l'ATX-Red AR-2 est un don généreux du Dr. Chad Testa de chez Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT, USA). L'inhibiteur de l'activité lysoPLD de l'autotaxine BMP22 a été synthétisé dans le laboratoire du Dr. G. Tigyi (University of Tennessee, Memphis, USA) comme décrit précédemment ²⁴⁹. Enfin, dans le cadre d'une collaboration avec le Cancer Research Technology (London, UK), nous avons eu à disposition l'inhibiteur de l'ATX CRT0161016.

Cellules et conditions de culture

Toutes les lignées cellulaires eucaryotes ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO₂, dans un milieu de culture spécifique de chaque lignée, complémenté avec du sérum de veau fœtal (SVF, Lonza) 10% v/v et d'un mélange pénicilline/streptomycine (1%, Invitrogen) v/v. Les cellules utilisées dans cette étude sont répertoriées dans le **Tableau 4**.

LIGNEES	ESPECES	TISSU	TUMEUR	MILIEU DE CULTURE
CHO	Hamster	Ovaire	Normal	Ham's F12-K (Kaighn's) Medium (Gibco)
MDA-MB-231	Homme	Sein	Adénocarcinome	Dubelcco's Modified Eagle Medium (Gibco)
MDA-MB-231/B02	Homme	Sein	Adénocarcinome	Dubelcco's Modified Eagle Medium (Gibco)
ZR-75-1	Homme	Sein	Carcinome canalaire	RPMI-1640 (ATCC)
MCF-7	Homme	Sein	Adénocarcinome	Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC) + 0.01mg/ml bovine unsulin
DU145	Homme	Prostate	Carcinome	Dubelcco's Modified Eagle Medium (Gibco)
PC3	Homme	Prostate	Adénocarcinome	Ham's F12-K (Kaighn's) Medium (Gibco)
MG63	Homme	Os	Ostéosarcome	Dubelcco's Modified Eagle Medium (Gibco)
4T1	Souris (Balb/c/c3H)	Glande mammaire	Carcinome	RPMI-1640 (ATCC)

Tableau 4. Lignées cellulaires utilisées.

Construction et purification de protéines recombinantes

Les séquences codant pour l'ATX sauvage (ATXwt) murine, qui partagent 88,1% d'homologie avec l'ATXwt humaine, et différentes formes mutées ont été introduites dans le vecteur d'expression pSecTag2B (Invitrogen) et transfectées dans des cellules CHO β 3 par électroporation via le système *BioRad GenePulserTM*. Les protéines

recombinantes produites possèdent une séquence signal IgK au niveau de l'extrémité N-Terminale permettant une sécrétion efficace des protéines. Au niveau de l'extrémité C-Terminale, les protéines possèdent la séquence de l'épitope Myc nécessaire pour la détection immunologique, suivie d'une étiquette 6*His permettant leur purification par affinité sur une colonne de Nickel. L'ATX est sécrétée dans le milieu de culture des différentes lignées cellulaires : on parle de milieu conditionné.

La purification des protéines recombinantes a été réalisée par chromatographie d'affinité en phase liquide sur des colonnes de Nickel (ProBond 50% Slurry/20% ethanol), grâce au logiciel de mesure d'absorbance *LP Data View* relié à l'appareil de purification *BioRad-Biologic-LP* réglé à un débit de 0.5ml/min. La résine a tout d'abord été lavée avec de l'eau déminéralisée, puis avec du tampon Native Binding Buffer 1X (NBB, 250 mM NaH₂PO₄, pH 8.0 ; 2,5 M NaCl). Les milieux conditionnés provenant des différentes lignées cellulaires ont ensuite été ajoutés sur la colonne chromatographique suivi par un lavage au NBB, puis avec du tampon Native Wash Buffer (NVB) contenant une faible concentration en imidazole (3 mM) afin d'éliminer les fixations protéiques non spécifiques sur les billes de nickel. L'élution des protéines a été réalisée par traitement de la colonne avec le Native Elution Buffer (NEB, 250 mM Imidazole). La forte concentration en imidazole entre en compétition avec les protéines étiquetées 6*His retenues sur les billes de Nickel. Les protéines sont alors décrochées et récupérées dans différentes fractions et sont ensuite analysées par SDS-PAGE (gel de polyacrylamide 7%, p/v) afin de déterminer dans quelles fractions éluées se situe la protéine d'intérêt. Les éluats ont été dialysés contre une solution de TrisHCL (50 mM, pH 7.4), afin d'éliminer l'imidazole, et concentrés en une seule étape grâce au système centricon : les éluats ont été déposés dans des tubes contenant un filtre (Millipore) et centrifugés pendant 10 min (4000 g à 4°C). Les solutions dialysées ont été diluées au demi et conservées dans une solution de TrisHCL + PEG 20% (Polyéthylèneglycol) à -80°C. Les concentrations des protéines ont été déterminées à l'aide du kit *DC protein assay* (Biorad).

Test d'adhésion cellulaire

Les tests d'adhésions cellulaires s'effectuent dans des plaques Elisa 96 puits rigides à fond plat, où les cellules eucaryotes n'adhèrent pas. Les protéines sont déposées sous la forme de gouttes de 10 µl contenant les quantités optimales pour chaque protéine. L'albumine de sérum de bœuf (BSA, Bovine serum albumin) est utilisée comme contrôle

négalif de l'adhésion cellulaire, tandis que l'ostéopontine (OPN) est utilisé en tant que contrôle positif vis-à-vis de l'intégrine $\alpha V\beta 3$. Après une incubation d'une nuit à 4°C, les protéines sont ensuite fixées au support plastique avec du méthanol froid (60%v/v) pendant 24h. Les cellules sont récoltées par un traitement à l'acutase (PAA), suspendues (10^6 cellules/ml) dans un tampon *Hepes Tyrode Buffer*²⁵⁰ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM KCl, 0.1% glucose, 0.02% BSA), en présence ou en absence de manganèse (Mn^{2+} : [2mM]). Les cellules sont incubées 1h à 37°C, puis 100 μ l (10^5 cellules) de la solution est ajoutée dans chaque puits coaté. Après 1h d'incubation à 37°C, les cellules non adhérentes sont éliminées par trois lavages au PBS 1X. Les cellules adhérentes sont fixées et colorées avec une solution contenant 20%(v/v) de méthanol et 0,5% (p/v) de cristal violet. Les cellules adhérentes au sein de cinq champs chevauchants sont comptées. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules attachées par mm².

Cytométrie de flux

Afin de vérifier l'expression de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ et de syndecan-4 (SDC4) au niveau de différentes lignées cellulaires, des analyses par cytométrie de flux ont été réalisées sur un FACscan *Cantoll*. Les cellules ont été récoltées par un traitement à l'acutase (PAA), puis lavées dans une solution de PBS1X-BSA 0.2%. Les cellules ($2,5 \cdot 10^5$ cellules/ml) ont ensuite été incubées pendant 1h à 4°C, avec l'anticorps primaire anti- $\alpha V\beta 3$ ou anti-SDC4 (10 μ g/ml), lavées avec au PBS1X-BSA 0.2%, puis incubées pendant 45 min à 4°C avec un anticorps secondaire anti-souris ou anti-rat couplé au fluorochrome FITC (diluée à 1/2000^{ème}). Les cellules ont ensuite été lavées, resuspendues dans du PBS1X-BSA 0.2% et enfin analysées sur le FACscan.

Préparation des plaquettes sanguines humaines et agrégation

Du sang humain a été prélevé chez des sujets sains, volontaires et consentements informés, et recueillis dans un sixième de volume en acide citrate dextrose (ACD; 2.5 g sodium citrate, 1.5 g acide citrique, et 2 g de glucose dans 100 ml H₂O). Le plasma riche en plaquettes (Platelet-rich plasma-PRP) a été préparé par centrifugation des tubes de sang ACD, pendant 20 min à 200 g à température ambiante : un volume de ACD a ensuite été ajouté à neuf volumes du PRP. La solution obtenue a lentement été mélangée, puis centrifugée à 1500 g pendant 15 min à température ambiante. Le culot plaquettaire a

finalement été remis en suspension dans du tampon Tyrode (pH 7.4) contenant 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.42 mM NaH₂PO₄, 5 mM glucose, 10 mM HEPES et 0.2% de BSA (Bovine Serum Albumin).

L'agrégation plaquettaire a été mesurée sur le lumi-agrégomètre *Chrono-Log*, à 37°C sous agitation (900 rpm). Elle a été initiée suite à l'addition de collagène (10 µg/ml) ou des cellules tumorales MDA-MB-231/B02 (10⁶ cellules), contrôlée et enregistrée en pourcentage de transmission de lumière en fonction du temps via le logiciel *Aggro-Link*. Après agrégation, culots plaquettaires et surnageants ont été séparés par centrifugation (1000 g pendant 10 min), puis conservés à -80°C pour diverses analyses.

Immuno-précipitation

Les cellules CHOβ3-ATXwt et CHODhfr-ATXwt, dérivées de cellules CHO et transfectées de façon stable pour surexprimer l'ATXwt, ont été générées avant mon arrivée au laboratoire. Ces cellules ont été préalablement ensemencées dans des boîtes de 10 cm. Elles ont ensuite été solubilisées dans du tampon RIPA (Sigma-Aldrich) (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1% Triton 100X, 1 µg/ml aprotinine, 1 µg/ml leupeptine) à 4°C pendant 30 min, puis récupérées. 250 µg de lysat cellulaire ont été incubés en présence de l'anticorps LM609 la nuit à 4°C. Pour l'immunoprécipitation de l'ATX à partir de plaquettes sanguines humaines, six surnageants de plaquettes agrégées ou le surnageant de plaquettes non-agrégées ont été incubés la nuit à 4°C en présence de l'anticorps anti-LysoPLD (Cayman). Les billes de G sépharose (50 µl, 50% slurry), préalablement lavées dans du tampon de lyse (3 lavages), ont ensuite été ajoutées au mélange lysat cellulaire-anticorps pendant 12h sous agitation à 4°C. Puis, les complexes immuno-précipités ont été lavés dans une solution HNTG (20 mM HEPES, pH 7.4, 137 mM NaCl, Triton X-100, 10% glycerol), et resuspendues dans du tampon NuPAGE (Life Technologies). Les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 3 minutes, afin de dénaturer les protéines, réduire les ponts disulfures et décrocher les anticorps des billes de G sépharose, et centrifuger 5 min à 1000 rpm afin de ne récupérer que les surnageants. Les protéines ont finalement été séparées par SDS-PAGE à 7%, et analysées par Western-Blot.

Immuno-détection des protéines par Western-Blotting

Les clones CHO ont été cultivés dans du milieu complet F-12K (Gibco), mis sous restriction nutritive dans du milieu dépourvu de sérum pendant 48h, puis lysés dans

100 µl de tampon RIPA (Sigma Aldrich) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1% Triton 100X, 1 µg/ml aprotinine, 1 µg/ml leupeptine) à 4°C. Les plaquettes humaines lavées (10^7) ont été lysées dans 100 µl du même tampon. Pour la détection de l'ATX en solution, les différents clones CHO ont été ensemencés, mis sous restriction nutritive, puis les milieux conditionnés ont été récoltés après 48h. Les lysats obtenus (50 µg de protéines) ont ensuite été chargés sur un gel de SDS-polyacrylamide à 7% et soumis à une électrophorèse dans des conditions réductrices. Pour la détection de la sous unité $\beta 3$ de l'intégrine, les protéines ont été soumises à une électrophorèse dans des conditions non-réductrices. Après électrophorèse, les gels ont été transférés sur des membranes PVDF Immobilon-P (MerckMillipore) par transfert semi-sec pendant 2h ($1\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$). Les membranes ont été saturées dans un tampon d'incubation TBS-TX (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, Tween20 0.1%) supplémenté avec du lait écrémé 5% (p/v). Elles ont ensuite été incubées la nuit à 4°C avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-LysoPLD, l'anticorps monoclonal murin anti- $\beta 3$ (SZ.21) ou l'anticorps monoclonal murin anti- αIIb (SZ.22), dilués respectivement au 1/500^{ème}, au 1/1000^{ème} et au 1/2000^{ème} dans du tampon d'incubation. Puis les membranes ont été lavées et incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG lapin ou anti-IgG souris directement couplé à la peroxydase (Amersham; dilution au 1/2000^{ème}) pendant 2h à température ambiante. Après lavage des membranes, la présence des protéines a été révélée par radiographie en utilisant le kit de révélation *Western Lightning Chemiluminescence Reagent* (Perkin Elmer LAS Inc).

Détection de l'ATX par microscopie électronique à transmission

Cette expérience a été réalisée en étroite collaboration avec le Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-EST (CIQLE). Des plaquettes sanguines humaines ont été fixées pendant 30 min à 37°C dans une solution de paraformaldéhyde 4% supplémentée avec 0.2% de glutaraldéhyde, lavées trois fois avec un mélange contenant 0.2 M de cacodylate et 0.4 M de saccharose, et finalement déshydratées et incluses pendant 48h à 50°C dans une solution polymérisante pure *LR White™*. Des sections de 70 nm d'épaisseur ont été découpées à l'ultra-microtome *Reichert Ultracut E*, montées sur des grilles de nickel de 200 mailles enduites de polylysine (diluée à 1/1000^{ème}) et stabilisées une journée à température ambiante. Pour réaliser l'immuno-marquage, les grilles ont ensuite été déposées sur des gouttes contenant les réactifs appropriés : les sites non spécifiques ont

dans un premier temps été saturés avec une solution de TrisHCl (50 mM, pH 7.4) supplémentée avec 1% de BSA et 1% de sérum de chèvre pendant 20min à température ambiante, puis incubées la nuit à 4°C avec l'anticorps monoclonal de rat anti-ATX (clone 4F1) ou l'anticorps polyclonal de lapin anti-LysoPLD respectivement dilués au 1/500^{ème} et au 1/250^{ème} dans une solution de TrisHCl (50 mM, pH 7.4)/BSA 1%. Puis, les coupes ont été lavées trois fois dans du TrisHCl (50 mM, pH 7.4) et incubées 45min en chambre humide à température ambiante avec des anticorps secondaires de chèvre anti-IgG de rat ou anti-IgG de lapin couplés à des billes d'or (1/80^{ème} ; Tebu ; Le Perray en Yveline, France). Les échantillons ont été lavés trois fois dans la solution de TrisHCl (50 mM, pH 7.4) puis à l'eau distillée. Les complexes immuns ont été fixés 3min dans 4% de glutaraldéhyde pendant 3min. Les coupes ont finalement été colorées avec une solution d'acétate d'uranyle 0.5% et observées au microscopes électroniques à transmission JEOL 1400JEM (Tokyo, Japon).

Quantification de l'activité LysoPLD par bioluminescence

Pour la quantification de l'activité lysoPLD en solution, les clones CHO β 3-ATXwt et CHO β 3-ATX/T209A ont été ensemencés dans des plaques de cultures cellulaires de 6 puits et mis sous restriction nutritive. Les milieux conditionnés, récoltés après 48h, ont été traités avec de l'ATX-Red AR-2 (1 μ M), pendant 20min dans l'obscurité, en présence ou en absence de BMP22 inhibiteur de l'activité lysoPLD. La fluorescence émise a été analysée par bioluminescence à l'aide d'un *NightOwl* (Berthold) et les données ont été exprimées en Ph/s par rapport au niveau basal.

Dosage de l'acide lysophosphatidique

Ces dosages ont été effectués dans le laboratoire du Dr G. Tigyi (University of Tennessee, Memphis, USA). Les concentrations en LPA ont été quantifiées à l'aide du test biologique Fura-2 de mobilisation du Ca²⁺. Des fibroblastes embryonnaires ont été prélevées chez des souris doubles déficientes *lpar1*^{-/-}/*lpar2*^{-/-} puis transfectées pour surexprimer la forme humaine du récepteur LPA₂ ²⁵¹. La stimulation de ces cellules par le LPA induit une libération dose-dépendante de calcium, associée à une émission de fluorescence. L'utilisation de concentrations connues de LPA 18:1 permet de générer une courbe standard et déterminer ainsi indirectement la teneur en LPA des échantillons. Pour quantifier le niveau en LPA des surnageants de co-culture plaquettes/cellules tumorales,

une courbe de régression non linéaire a été générée à l'aide du logiciel *GraphPad Prism v5.0* (GraphPad Software, Inc. ; San Diego, CA, USA), suite au traitement des cellules avec des concentrations croissantes de LPA 18:1 (0.001-1 μ M). La fluorescence a été mesurée en utilisant le lecteur de plaque *FlexStation 3* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Les concentrations en LPA contenues dans les surnageants de co-culture plaquettes/cellules tumorales collectés après 2h, 4h et 24h d'incubation ont été extrapolés à partir de la courbe d'étalonnage et exprimés en activité relative de LPA.

Test de prolifération cellulaire

Les tests de prolifération cellulaire induite par l'ATX ont été réalisés comme décrit précédemment ²¹². Brièvement, les cellules MDA-MB-231, MDA-MB-231/B02 et MG63 (8×10^3 cellules) ont étéensemencées dans des plaques de cultures cellulaires de 48 puits dans du milieu complet pendant 24h. Les cellules ont ensuite été synchronisées en étant mise sous restriction nutritive dans du milieu dépourvu de sérum pendant 24h, puis traitées 48h avec de l'ATX (0.3 nM) et du LPC (1 μ M), en présence ou en absence de différentes concentration d'inhibiteurs de l'ATX (BMP22, PF-8380) ou de Ki16425, antagoniste des récepteurs LPA₁ et LPA₃. La prolifération cellulaire a alors été évaluée en suivant l'incorporation de BrdU pendant 7h via l'utilisation du kit *Cell proliferation ELISA BrdU-Colorimetric* (Roche) selon les instructions du fournisseur.

La prolifération cellulaire induite par les plaquettes sanguines a été réalisée en ensemencant des cellules MDA-MB-231/B02 (5×10^4 cellules par puits) dans des plaques de cultures de 96 puits dans du milieu complet F-12K (Gibco). Les cellules ont ensuite été synchronisées en étant mise sous restriction nutritive dans du milieu dépourvu de sérum la nuit à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO₂. Les plaquettes humaines lavées (10^6 plaquettes) ont ensuite été ajoutées dans chaque puits, dans un volume final de 100 μ l, et incubées de 2 à 24h. Les cellules ont finalement été fixées et colorées avec une solution contenant 20%(v/v) de méthanol et 0,5% (p/v) de cristal violet. La prolifération a ensuite été évaluée par analyse densitométrique.

Invasion et transmigration

Ces tests ont été effectués dans le laboratoire du Dr G. Tigyi (University of Tennessee, Memphis, USA). L'invasion des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 à travers une couche de matrigel à l'aide du système d'invasion FluoroBlok™ (pores de 8 μ m, BD

Biosciences) a été réalisée comme décrit précédemment ²²³. Du milieu DMEM/BSA 0.1% sans sérum, supplémenté avec de l'ATX recombinante (0.1 nM) et du LPC (1 µM) en présence ou en absence de BMP22, a été utilisé comme chimio-attractant. Les cellules ayant migrées sur la face inférieure des inserts ont été colorées à la calcéine-AM. Les cellules fluorescentes ont finalement été quantifiées en utilisant le lecteur de microplaques *FlexStation 3* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Les tests de transmigration des cellules MDA-MB-231 à travers une monocouche de cellules endothéliales ont été réalisés comme décrit précédemment ²⁵². Les cellules endothéliales HUVEC (10⁵ cellules) ont été ensemencées sur des inserts de culture (pores de 8 µm, membrane de PET, BD Biosciences) et incubées dans du milieu complet MCDB-131 pendant 24h à 37°C pour former une couche. Les cellules MDA-MB-231 préalablement marquées à la calcéine-AM ont ensuite été déposées sur les monocouches de cellules HUVEC. Du milieu MCDB-31/BSA 0.1% sans sérum, en présence ou en absence d'ATX recombinante (0.1 nM) et de LPC (1 µM), a été ajouté dans la chambre inférieure. Après 20h d'incubation à 37°C, le nombre de cellules MDA-MB-231 ayant envahi la monocouche de cellules HUVEC a été compté en utilisant un microscope à fluorescence inversée *NIKON TiU*.

Quantification de la sécrétion en IL-6

Les cellules de cancer du sein (8x10³ cellules) ont été ensemencées dans des plaques de cultures cellulaires de 48 puits et cultivées en milieu DMEM (Gibco) complet pendant 24h. Elles ont ensuite été synchronisées en étant mises sous restriction nutritive dans du milieu dépourvu de sérum pendant 24h, puis traitées 48h avec de l'ATX (0.3 nM) et du LPC (1 µM), en présence ou en absence de concentrations croissantes de BMP22, inhibiteur de l'activité lysPLD. Les milieux conditionnés ont ensuite été récupérés, centrifugés pendant 10min à 10000 g et la quantité d'IL-6 libérée par les cellules a été mesurée à l'aide du kit ELISA de détection de cytokines (PeproTech). La sensibilité du kit ELISA est de 1 ng/ml et l'absorbance a été mesurée sur le lecteur *Multiskan EX/ELISA reader* (Thermo Scientific).

Reverse Transcription (RT) – qPolymerase Chain Reaction (qPCR)

Les ARN totaux des différentes cellules ont été extraits à l'aide du kit *Nucloespin RNAII* (Macherey-Nagel). La reverse-transcription des ARNm en ADN complémentaire a été réalisée en utilisant le kit *iScript cDNA synthesis* (BioRad). Les produits de réaction de

PCR ont été obtenus via le kit *qPCR SYRB Green* (Lifetechnologies) et des amorces spécifiques recensées dans le **tableau 4**. Les ANDc ont été amplifiés par real time PCR pendant 55 cycles à l'aide de l'appareil *Realplex2 qPCR* (Eppendorf). Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à la valeur de l'ARN de ménage L32, en utilisant la méthode des ΔC_t ²⁵³.

GENE	S/AS	SEQUENCE	LOCA.	TAILLE	T°C	SLOPE	INT.
LPAR1	S	AATCGAGAGGCACATTACGG	643-662	181	58	-3.596	15.73
	AS	CTGTAGAGGGGTGCCATGTT	822-803				
LPAR2	S	CGCTCAGCTGGTCAAGACT	954-933	108	60	-3.871	18.86
	AS	TTGCAGGACTCACAGCCTAAAC	846-865				
LPAR3	S	TGCTCATTTTGTCTGTCTGG	479-498	165	60	-3.987	19.14
	AS	ATGATGAGGAAGGCCATGAG	644-625				
LPAR4	S	GCCTGCTACTCTGTCTCAAATTGG	1234-1258	200	60	-3.322	23.64
	AS	GCAAGGCACAAGGTGATTGG	1434-1415				
LPAR5	S	CTCGGTGGTGAGCGTGATACATG	433-464	211	60	-4.378	22.96
	AS	GCGTAGCGGTCCACGTTGAT	644-624				
LPAR6	S	AAATTGGACGTGCCTTTACG	1190-1171	115	60	-3.972	19.73
	AS	TAACCCAAGCACAAACACCA	1075-1054				
ATX	S	ACAACGAGGAGAGCTGCAAT	2610-2631	113	67	-3.505	25.85
	AS	AGAAGTCCAGGCTGGTGAGA	2723-2704				
SDC1	S	CCAGCAGATGAGCATGGTC	2882-2863	179	60	-3.781	21.33
	AS	ACGTTTCAGCGACTCCG	2703-2719				
SDC2	S	TCATTAAACCACTCTGCAACA	2173-2152	137	67	-3.710	22.16
	AS	TGCAATTTGAAGGTACGAGTAG	2057-2036				
SDC3	S	GCCATGAACTCAGGACAGGT	4888-4907	127	60	-3.981	26.4
	AS	CAGTGTCCTCCCTCCTGT	4779-4761				
SDC4	S	CCTCAGTTGCACTAACCACG	2095-2114	139	60	-3.679	22.85
	AS	AGCTGAGGCTGTGACTCGTT	2234-2215				
GPC1	S	AGGCCAAGGACTGACTTTGC	1922-1941	229	60	-4.142	26.39
	AS	GAGGTCCCTGAAATACATGGC	2131-2151				
GPC2	S	CACCTGCTGTTCCAGTGAGA	198-217	179	58	-3.638	24
	AS	GAGCTGGGTCAGAGAGTGCT	376-357				
GPC3	S	CCTGATTCAGCCTTGGACAT	500-519	240	58	-3.911	22.14
	AS	TCCCTGGCAGTAAGAGCAGT	665-646				
GPC4	S	CAGGGTCTGGGAGCCAAGT	304-322	128	60	-3.672	23.79
	AS	GCACAGTGCTGGACATTGACA	432-412				
GPC5	S	GGGCTGCCGGATTCTG	153-167	73	60	-4.182	21.73
	AS	CTGGTGCAACATGTAGGCTTTT	205-226				
GPC6	S	ATCGGGGCTGTGATTCTTC	628-646	175	60	-4.331	24.15
	AS	TGAATCCCTTGGCACCGTA	471-489				
L32H	S	CAAGGAGCTGGAAGTGCTGC	340-359	100	67	-3.546	15.43
	AS	CAGCTCTTCCACGATGGC	440-422				

Tableau 5. Liste des amorces humaines. LOCA., Localisation ; T°C, Température d'hybridation ; INT., Interception ; S/AS, Sens/Antisens

Analyses statistiques

Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism v5.0* (GraphPad Software, Inc. ; Sandiego, CA, USA). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne

± écart type, comme indiqués dans la légende des figures. Les différences entre les groupes ont été déterminées via les tests statistiques one-way ou two-way ANOVA suivie d'un test de Bonferroni. Les comparaisons individuelles ont été effectuées en utilisant le test statistique Mann-Whitney non paramétrique. Les valeurs $p < 0.05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

2. Modèles *in vivo* de formation des métastases osseuses

a) Le modèle de xénogreffe MDA-MB-231/B02

L'injection intracardiaque de cellules de carcinomes mammaires MDA-MB-231 dans le ventricule gauche de souris immunodéprimées provoquent l'apparition de métastases osseuses ostéolytiques distinctes à la radiographie, 3 à 4 semaines après inoculation ²⁵⁴. Cependant, d'un point de vue technique, l'injection intracardiaque de ces cellules ne garantit pas la formation de métastases ostéolytiques à 100%. C'est pourquoi, le sous-clone MDA-MB-231/B02 a été généré dans notre laboratoire, suite aux passages répétés *in vivo* dans l'os des cellules MDA-MB-231 injectées en intracardiaque ²²⁷. Ce sous-clone présente un fort ostéotropisme osseux : lorsque ces cellules MDA-B02 sont injectées dans l'artère caudale de la queue de souris « Nude » immunodéprimées, elles ont une prédisposition unique à ne former que des métastases ostéolytiques au niveau des membres inférieurs. Ces cellules ont également été transfectées de façon stable, sous sélection à la puromycine, avec un vecteur d'expression codant pour la GFP (MDA-B02/luc) afin d'observer la dissémination métastatique par bioluminescence ²²⁷.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. G. Tygyi (University of Tennessee, Memphis, USA), nous avons à notre disposition un inhibiteur de l'activité lysoPLD, le composé BMP22 ²⁴⁹. Les cellules MDA-B02 n'exprimant pas l'ATX de façon endogène ²²³, nous avons donc décidé d'examiner le rôle de l'ATX circulante non-tumorale dans la dissémination et la formation de métastases osseuses.

Formation des métastases osseuses ostéolytiques par injection intraveineuse

Les expériences ont été réalisées comme décrites précédemment ²²⁷. Les cellules MDA-B02/luc (10^6 cellules dans 100µl de PBS1X) ont été injectées dans l'artère caudale de la queue de souris femelles Balb/C Nude âgées de 4 semaines (Charles River), préalablement anesthésiées par injection intra-péritonéale (IP) d'un mélange de Xylazine/kétamine. 21 jours après l'injection, une randomisation des animaux selon la

taille des tumeurs a été effectuée par bioluminescence (NightOwl, Berthold). Les animaux ont ensuite été traités avec le composé BMP22 (1 mg/kg, IP) ou un placebo jusqu'à J36. Trente six jours après l'inoculation des cellules tumorales, les animaux ont été radiographiés (MX-20; Faxitron X-ray Corporation), puis mis à mort afin de récupérer les membres postérieurs. L'étendue des lésions osseuses a été mesurée à l'aide du système d'analyse d'image informatisé *MorphoExpert* (Exploranova) et exprimée en mm². Les membres postérieurs des animaux ont ensuite été fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4%, décalcifiés dans une solution d'EDTA 16% puis inclus dans de la paraffine. La détection *in situ* des ostéoclastes a été réalisée sur des coupes (5 µm) de tissus osseux métastatiques via le kit de dosage de l'activité de la TRAP (Tartate-Resistant Acid Phosphatase) (Sigma-Aldrich). La surface de résorption (Oc.S/BS) a été calculée comme étant le rapport de la surface trabéculaire TRAP-positives (Os.S) sur la surface totale de l'os trabéculaire (BS) à l'aide du système d'analyse d'image *MorphoExpert* (Exploranova). Une analyse histomorphométrique a également été réalisée sur certaines coupes colorées au trichrome de Goldner. Cette coloration permet de mettre en évidence l'os décalcifié en vert, la moelle osseuse en rouge foncé et les cellules tumorales, différenciables des cellules de la moelle osseuse par leur forme allongée et leur organisation anarchique. Cette analyse, réalisée à l'aide du logiciel *Bone* (Visiolab 2000), a permis de déterminer le volume osseux encore présent (BV/TV ; Bone Volume/Tissue Volume) ainsi que la masse tumorale au sein de la cavité osseuse (TB/STV ; Tumor Burden/Soft Tissue Volume).

Colonisation spontanée de la moelle osseuse

Les cellules MDA-B02/luc (10⁶ cellules dans 100 µl de PBS1X) ont été injectées dans l'artère caudale de la queue de souris femelles Balb/C Nude âgées de 4 semaines (Charles River), préalablement anesthésiées par injection intra-péritonéale d'un mélange de Xylazine/kétamine. Les animaux ont ensuite été traités de J0 à J7 par voie intra-péritonéale avec le composé BMP22 (1 mg/kg) ou son placebo, ou avec du milieu conditionné (deux injections de 300 µl/jour) issu des sous-clones CHO surexprimant l'ATX sauvage ou mutée pour son activité lysoPLD (ATX/T210A). Sept jours après l'inoculation, les animaux ont été mis à mort par dislocation cervicale afin de récupérer les membres postérieurs. Les os ont ensuite été coupés, puis traités à la collagénase (0.25 mg/ml) pendant 2h à 37°C. La suspension cellulaire a ensuite été lavée au PBS1X,

puis ensemencée dans des plaques de culture cellulaire de 6 puits dans du milieu DMEM (Gibco) sous sélection à la puromycine (1µg/ml). Après deux semaines d'incubation à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO₂, les clones obtenus ont été fixés et colorés avec une solution contenant 20%(v/v) de méthanol et 0,5% (p/v) de cristal violet, pour finalement être comptés.

b) Le modèle syngénique 4T1

Les modèles syngéniques de carcinomes mammaires forment peu de métastases ostéolytiques lorsqu'ils sont injectés chez la souris ou le rat. Certaines sous-lignées de carcinomes mammaires ont cependant été sélectionnées *in vivo* pour leur capacité à former spontanément des métastases osseuses ostéolytiques. C'est notamment le cas de la sous-lignée 4T1, isolée à partir d'un carcinome spontané dans la glande mammaire d'une souris Balb/cfC3H ²⁵⁵. Lorsque ces cellules sont injectées de façon orthotopique en «Fat Pad» dans la glande mammaire ou dans l'artère caudale de la queue, les souris femelles ont une forte capacité à former des métastases osseuses et pulmonaires ²⁵⁵. Par ailleurs, ces cellules ont pour caractéristique d'être résistante à la 6-thioguanine, un anti-métabolite notamment utilisé dans le traitement des leucémies ²⁵⁵. Ce composé entre en compétition avec l'hypoxanthine-guanine et l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase, qui interviennent dans la production des nucléotides puriques. Enfin, les cellules 4T1 expriment fortement et de façon endogène l'ATX et son invalidation génétique (4T1shATX) conduit à une diminution de près de 50% de l'étendue des plages ostéolytiques ²²³.

Formation de métastases osseuses ostéolytiques par injection intraveineuse

Les expériences ont été réalisées comme décrites précédemment ²²³. Brièvement, les cellules 4T1 (10⁵ cellules dans 100 µl de PBS1X) ont été injectées dans l'artère caudale de la queue de souris femelles Balb/C âgées de 6 semaines (Charles River), préalablement anesthésiées par injection intra-péritonéale (IP) d'un mélange de Xylazine/kétamine. Quatorze jours après l'inoculation, les animaux ont été radiographiés (MX-20; Faxitron X-ray Corporation), puis mis à mort afin de récupérer les membres postérieurs. L'étendue des lésions osseuses a été mesurée à l'aide du système d'analyse d'image informatisé *MorphoExpert* (Exploranova) et exprimée en mm². Les membres postérieurs des animaux ont ensuite été fixés, décalcifiés puis inclus

pour différentes analyses histologiques et histomorphométriques, comme décrit précédemment.

Colonisation spontanée de la moelle osseuse

Les cellules 4T1 ou 4T1shATX (10^5 cellules dans 100 μ l de PBS1X) ont été injectées dans l'artère caudale de la queue de souris femelles Balb/C âgées de 6 semaines (Charles River), préalablement anesthésiées par injection intra-péritonéale (IP) d'un mélange de Xylazine/kétamine. Sept jours après l'inoculation, les animaux ont été mis à mort par dislocation cervicale afin de récupérer les membres postérieurs. Les os ont ensuite été coupés, puis traités à la collagénase (0.25 mg/ml) pendant 2h à 37°C. La suspension cellulaire a ensuite été lavée au PBS1X, puisensemencée dans des plaques de culture cellulaire de 6 puits dans du milieu RPMI-1640 sous sélection à la 6-thioguanine (10 μ g/ml). Après deux semaines d'incubation à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO₂, les clones obtenus ont été fixés et colorés avec une solution contenant 20%(v/v) de méthanol et 0,5% (p/v) de cristal violet, pour finalement être comptés.

Modèle orthotopique de formation de micro-métastases médullaires

Les expériences ont été réalisées comme décrites précédemment ¹⁹⁵. Les cellules 4T1 ont été injectées en «Fat Pad» (10^5 cellules dans 10 μ l de PBS1X) dans la 4ème glande mammaire de souris femelles Balb/C âgées de 6 semaines (Charles River). Selon le protocole, les animaux ont été traités *per os* avec le composé CRT0161016 (100 mg/kg) ou un placebo soit en néo-adjuvant de J0 au jour de la résection, soit en adjuvant après établissement de la tumeur. Quatorze jours après l'inoculation des cellules tumorales, les animaux ont été anesthésiés par injection intra-péritonéale d'un mélange de Xylazine/kétamine, les tumeurs primaires ont été enlevées chirurgicalement, pesées, fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 48h, déshydratées pendant 24h dans de l'éthanol 70% suivie d'un bain de 3h à l'éthanol 100% et finalement incluses dans de la paraffine. Trois semaines après la résection des tumeurs (J36), les animaux ont été mis à mort afin de récupérer les membres postérieurs, les poumons et les tumeurs en cas de reprise tumorale.

Les cellules des moelles osseuses ont été récoltées par un traitement à la collagénase (0.25 mg/ml), puis mises en culture *in vitro* afin de quantifier la colonisation métastatique des cellules tumorales.

Une analyse immuno-histochimique avec un anticorps monoclonal anti-Ki-67 murin (Dako, Trappes) a été réalisée sur des coupes (5 μm) de tumeurs primaires ou de tumeurs issues de reprise tumorale afin de reconnaître spécifiquement les cellules en état de prolifération. Les coupes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la HRP. Les analyses ont été effectuées sous microscope (Eclipse E400, Nikon France, Champigny, France) équipé d'une caméra (CDD video, Sony, Japan). Le nombre de noyaux positifs au Ki-67 a été comptabilisé (Histolab, Microvision Instruments, Evry, France) et utilisé pour définir l'index mitotique comme le pourcentage des noyaux positifs au Ki-67 sur le nombre total de noyaux.

Comme les tumeurs, les poumons ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4%, déshydratés dans de l'éthanol et finalement incluses dans de la paraffine. Des coupes de 5 μm d'épaisseur espacées de 200 μm ont été réalisées sur l'intégralité du poumon. Les sections ont ensuite été colorées avec un mélange d'Hématoxyline-Eosine (H&E). Le nombre et la surface des métastases pulmonaires ont été détectés à l'aide du système d'analyse d'image informatisé *MorphoExpert* (Exploranova, France).

C. ATX et production locale de LPA

1. Interaction ATX/cellules tumorales dépendante de l'intégrine $\alpha\text{V}\beta 3$

Les intégrines constituent une famille de récepteurs membranaires hétérodimériques impliquées dans la reconnaissance cellules/cellules et cellules/matrice extracellulaire : elles contrôlent ainsi la prolifération, la survie, la migration et l'adhésion cellulaire. Notre laboratoire a montré que l'intégrine $\alpha\text{V}\beta 3$ contrôle la capacité des cellules cancéreuses à former des métastases osseuses ^{52,53}. De plus, l'interaction des cellules métastatiques avec les plaquettes sanguines, qui induit la production de LPA ²³¹, est en partie contrôlée par les intégrines $\alpha\text{V}\beta 3$ tumorales et $\alpha\text{IIb}\beta 3$ plaquettaires ²³¹. Il a par ailleurs été montré que l'ATX se fixe aux plaquettes sanguines selon un mécanisme dépendant de $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ²³³. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'ATX pourrait se fixer à l'intégrine $\alpha\text{V}\beta 3$ tumorale et que cette interaction permettrait la production de LPA au voisinage immédiat des ses récepteurs membranaires, favorisant ainsi la progression des métastases osseuses ostéolytiques.

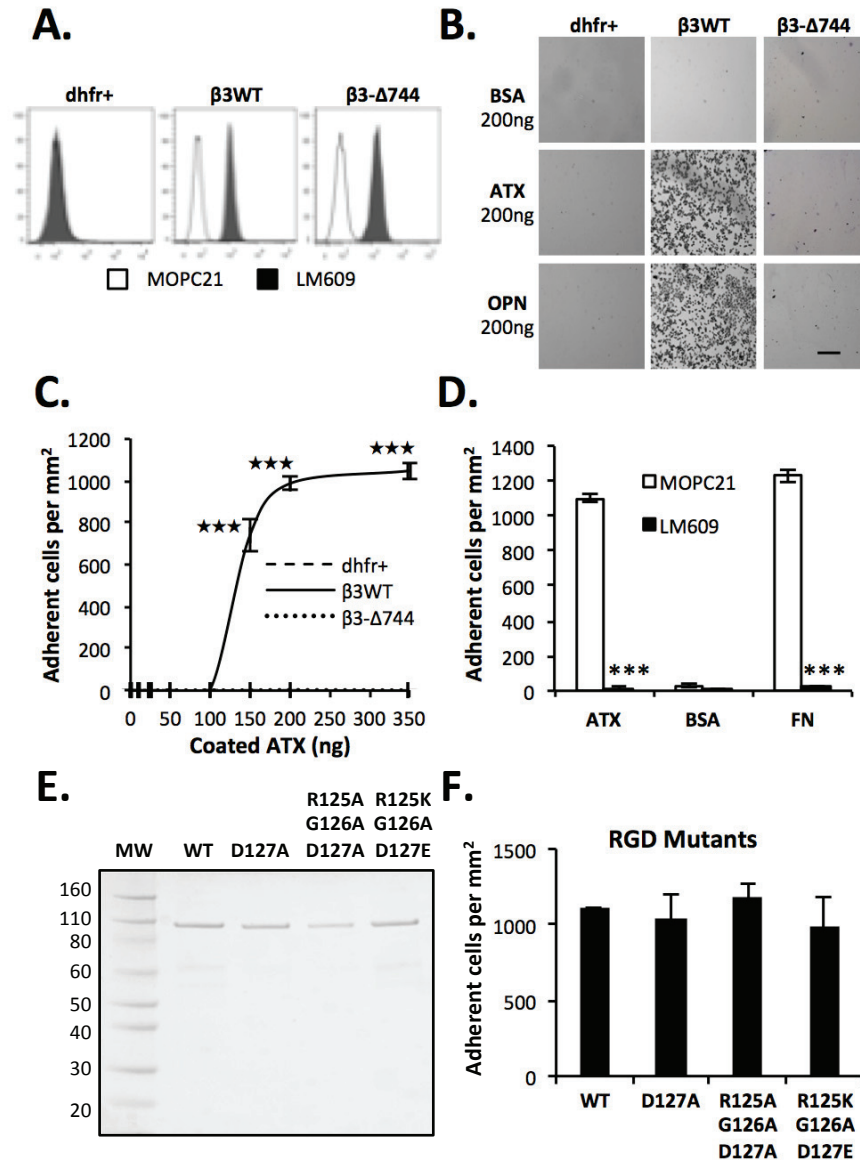


Figure 17. L'intégrine $\alpha V\beta 3$ fonctionnellement active est nécessaire et suffisante à l'adhésion sur l'ATX. A: Détection de l'expression de surface de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ au niveau des cellules parentales CHO-dhfr+ (dhfr+), CHO- $\beta 3$ WT ($\beta 3$ WT) et CHO- $\beta 3$ - $\Delta 744$ ($\beta 3$ - $\Delta 744$). Les cellules ont été immunomarquées avec l'anticorps monoclonal anti- $\alpha V\beta 3$ LM609 (Histogramme noir) ou avec le contrôle isotypique MOPC21 (Histogramme ouvert). B: Adhésion des cellules CHO sur l'ATX en présence de Mn^{2+} (2mM). Observation au microscope optique de l'adhésion sur l'ATX ou l'OPN (Echelle : 200 μ m). C: Adhésion dose-dépendante des cellules CHO sur l'ATX. Des concentrations croissantes d'ATX ont été déposées, puis fixées. Les résultats sont exprimés en moyenne de cellules adhérentes/mm² ($\pm$ S.D) de trois expériences indépendantes réalisées en triplicatas (***, $p < 0.001$; vs. CHO-dhfr+ ; two-way ANOVA). D: Inhibition de l'adhésion sur l'ATX et la Fibronectine des cellules CHO- $\beta 3$ WT via l'anticorps LM609. La BSA a été utilisée comme contrôle négatif d'adhésion. Les cellules ont été pré-incubées 1h en présence de l'anticorps LM609 ou du contrôle isotypique MOPC21 (10 μ g/ml) (***, $p < 0.001$; vs. cellules CHO- $\beta 3$ WT traitées avec l'anticorps MOPC21 ; one-way ANOVA). E: Analyse par SDS-PAGE 7% de la purification de l'ATX sauvage ou ATXs mutées pour le domaine RGD. F: Adhésion des cellules CHO- $\beta 3$ WT sur les mutants RGD de l'ATX. Les résultats sont exprimés en moyenne de cellules adhérentes/mm² ($\pm$ S.D) de trois expériences indépendantes réalisées en triplicatas. L'analyse statistique via le test one-way ANOVA indique l'absence de significativité.

Nous avons choisi d'utiliser les clones stables, établis à partir des cellules CHO-dhfr+, et transfectés pour surexprimer une forme inactive (CHO- $\beta 3$ - $\Delta 744$) ou active de la sous-

unité humaine $\beta 3$ de l'intégrine ⁵² (CHO- $\beta 3$ WT, **Figure 17A**). Dans une première phase, nous avons comparé la capacité d'adhésion des cellules CHO sur de l'ATX préalablement déposée sur un support plastique, en présence de Mn^{2+} , activateur connu des intégrines. L'ATX supporte l'adhésion des cellules CHO- $\beta 3$ WT contrairement aux cellules parentales CHO-dhfr+ et aux cellules CHO- $\beta 3$ - $\Delta 744$ (**Figure 17B**). L'adhésion des cellules CHO- $\beta 3$ WT sur l'ATX est croissante, mais devient saturable à partir de 200 ng d'ATX déposée (**Figure 17C**). Cette capacité d'adhésion est toutefois complètement inhibée par le prétraitement des cellules avec l'anticorps bloquant LM609, spécifique de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ (**Figure 17D**). Par ailleurs, la substitution d'un acide aminé ou la mutation complète du domaine RGD (**Figure 17E**) n'affecte pas la capacité d'adhésion des cellules CHO- $\beta 3$ WT (**Figure 17F**). Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans les études menées par le groupe de S. Smyth, où la fixation de l'ATX à la sous unité $\beta 3$ est dépendante des acides aminés E109 et H117 présents dans le domaine SMB2 ¹²⁷.

Toutefois, l'ATX est une glycoprotéine sécrétée dans le milieu extracellulaire et sa fonction en tant que protéine matricielle n'a pas de réalité fonctionnelle ²³². Afin de valider l'interaction entre ATX et $\alpha V\beta 3$ en condition plus physiologique, nous avons effectué une co-immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps LM609, des lysats issus des cellules CHO-dhfr+/ATX et CHO- $\beta 3$ WT/ATX, transfectées pour exprimer *de novo* l'ATX. L'immunoprécipitation d' $\alpha V\beta 3$ permet la co-immunoprécipitation de l'ATX à partir des extraits protéiques des cellules CHO- $\beta 3$ WT/ATX, ce qui n'est pas le cas au niveau des cellules CHO-dhfr+/ATX où l'expression en $\alpha V\beta 3$ est nulle (**Figure 18A**). De plus, la capacité d'adhésion des cellules CHO- $\beta 3$ WT à adhérer sur l'ATX fixée est altérée lorsque les cellules sont pré-incubées avec des concentrations croissantes en ATX soluble (**Figure 18B**). De même, lorsque les cellules CHO- $\beta 3$ WT sont pré-incubées avec le mutant inactif pour son activité lysoPLD ATX/T209A, on constate une diminution de l'adhésion cellulaire sur l'ATX déposée (**Figure 18C**). Ces résultats indiquent donc que l'ATX sauvage ¹¹⁸ et mutée (ATX/T209A) entrent en compétition avec l'ATX déposée pour la fixation à l'intégrine $\alpha V\beta 3$.

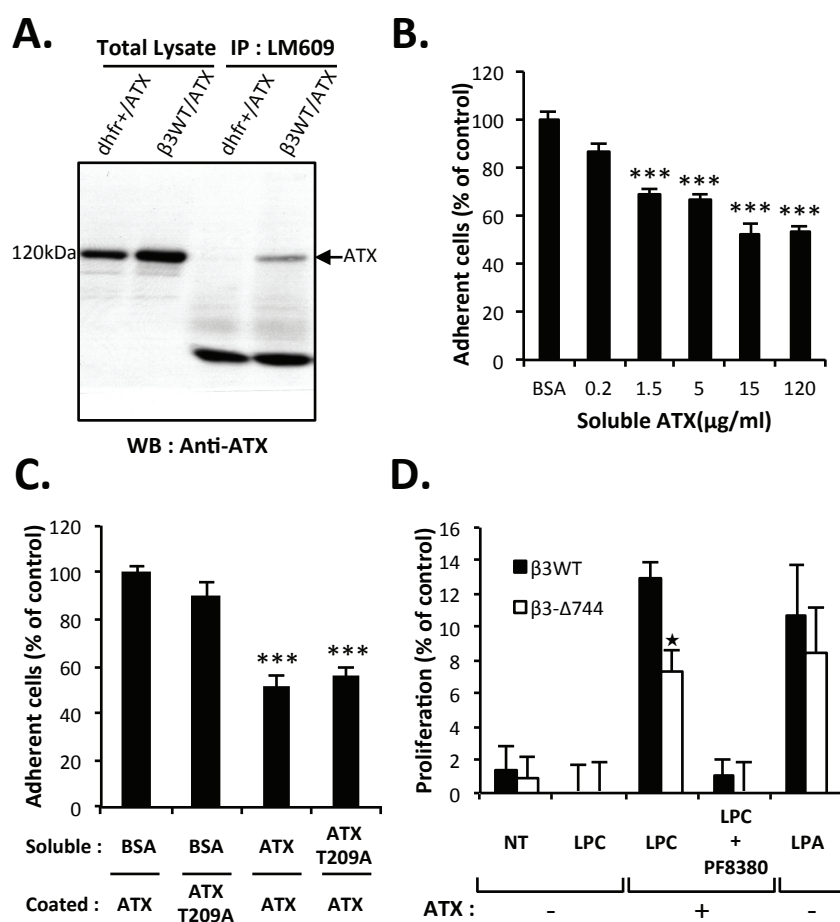


Figure 18. L'intégrine $\alpha V\beta 3$ fonctionnellement active permet la fixation de l'ATX en solution. A: Co-immunoprécipitation de l'ATX et de l'intégrine $\alpha V\beta 3$. Les lysats cellulaires isolés à partir des clones stables exprimant l'ATX, CHO-dhfr+/ATX (dhfr+/ATX) et CHO- $\beta 3$ WT/ATX ($\beta 3$ WT/ATX), ont été incubés en présence de l'anticorps LM609. L'immuno-détection de l'ATX a été réalisé avec l'anticorps anti-lysoPLD. B: L'ATX soluble inhibe l'adhésion des cellules sur l'ATX fixée. Les cellules CHO- $\beta 3$ WT ont été pré-incubées 1h en présence de concentration croissante en ATX soluble (axe x) avant le test d'adhésion. C: Inhibition de l'adhésion des cellules CHO- $\beta 3$ WT en présence d'ATX soluble fonctionnellement active ou inactive l'ATX/T209A. Les cellules CHO- $\beta 3$ WT ont été pré-incubées 1h avec de l'ATX soluble, de l'ATX/T209A ou de la BSA comme contrôle (15μg/ml). Les résultats représentent le pourcentage de cellules adhérentes ($\pm$ S.E.M) de deux expériences indépendantes réalisées en triplicatas (***, $p < 0.001$; vs. cellules CHO- $\beta 3$ WT traitées avec de la BSA ; one-way ANOVA). D: Prolifération des cellules CHO- $\beta 3$ WT ($\beta 3$ WT) et CHO- $\beta 3$ - $\Delta 744$ ($\beta 3$ - $\Delta 744$) induite par l'ATX (3nM) et le LPC (1μM) en présence ou en absence de PF-8380 (5nM), ou induite par le LPA (1μM), dans du milieu Ham's F12-K dépourvu de sérum. La prolifération a été évaluée par analyse densitométrique, après fixation et coloration des cellules avec du cristal violet. Les résultats sont exprimés en pourcentage de prolifération vis-à-vis du contrôle (CHO- $\beta 3$ WT+LPC) ($\pm$ S.D) de deux expériences indépendantes réalisées en six réplicas (*, $p < 0.05$; vs. CHO- $\beta 3$ WT ; two-way ANOVA).

Par ailleurs, notre laboratoire a montré que les cellules CHO expriment fortement le récepteur LPA₁ et sont sensibles au LPA²³¹. Afin d'observer l'importance fonctionnelle du maintien de l'ATX à la surface des cellules tumorales via $\alpha V\beta 3$, nous avons comparé la prolifération induite par la présence d'ATX et de LPC, des cellules CHO- $\beta 3$ WT vis-à-vis des cellules CHO- $\beta 3$ - $\Delta 744$. Leur prolifération est similaire lorsqu'elle est induite par le LPA, mais inexistante en présence de LPC seul, ce qui montre que les deux lignées

cellulaires ont les mêmes capacités prolifératives (**Figure 18D**). On constate également une augmentation de la prolifération des deux lignées cellulaires en présence d'ATX et de LPC, mais les cellules CHO- $\beta 3$ WT ont une capacité plus élevée à proliférer que les cellules CHO- $\beta 3$ - $\Delta 744$ (**Figure 18D**). Ces résultats indiquent que l'intégrine $\alpha V\beta 3$ fonctionnellement active confère un avantage sélectif pour répondre à la stimulation par l'ATX et le LPC en solution.

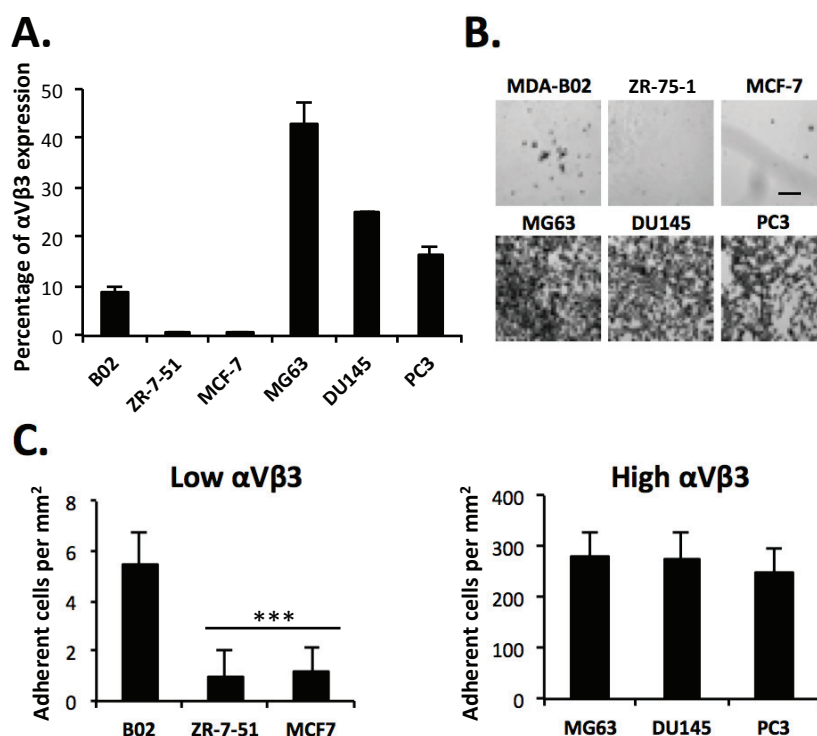


Figure 19. La fixation à l'ATX est liée au niveau d'expression en intégrine $\alpha V\beta 3$. A: Détection de l'expression de surface de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ au niveau des cellules d'ostéosarcomes (MG63), de cancer du sein (MDA-B02, ZR-7-51, MCF7) et de cancer de la prostate (DU145, PC3). Les cellules ont été immunomarquées avec l'anticorps monoclonal anti- $\alpha V\beta 3$ LM609. Les résultats sont exprimés en moyenne de cellules exprimant $\alpha V\beta 3$ et issus de trois expériences indépendantes. ($\pm$ S.D) B: Adhésion des cellules tumorales sur l'ATX en présence de Mn^{2+} (2mM). Observation au microscope optique de l'adhésion sur l'ATX (Echelle : 200 μ m). C: Les résultats sont exprimés en moyenne de cellules adhérentes/mm² ($\pm$ S.D) de trois expériences indépendantes réalisées en triplicatas (***, $p < 0.001$; vs. adhésion des MDA-B02 ; one-way ANOVA).

Les cellules CHO constituent toutefois un modèle cellulaire artificiel car elles n'expriment pas naturellement l'intégrine $\alpha V\beta 3$. Nous avons ainsi utilisé les lignées humaines de carcinomes mammaires (MDA-B02, ZR-7-51 et MCF7), de cancer de la prostate (DU145, PC3) et d'ostéosarcomes (MG63) afin d'analyser la capacité des cellules tumorales à interagir avec l'ATX. Les niveaux d'expression en $\alpha V\beta 3$ ont tout d'abord été quantifiés par cytométrie de flux (**Figure 19A**). Les cellules exprimant fortement cette intégrine (MG63, DU145 et PC3) ont une capacité plus forte à adhérer

sur l'ATX que les cellules exprimant plus faiblement $\alpha V\beta 3$ (**Figure 19B-C**). On constate également que parmi les cellules de cancer du sein, les cellules MDA-B02, où l'expression en intégrine $\alpha V\beta 3$ est la plus forte, ont la capacité la plus élevée à adhérer à l'ATX (**Figure 19B-C**).

Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que l'ATX interagit physiquement avec l'intégrine $\alpha V\beta 3$ exprimée par les cellules tumorales. Cette liaison nécessite toutefois que l'intégrine soit structurellement fonctionnelle. En accord avec les travaux de l'équipe de S. Smyth, l'ATX pourrait ainsi interagir à la fois avec l'intégrine $\alpha V\beta 3$ tumorale et $\alpha IIb\beta 3$ plaquettaire dans le contexte des métastases osseuses. Le manuscrit présentant ces travaux est actuellement sous presse dans la revue Blood.

2. Implication de Syndecan-4 dans le maintien à la membrane de l'ATX

Nous avons montré que l'ATX se fixe de façon directe à la surface des cellules tumorales selon un mécanisme dépendant de l'intégrine $\alpha V\beta 3$. Toutefois, le traitement *in vitro* de cellules tumorales avec l'anticorps bloquant LM609 spécifique de $\alpha V\beta 3$, ne bloque que partiellement l'interaction entre l'ATX et les cellules tumorales, alors que ce même traitement inhibe complètement l'adhésion des cellules artificielles CHO- $\beta 3$ WT (**Figure 20A**). Ces résultats laissent suggérer que la fixation des cellules tumorales à l'ATX fait intervenir d'autres partenaires. De récentes études suggèrent également que l'ATX pourrait potentiellement interagir avec des Heparane-sulfate proteoglycannes (HSPGs)²⁵⁶, composants essentiels des membranes cellulaires et de la matrice extracellulaire. En surface cellulaire, les deux principales familles d'HSPGs sont les syndecans (SDC), qui sont des protéines transmembranaires, et les glypicans (GPC), où la chaîne de GAG est attachée via une ancre GPI²⁵⁷. Afin de déterminer quel(s) HSPG(s) est (sont) impliqué(s) dans la fixation de l'ATX à la surface des cellules, nous avons procédé à un screening par PCR quantitative des différents HSPGs à la surface des lignées cellulaires cancéreuses qui adhèrent le mieux sur l'ATX : les lignées de cancer de la prostate (DU145 et PC3) et les cellules d'ostéosarcome (MG63) expriment principalement les ARNm codant pour SDC1, SDC4, GPC1 et GPC4 (**Figure 20B**).

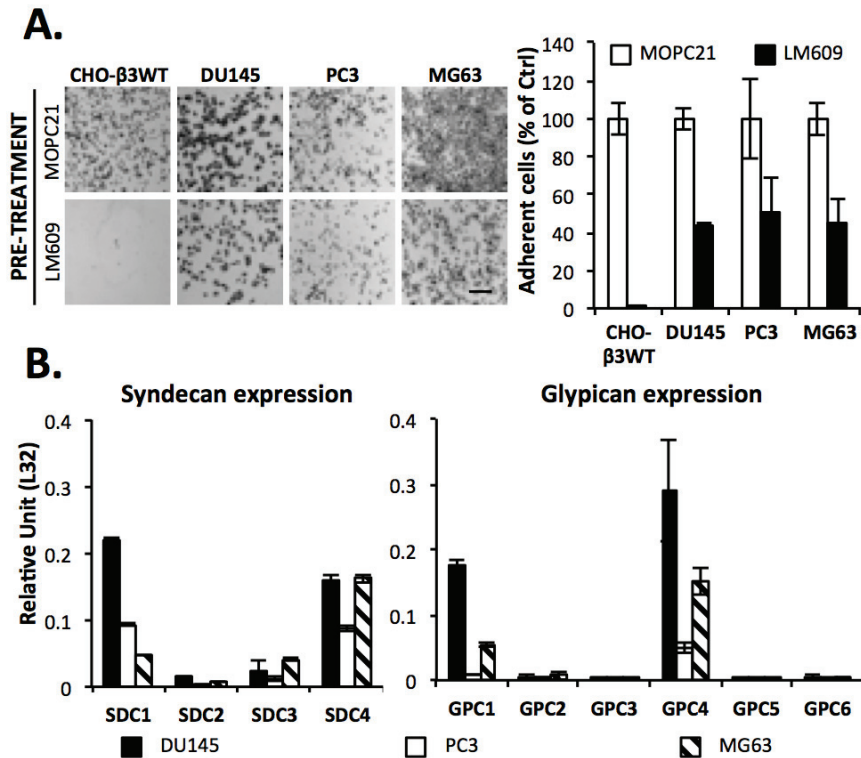


Figure 20. La fixation des cellules tumorales à l'ATX n'est pas dépendante que de $\alpha V\beta 3$. A: Inhibition de l'adhésion des cellules tumorales sur l'ATX via l'anticorps LM609. La BSA a été utilisée comme contrôle négatif d'adhésion. Les cellules ont été pré-incubées 1h en présence de l'anticorps LM609 ou du contrôle isotypique MOPC21 (10 μ g/ml). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules adhérentes ($\pm$ S.D) de trois expériences indépendantes réalisées en triplicatas B: Analyse par PCR en temps réel de l'expression des ARNm codant pour les différents HSPGs au sein de lignées de cancer de la prostate (DU145, PC3) et d'ostéosarcome (MG63). Les valeurs ont été normalisées par rapport au gène de ménage L32. Les données représentent la moyenne ($\pm$ S.D) de deux expériences indépendantes réalisées en triplicatas.

Nous avons alors décidé d'invalider l'expression de ces récepteurs dans la lignée cellulaire d'ostéosarcome MG63, par une technique d'ARN interférence (siRNA) (**Figure 21A**), puis de tester la capacité de ces cellules recombinantes à adhérer sur l'ATX. Lorsqu'on invalide l'expression de SDC4, contrairement aux autres HSPGs, on constate une diminution de 85% de l'adhésion des cellules sur l'ATX (**Figure 21B**). De même, le prétraitement des cellules MG63 avec des concentrations croissantes en anticorps bloquant anti-SDC4 (clone 5G9) conduit à une inhibition de près de 50% de l'adhésion cellulaire sur l'ATX (à partir de 0.1 μ g/ml d'anticorps) (**Figure 21C**). Toutefois, l'ATX étant une glycoprotéine sécrétée et afin d'observer l'importance de son maintien en surface via SDC4, nous avons comparé la prolifération des cellules MG63 induite par l'ATX et le LPC, en présence ou en absence de l'anticorps bloquant anti-SDC4. Ces cellules expriment majoritairement le récepteur LPA₁ (**Figure 21D**) et sont fortement sensibles à une stimulation par le LPA (**Figure 21E**).

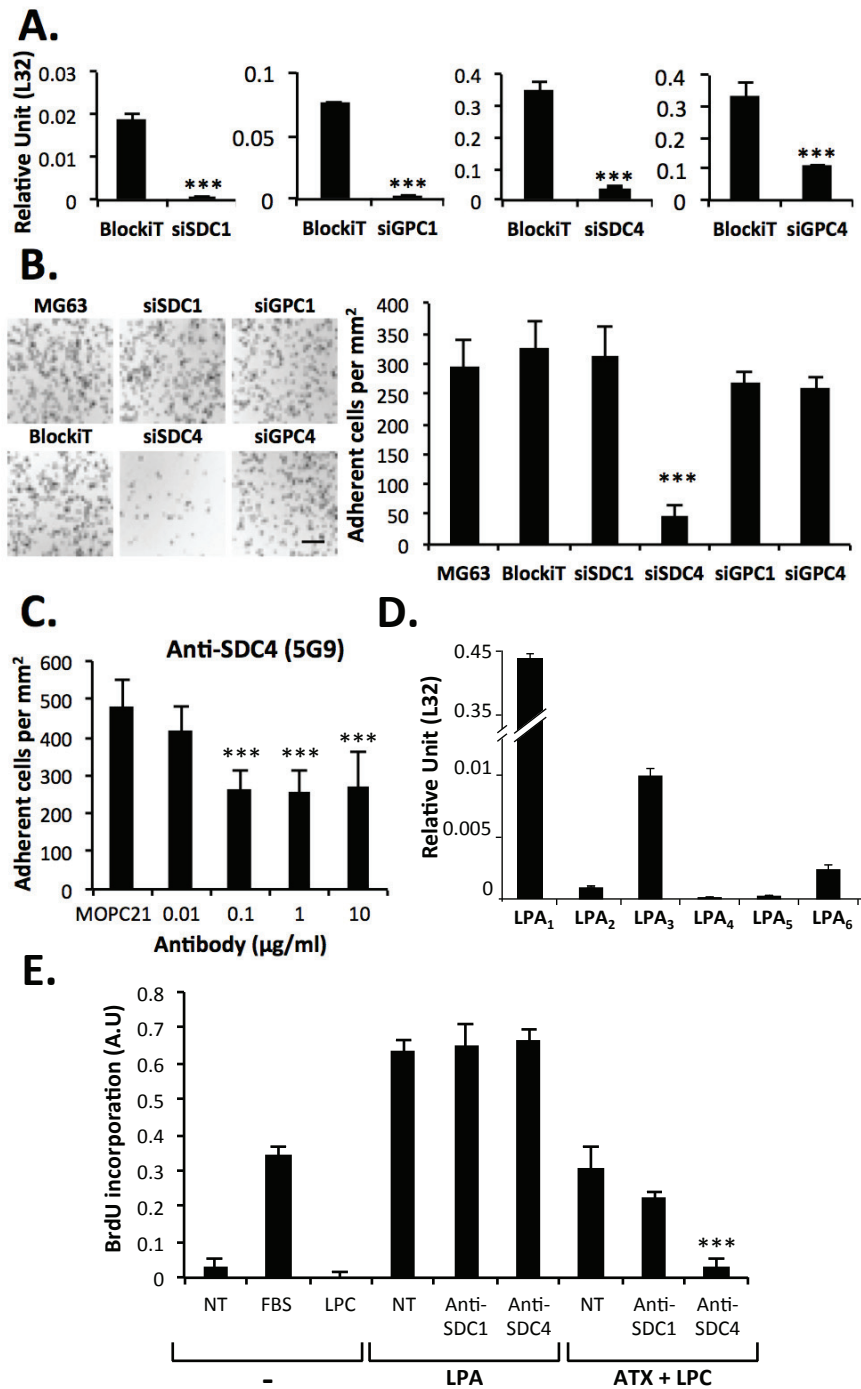


Figure 21. Syndecan-4 permet le maintien de l'ATX à la surface des cellules tumorales. A: Invalidation par ARN interférence (siRNA) de l'expression des ARNm codant pour SDC1, SDC4, GPC1 et GPC4. BlockiT correspond au vecteur contrôle de transfection. Analyse par PCR en temps réel de l'expression des ARNm. Les valeurs ont été normalisées par rapport au gène de ménage L32 et représentent la moyenne ($\pm$ S.D) de deux expériences indépendantes réalisées en triplicatas (***, $p < 0.001$; vs. BlockiT; one-way ANOVA) B: Adhésion des cellules tumorales sur l'ATX. Observation au microscope optique (Echelle : 200μm). C: Inhibition de l'adhésion des cellules MG63 sur l'ATX. Les cellules ont été pré-incubées 1h avec des concentrations croissantes en anticorps anti-SDC4 (clone 5G9). Les résultats sont exprimés en moyenne de cellules adhérentes/mm² ($\pm$ S.D) de trois expériences indépendantes réalisées en triplicatas (***, $p < 0.001$; vs. MOPC21; one-way ANOVA) D: Analyse par PCR en temps réel de l'expression des ARNm codant pour les récepteurs du LPA. Les valeurs ont été normalisées par rapport au gène de ménage L32. E: Prolifération suivie par incorporation au BrdU et induite par l'ATX (3nM)+LPC (1μM) ou par le LPA (1μM), en présence ou en absence de l'anticorps bloquant anti-SDC4 (clone 5G9). L'anticorps anti-SDC1 (clone DL-

101) est utilisé comme contrôle négatif. Les résultats ont été normalisés par rapport aux cellules MG63 non traitées (NT) et représentent la moyenne ($\pm$ S.E.M) de deux expériences réalisées en 6 replicats. (***, $p < 0.001$; vs NT+ATX+LPC; one-way ANOVA).

Les cellules MG63 sont également capables de répondre à la présence simultanée d'ATX et de LPC (**Figure 21E**). Par ailleurs, le traitement avec l'anticorps contrôle anti-SDC1 n'affecte ni la prolifération induite par le LPA, ni celle en présence d'ATX et de LPC. Le traitement des cellules avec un anticorps dirigé contre SDC4 n'a pas non plus d'effet sur la prolifération induite par le LPA, mais il inhibe de près de 80% la prolifération cellulaire induite par l'ATX et le LPC (**Figure 21E**). Ces résultats indiquent que SDC4 confère un avantage sélectif pour répondre à la stimulation par l'ATX et le LPC.

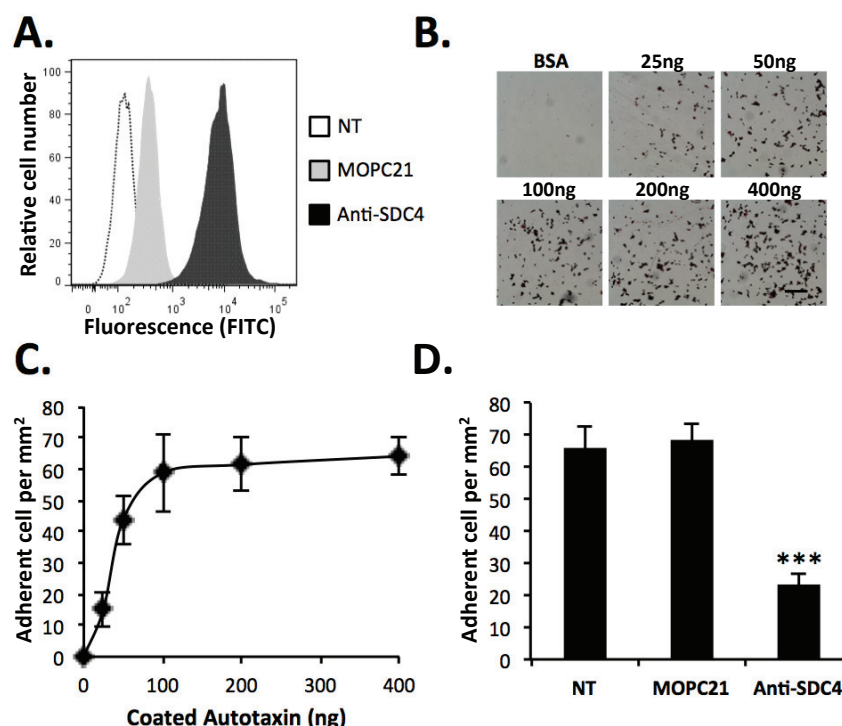


Figure 22. Syndecan-4 est impliqué dans l'adhésion des cellules 4T1 sur l'ATX. A: Détection de l'expression de surface de SDC4 au niveau des cellules 4T1. Les cellules ont été immunomarquées avec l'anticorps monoclonal anti-SDC4 KY/8.2 (Histogramme noir) ou avec le contrôle isotypique MOPC21 (Histogramme gris) ou sans anticorps (Histogramme ouvert). Adhésion dose-dépendante des cellules 4T1 sur l'ATX. Observation au microscope optique de l'adhésion sur différentes concentrations d'ATX ou la BSA (400ng) (Echelle : 200 μ m). C: Des concentrations croissantes d'ATX ont été déposées, puis fixées. Les résultats sont exprimés en moyenne de cellules adhérentes/ mm^2 ($\pm$ S.E.M) de trois expériences indépendantes réalisées en triplicatas. D: Inhibition de l'adhésion des cellules 4T1 sur l'ATX. Les cellules ont été pré-incubées 1h avec des concentrations croissantes en anticorps anti-SDC4 (clone KY/8.2). Les résultats sont exprimés en moyenne de cellules adhérentes/ mm^2 ($\pm$ S.E/M) de trois expériences indépendantes réalisées en triplicatas (***, $p < 0.001$; vs. MOPC21; one-way ANOVA)

Afin de nous replacer dans le contexte des métastases osseuses, nous avons vérifié l'expression de SDC4 et la capacité d'adhésion sur l'ATX des cellules 4T1, notre modèle murin de métastases osseuses. L'analyse par cytométrie de flux montre qu'elles

expriment fortement SDC4 (**Figure 22A**) et on constate qu'elles adhèrent de façon dose-dépendante à l'ATX (**Figure 22B-C**). Le prétraitement des cellules avec un anticorps anti-SDC4 (clone KY/8.2) conduit également à une diminution de 60% de l'adhésion sur l'ATX (**Figure 22D**). L'ensemble de ces résultats montre que Syndecan-4 est impliqué dans l'adhésion des cellules 4T1 sur l'ATX.

Nous avons alors décidé de mesurer l'impact fonctionnel de cette interaction *in vivo* dans le modèle 4T1 de dissémination métastatique à l'os. Ces cellules expriment de façon endogène l'ATX et nous avons à notre disposition les cellules 4T1shATX invalidées pour leur expression en ATX ²²³ (**Figure 23A**). Les deux lignées ont été prétraitées séparément avec un anticorps anti-SDC4 ou son contrôle isotypique MOPC21, puis injectées dans l'artère caudale de la queue de souris Balb/C. Sept jours après l'inoculation, les animaux ont été mis à mort, les cellules de moelle osseuse ont été récoltées et mises en culture *in vitro* afin de quantifier les cellules tumorales ayant colonisées la moelle osseuse (TCB) (**Figure 23B**). L'invalidation de l'expression en ATX entraîne une diminution de l'incidence des animaux présentant des TCB (7/10 souris) comparé aux animaux inoculés avec les cellules 4T1 parentales (10/10 souris), mais il réduit surtout de 62% le nombre de TCB dans la moelle osseuse (**Figure 23C**). Par ailleurs, le prétraitement des cellules 4T1 avec l'anticorps anti-SDC4 conduit à une diminution de 58% du nombre de TCB dans la moelle osseuse, comparé au groupe où les cellules ont été prétraitées avec l'anticorps isotypique (**Figure 23D**). Au contraire, le prétraitement des cellules 4T1shATX avec l'anticorps anti-SDC4 n'affecte pas le nombre de TCB dans la moelle osseuse (**Figure 23E**). Ainsi, il semble que l'implication de SDC4 dans le processus de dissémination métastatique est dépendante de l'expression en ATX par les cellules tumorales.

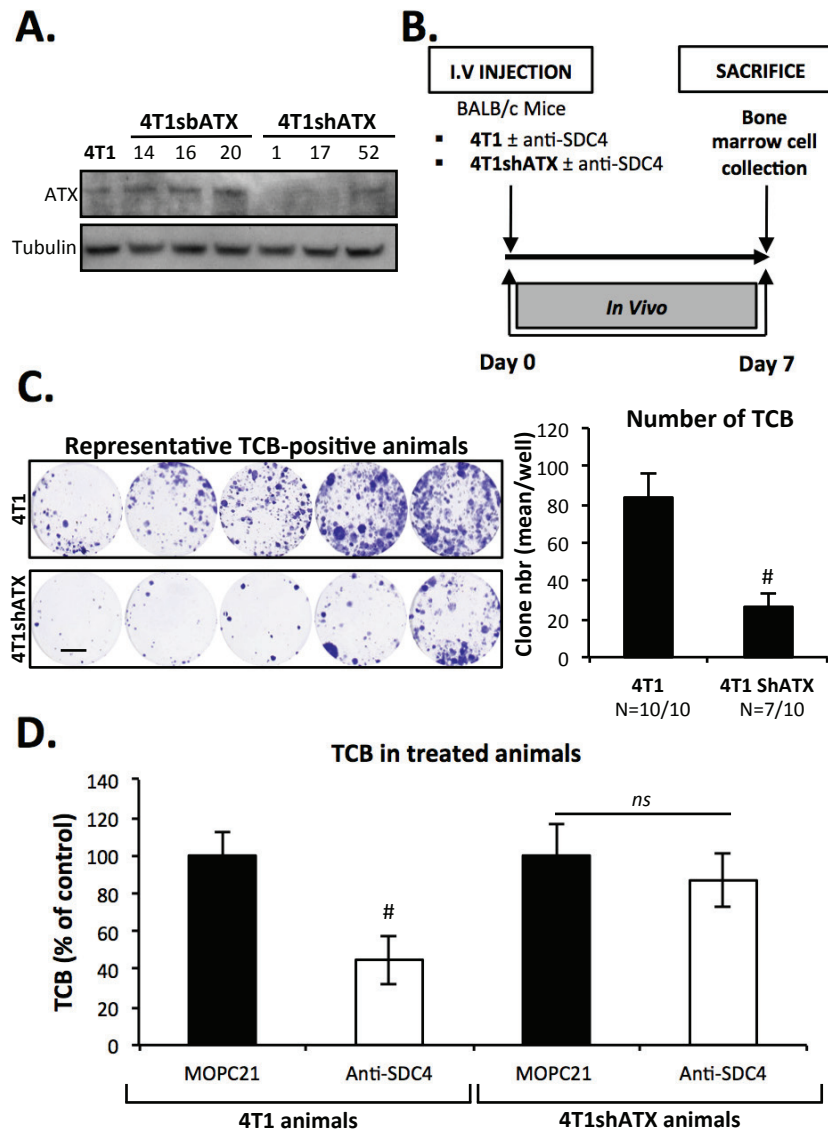


Figure 23. L'implication de SDC4 dans la dissémination métastatique est dépendante de l'expression en ATX des cellules 4T1. A: Expression de l'ATX dans les clones 4T1sbATX et 4T1shATX. L'immunodétection a été réalisée avec l'anticorps anti-LysoPLD. B: Les cellules 4T1 et 4T1shATX ont été prétraitées une heure avec l'anticorps anti-SDC4 (KY/8.2) ou son contrôle isotypique MOPC21 (10µg/ml). Elles ont été injectées dans l'artère caudale de la queue des souris Balb/C. A J7, les animaux ont été mis à mort afin de récupérer les membres postérieurs. C/D/E: Les cellules de la moelle osseuse collectées ont été mises en culture pendant 2 semaines en présence de 6-Thioguanine (1µg/ml). Les colonies correspondant aux cellules tumorales ayant colonisé l'os (Tumor cells that colonized the bone ; TCB) ont été fixées et colorées dans une solution contenant 20% de méthanol et 0.5% de cristal violet (Echelle :100µm). Les colonies TCB ont été comptées et les résultats sont exprimés en moyenne de TCB ($\pm$ S.E.M) (#, $p < 0,05$; Mann-Wihtney).

Enfin, nous avons mesuré l'impact fonctionnel de cette interaction dans la formation des métastases osseuses. Comme précédemment, les cellules 4T1 et 4T1shATX ont été pré-incubées avec l'anticorps anti-SDC4 ou son contrôle isotypique, puis injectées dans l'artère caudale de la queue de souris Balb/C. Quatorze jours après l'inoculation, les animaux ont été radiographiés, puis mis à mort afin de récupérer les membres postérieurs pour différentes analyses immunohistochimiques (**Figure 24A**).

En accord avec les travaux du laboratoire sur le rôle de l'ATX tumorale dans la formation des métastases osseuses ²²³, l'invalidation de l'expression de l'ATX conduit à une diminution de 50% de l'étendue des plages d'ostéolyses (**Figure 24B**). Le prétraitement des cellules avec l'anticorps dirigé contre SDC4 entraîne une diminution de 25% de la surface des plages d'ostéolyse dans le groupe inoculé avec les cellules 4T1, mais n'affecte pas le groupe 4T1shATX (**Figure 24B**).

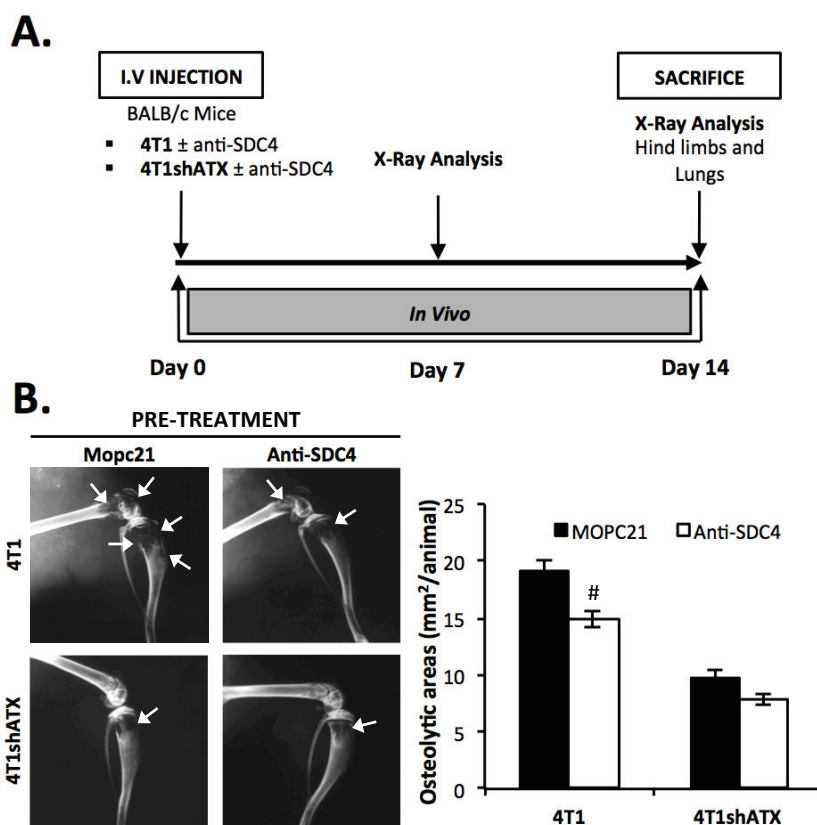


Figure 24. L'implication de SDC4 dans la progression des métastases osseuses est dépendante de l'expression en ATX des cellules 4T1. A: Les cellules 4T1 et 4T1shATX ont été prétraitées une heure avec l'anticorps anti-SDC4 (KY/8.2) ou son contrôle isotypique MOPC21 (10µg/ml). Elles ont été injectées dans l'artère caudale de la queue des souris Balb/C. A J7, les animaux ont été radiographiés afin de contrôler la formation des métastases osseuses. A J14 ils ont été radiographiés, puis mis à mort afin de récupérer membres postérieurs et poumons. B: Radiographies représentatives des membres postérieurs des animaux métastatiques. Quantification de la surface des plages d'ostéolyse. Les résultats sont exprimées en moyenne ($\pm$ S.E.M) (#, $p < 0,05$; Mann-Wihtney).

L'ensemble de ces résultats conforte l'hypothèse d'une interaction entre ATX et SDC4, qui serait impliquée dans le processus de dissémination des cellules tumorales et dans la progression des métastases osseuses ostéolytiques. Cependant l'interaction physique directe entre ATX et SDC4 reste toutefois à démontrer.

D. ATX circulante, plaquettes et métastases osseuses

Les précédents travaux du laboratoire ont montré que l'ATX produite par les cellules tumorales joue un rôle majeur dans la dissémination et la progression des métastases osseuses. Cependant, l'ATX est présente dans la circulation sanguine en conditions physiologiques et des études menées chez les souris hétérozygotes *Enpp2^{+/-}* ont démontré qu'elle est responsable des concentrations élevées en LPA dans la circulation¹⁴¹. Les fonctions physiopathologiques de l'ATX et du LPA circulants sont toutefois encore inconnues. C'est pourquoi, le laboratoire a établi depuis plusieurs années une collaboration avec le Dr Gabor Tygyi (University of Tennessee, Memphis, USA). Dans ce cadre, nous avons eu à disposition un inhibiteur de l'activité lysoPLD le composé BMP22²⁴⁹. Sur la base d'expériences *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de formation de métastases osseuses utilisant des cellules humaines de cancer du sein (MDA-MB-231 et MDA-MB-231/B02) qui n'expriment pas l'ATX de façon endogène, notre étude vise à caractériser le rôle de l'ATX circulante non tumorale (NT-ATX) dans le contexte des métastases osseuses.

1. Les cellules tumorales induisent l'agrégation plaquettaire et la libération d'ATX

Notre laboratoire a montré par le passé que l'agrégation plaquettaire induite par les cellules tumorales est à l'origine de la production de LPA²³¹, mais son mécanisme de production reste inconnu. Ainsi, nous avons dans un premier temps tenté de vérifier si les plaquettes sanguines pouvaient être une source d'ATX. Les analyses par PCR quantitative ne nous ayant pas permis de détecter l'expression d'ARNm codant pour l'ATX (Données non présentées), nous avons effectué des recherches dans la base de données publiques Gene Expression Omnibus. Ni les progéniteurs mégacaryocytaires, ni les mégacaryocytes matures isolés et cultivés *in vitro* n'expriment les ARNm codant pour l'ATX ou pour des protéines plasmatiques non-spécifiques des plaquettes, comme la chaîne- α du fibrinogène et les chaînes lourdes d'immunoglobulines (**Figure 28A**). La qualité des ARNs est validée par la détection des ARNm codant pour des facteurs mégacaryocytaires tels que GATA1, NFE2 ou pour les sous unités α IIb, α V et β 3 des intégrines (**Figure 28A**). Toutefois, les plaquettes sont connues pour internaliser et stocker des protéines plasmatiques, et ce de façon indépendante de leur état d'activation²⁵⁸. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'ATX circulante pouvait être captée par les

plaquettes sanguines, puis libérée lors de leur agrégation induite par leur interaction avec des agonistes classiques (Thrombine, collagène de type I) ou par les cellules tumorales.

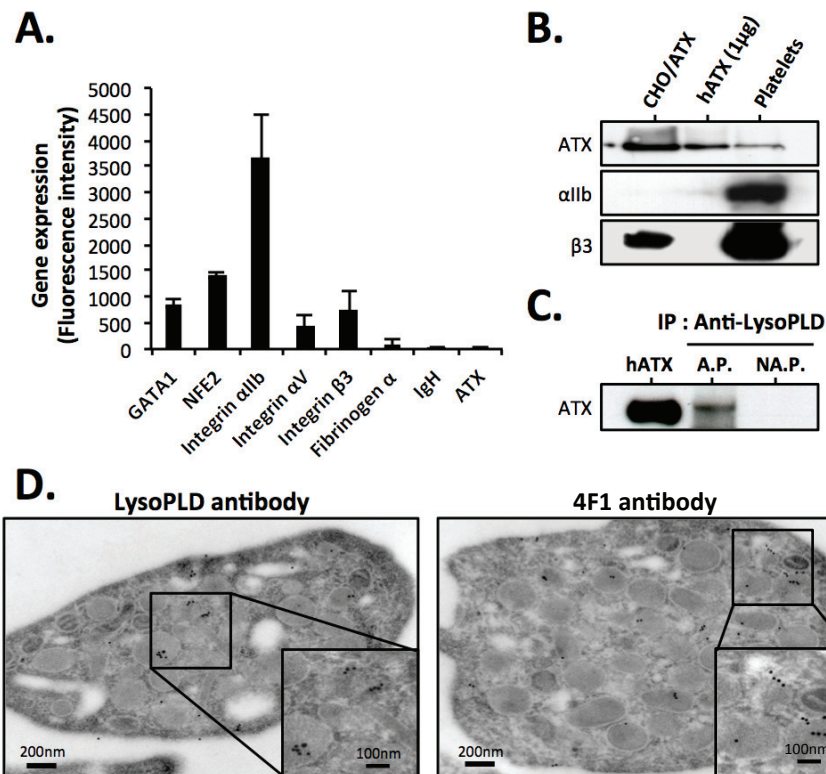


Figure 25. L'autotaxine est stockée dans les plaquettes sanguines humaines. A: Gènes exprimés par les mégakaryocytes. Moyenne d'intensité de fluorescence émise par la puce affimetrix murine M0E430A et calculée à partir des bases de données publiées GSM152271 et GCM152272, pour les gènes codant GATA1, NFE2, les sous unités αIIb, αV et β3, la chaîne-α du fibrinogène, les chaînes lourdes des immunoglobulines ¹³³ et l'autotaxine (ATX). B: Immunodétection de l'ATX dans le lysat de plaquettes sanguines inactives, via l'anticorps anti-LysoPLD. Le lysat des cellules CHO-dhfr+/ATX et l'autotaxine recombinante humaine (hATX) ont été utilisés comme contrôle. Les sous unités αIIb et β3 ont été immunodétectés avec des anticorps spécifiques. C: Immunoprécipitation de l'ATX. 6 surnageants isolés à partir de plaquettes agrégées (A.P.) ou à partir de plaquettes non-agrégées (N.A.P) ont été incubés avec l'anticorps anti-LysoPLD. L'ATX a été détectée par western-blotting avec l'anticorps anti-LysoPLD. D: Images de plaquettes sanguines inactives issues de microscopie électronique à transmission. Les grilles ont été incubées avec l'anticorps polyclonal anti-lysoPLD ou avec l'anticorps monoclonal 4F1. Des particules d'or couplées aux anticorps secondaires spécifiques ont permis la détection *in situ* de l'ATX.

Au regard de la **figure 25B**, l'ATX est immuno-délectable dans le lysat protéique de plaquettes humaines lavées non activées. On la détecte également par immunoprécipitation des produits de sécrétion issus d'agrégation plaquettaire induite par le collagène de type-1, mais pas dans les surnageants de plaquettes non activées (**Figure 25C**). Enfin, l'analyse par microscopie électronique avec des anticorps polyclonaux et monoclonaux couplés à des billes d'or, permet de localiser l'ATX dans les granules-α et à un degré moindre dans le système canaliculaire des plaquettes sanguines

humaines (**Figure 25D**). L'ATX est donc bien présente dans les plaquettes sanguines, et elle est mobilisable lors de l'agrégation plaquettaire.

Par ailleurs, le laboratoire a montré que l'agrégation, en condition active, des plaquettes sanguines humaines induite par les cellules de cancer du sein conduit à la formation de LPA ²³¹. De récentes études ont également mis en avant le rôle de l'interaction entre ATX et intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ plaquettaire dans la formation du clou plaquettaire et la production locale de LPA ^{127,172}. Nous avons nous-même montré que le maintien de l'ATX à la membrane, selon un mécanisme dépendant de l'intégrine $\alpha\text{V}\beta 3$ tumorale, favorisait la prolifération induite par l'ATX et le LPC. Dans cette étude, nous montrons que la co-culture de plaquettes sanguines humaines avec deux lignées de cellules de cancer du sein, induit à 2h une augmentation de la concentration en LPA dans le milieu (**Figure 26A**). On constate également une augmentation de la prolifération des cellules MDA-B02 au bout de 12 et 24h, par rapport aux cellules cultivées sans plaquettes (**Figure 26B**). Afin d'évaluer le rôle de l'activation des intégrines dans la prolifération des cellules tumorales induite par les plaquettes et dans l'agrégation plaquettaire, nous avons décidé d'utiliser des antagonistes spécifiques. Contrairement au peptide RGES, le peptide RGDS bloque l'agrégation plaquettaire induite par le collagène ou par les cellules tumorales (**Figure 26C**). Le traitement au peptide RGDS et au ReoPro[®] bloque également la prolifération cellulaire induite par les plaquettes sanguines, ce qui laisse penser que l'agrégation plaquettaire et l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ sont nécessaires à ce processus (**Figure 26D**). L'inhibition partielle de la prolifération tumorale en présence d'Apyrase et de Clopidogrel, respectivement inhibiteurs des voies d'activation des plaquettes dépendantes de l'ADP ou de son récepteur P2Y₁₂, confirme cette hypothèse (**Figure 26D**). La prolifération est également diminuée de 80% en présence de Ki16425, antagoniste des récepteurs LPA₁ et LPA₃, ce qui indique que la prolifération induite par les plaquettes sanguines en condition passive est essentiellement médiée par le LPA (**Figure 26D**).

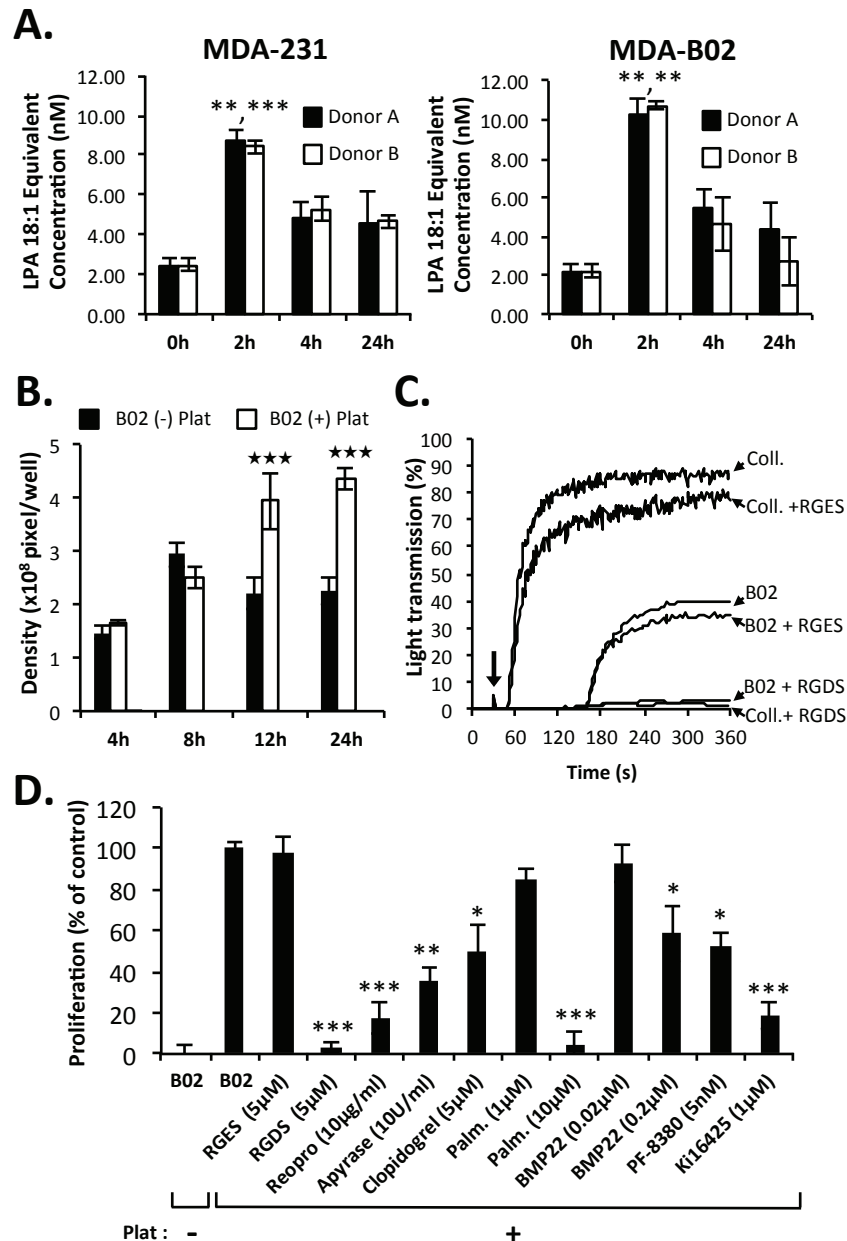


Figure 26. Les cellules tumorales favorisent la libération d'ATX par les plaquettes et la formation de LPA. A: La co-culture passive de cellules de cancer du sein et des plaquettes favorise la production de LPA. Les cellules MDA-231 et MDA-B02 ont été ensemencées et cultivées pendant 24 en présence de plaquettes humaines prélevées chez deux différents donneurs. Les résultats sont exprimés en moyenne de fluorescence, normalisée par rapport au pourcentage de réponse au LPA 18:1 (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; vs. t_0 ; one-way ANOVA). B: Prolifération des cellules MDA-B02 en présence ou en absence de plaquettes. La prolifération a été évaluée par densitométrie. Les résultats sont exprimés en moyenne de densité ($\pm$ S.D) de deux expériences indépendantes réalisées en six réplicats (***, $p < 0.001$; vs. MDA-B02 (-) plaquettes; two way ANOVA). C: Agrégation plaquettaire induite par l'ajout de collagène (Coll.; 10μg/ml) ou des cellules MDA-B02 (10^6), au temps indiqué par la flèche. Les peptides RGDS et RGES (10μM) ont été ajoutés avant la stimulation. D: Effet des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire (RGDS, ReoPro, Apyrase, Clopidogrel), des phospholipase A1/2 (palmostatine-B), de l'activité lysoPLD (BMP22, PF-8380) et de l'antagoniste de LPA₁ et LPA₃ (Ki16425) sur la prolifération induite par les plaquettes. Les cellules MDA-B02 ont été incubées 12h en présence ou en absence de plaquettes. Les résultats sont exprimés en moyenne de densité ($\pm$ S.D) de deux expériences indépendantes réalisées en six réplicats (*, $p < 0.5$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; vs. MDA-B02 (+) plaquettes; one way ANOVA).

Afin d'identifier les voies impliquées dans la production du LPA, l'inhibiteur non spécifique de PLA1 et PLA2 (palmostatine-B) et deux inhibiteurs de l'ATX (BMP22 et PF-8380) ont été utilisés. Alors que la palmostatine-B bloque complètement la prolifération des cellules MDA-B02, les traitements au PF-8380 et au BMP22 entraînent respectivement une diminution de 41 et 48% de la prolifération (**Figure-26D**).

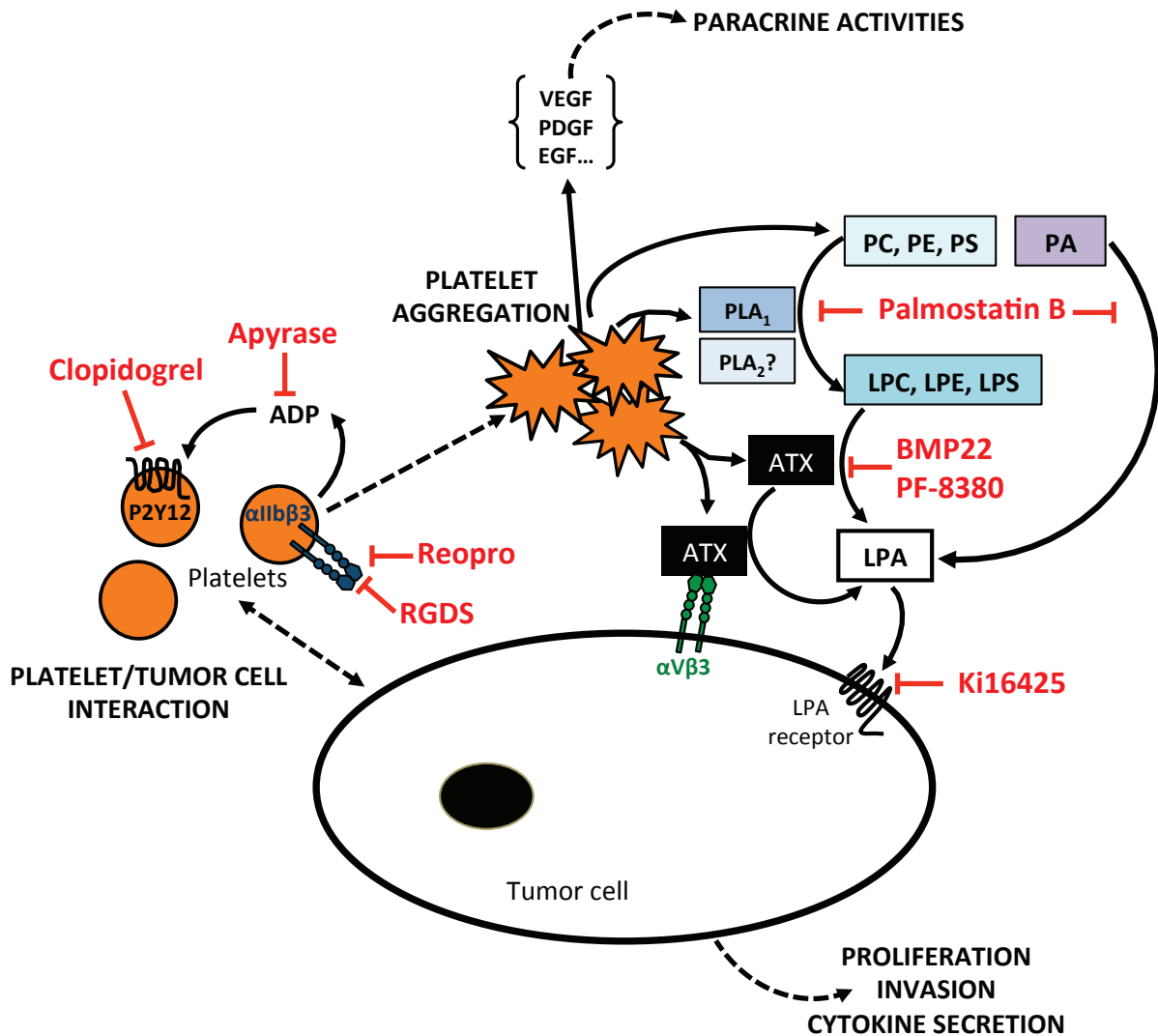


Figure 27. Mécanismes de production du LPA suite à l'interaction entre plaquettes sanguines et cellules tumorales.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'interaction entre les plaquettes sanguines et les cellules tumorales favorise la production de LPA. Sa synthèse se déroule en deux étapes majeures : les cellules tumorales stimulent dans un premier temps l'activation et l'agrégation des plaquettes, processus qui peut être bloqué soit par des inhibiteurs des intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Reopro, RGDS) soit par des inhibiteurs des voies d'activation des plaquettes, dépendantes de l'ADP (Apyrase) ou de son récepteur P2Y12 (Clopidogrel).

L'activation des plaquettes entraîne la libération des phospholipases A1/2 qui dégradent à leur tour les phospholipides membranaires (Phosphatidylcholine, PC ; Phosphatidylsérine PS ; Phosphatidylethanolamine, PE) en précurseurs directs (Acide phosphatidique, PA) ou indirects du LPA (Lysophosphatidylcholine, LPC ; Lysophosphatidylsérine, LPS ; Lysophosphatidylethanolamine, LPE). Ces derniers sont finalement hydrolysés par l'ATX libérée par les plaquettes activées, qui agit en tant qu'enzyme libre et/ou fixée aux intégrines de la famille $\beta 3$ ($\alpha V\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$) (**Figure 27**).

2. L'ATX exogène contrôle la prolifération, l'invasion et la transmigration des cellules tumorales

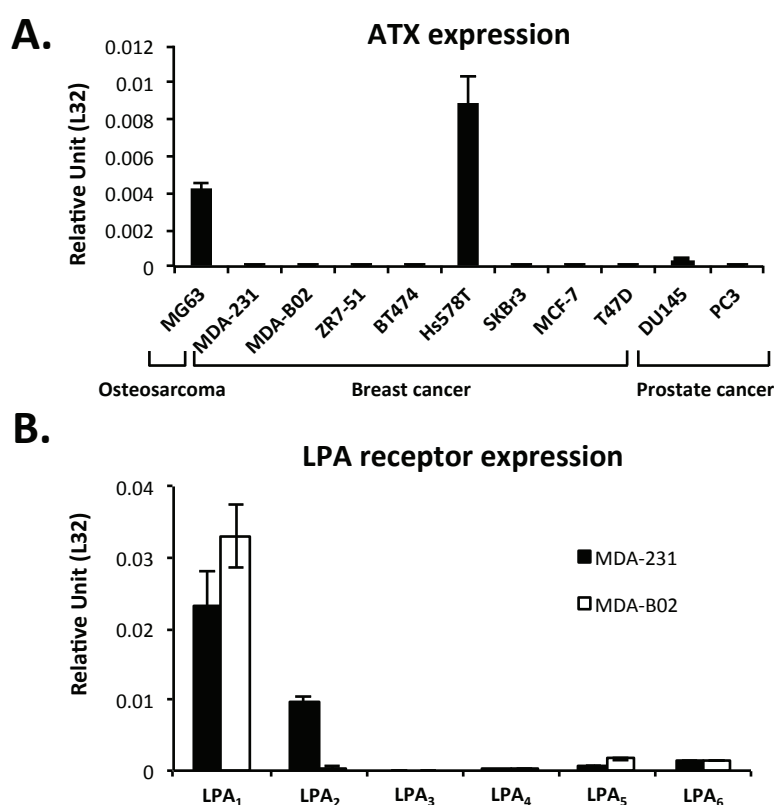


Figure 28. Les cellules de cancer du sein expriment les récepteurs au LPA, mais pas l'ATX. A: Analyse par PCR en temps réel de l'expression de l'ARNm codant pour l'ATX dans les lignées d'ostéosarcomes, de cancer du sein et de cancer de la prostate. B: Analyse par PCR en temps réel de l'expression des ARNm codant les récepteurs du LPA dans les cellules de cancer du sein MDA-231 et MDA-B02. Les valeurs ont été normalisées par rapport au gène de ménage L32. Les données représentent la moyenne ($\pm$ S.D) de deux expériences indépendantes réalisées en triplicatas.

En accord avec les récents travaux de l'équipe de D. Brindley, démontrant que les cancers du sein et de la prostate ont les niveaux d'expression en ATX les plus faibles parmi différentes catégories de cancers ²⁵⁹, nous avons constaté que seules les cellules de carcinome mammaire Hs578T, d'ostéosarcome MG63, et à un degré moindre les

cellules de cancer de la prostate DU145, expriment l'ARNm codant pour l'ATX (**Figure 28A**). Ces résultats confirment les précédents travaux du laboratoire qui montrent que les cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-231/B02 ne sécrètent pas l'ATX et n'ont pas la capacité à produire du LPA²³¹. Ces deux lignées cellulaires, qui expriment par ailleurs fortement le récepteur LPA₁ (**Figure 28B**), sont donc idéales pour étudier le rôle de l'ATX non-tumorale (NT-ATX) dans la dissémination métastatique à l'os.

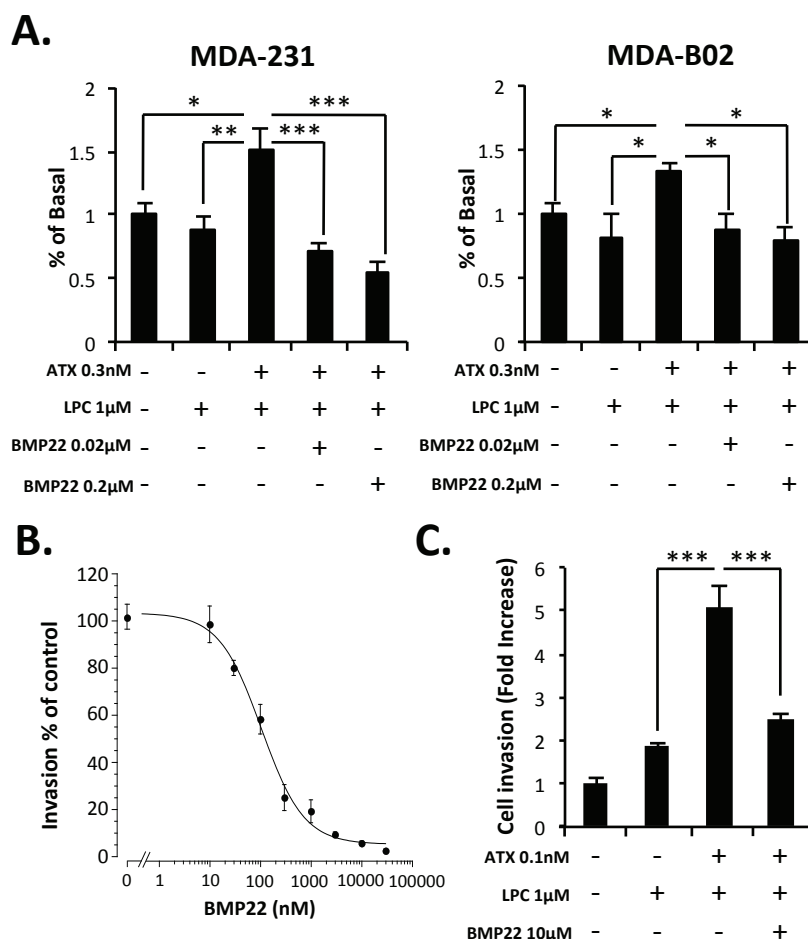


Figure 29. L'ATX exogène contrôle la prolifération, l'invasion et la transmigration. A: Prolifération suivie par incorporation au BrdU en réponse à l'ATX (3nM) et au LPC (1μM), en présence ou en absence de BMP22. Les résultats sont exprimés en moyenne ($\pm$ S.D) de trois expériences indépendantes réalisées en six réplicats (*, $p < 0.5$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; vs. MDA-B02 (+) ATX (+) LPC; one way ANOVA). B: Effets du composé BMP22 sur l'invasion des cellules MDA-231. L'invasion a été induite en réponse à l'ATX (3nM) et au LPC (1μM), en présence de concentrations croissantes en BMP22. Les données représentent la moyenne de pourcentage d'ihnbition ($\pm$ S.E.M) de trois expériences indépendantes réalisées en quatre réplicats. C: Effet du composé BMP22 sur la transmigration à travers une couche de cellules endothéliales HUVEC. Les résultats représentent la moyenne ($\pm$ S.E.M) de deux expériences réalisées en quatre réplicats (***, $p < 0.001$; vs. MDA-231 (+) ATX (+) LPC; one way ANOVA).

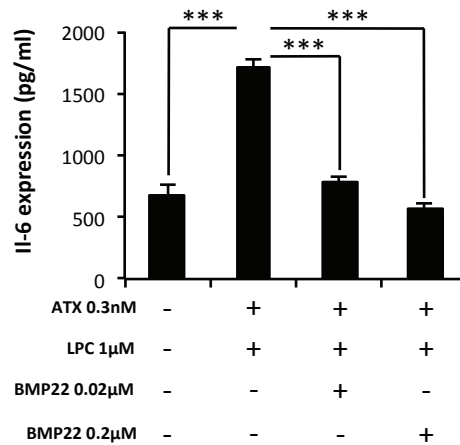
La prolifération de ces deux lignées cellulaires augmente significativement en présence d'ATX exogène et de LPC, mais le traitement au composé BMP22, inhibiteur de l'activité lysoPLD, bloque complètement cet effet (**Figure 29A**). Ces résultats confirment le rôle

mitogénique du LPA sur ces cellules de cancer du sein ²³¹. D'autre part, le traitement des cellules MDA-231 avec le composé BMP22 inhibe de façon dose-dépendante l'invasion induite par l'ATX exogène et le LPC à travers une couche de matrigel (**Figure 29B**), mais également à travers une couche de cellules endothéliales (**Figure 29C**). Donc, le blocage de l'activité lysoPLD par le composé BMP22 inhibe fortement l'invasion et la prolifération dépendantes du LPA des lignées de cancer du sein.

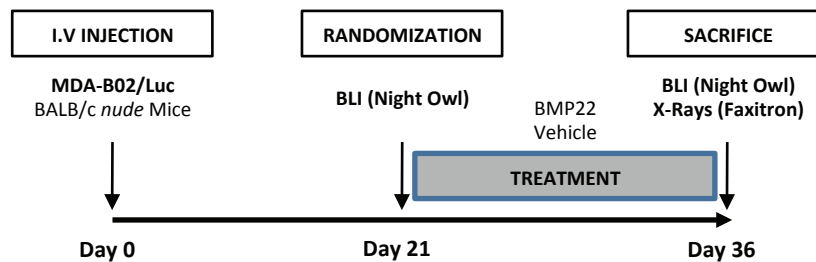
3. NT-ATX contrôle la dissémination à l'os des cellules de cancer du sein

Bien que dépourvues d'une expression en ATX, les cellules MDA-B02/luc ont la capacité à former d'importantes métastases osseuses ostéolytiques lorsqu'elles sont injectées dans l'artère caudale de la queue de souris Balb/C nude ²²⁷. Au niveau du site métastatique à l'os, le LPA produit stimule les récepteurs LPA₁ présents à la surface des cellules tumorales, et favorise notamment la sécrétion des cytokines pro-ostéoclastiques IL-6, IL-8, GM-CSF et Gro- α ²³¹. En accord avec ces travaux, l'incubation des cellules MDA-B02/luc en présence d'ATX exogène et de LPC conduit à l'augmentation de la production en IL-6 (**Figure 30A**). Cette réponse est inhibée de façon significative par le composé BMP22, ce qui indique que la sécrétion de IL-6 est bien dépendante du LPA formé (**Figure 30A**). Nous avons ensuite examiné l'effet du composé BMP22 dans la progression de métastases osseuses ostéolytiques préalablement établies. Vingt et un jours après l'injection des cellules MDA-B02/luc dans l'artère caudale de la queue de souris femelles Balb/C nude, une randomisation des animaux selon la taille des tumeurs a été effectuée sur la base de l'analyse par bioluminescence. Les animaux ont ensuite été traités en adjuvant avec le composé BMP22 (1 mg/kg, IP) ou un placebo jusqu'à J36. Au terme de cette période, les animaux ont été radiographiés puis mis à mort afin de récupérer les membres postérieurs (**Figure 30B**). Le traitement quotidien des animaux avec le composé BMP22 réduit de 39% l'étendue des lésions ostéolytiques (**Figure 30C**). La diminution de la destruction osseuse est associée à une diminution de 22% du nombre d'ostéoclastes au niveau de l'interface tumeur/os, lorsque les animaux sont traités avec le composé BMP22 (**Figure 30D**). L'ensemble de ces résultats démontre que le NT-ATX contribue à la progression des métastases osseuses ostéolytiques via son activité lysoPLD.

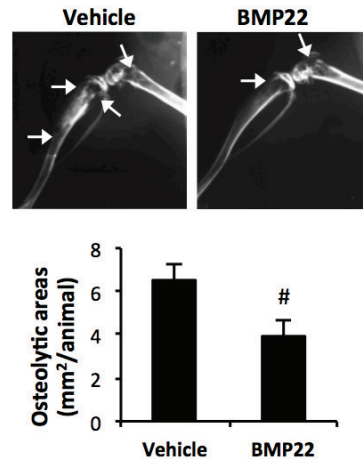
A.



B.



C.



D.

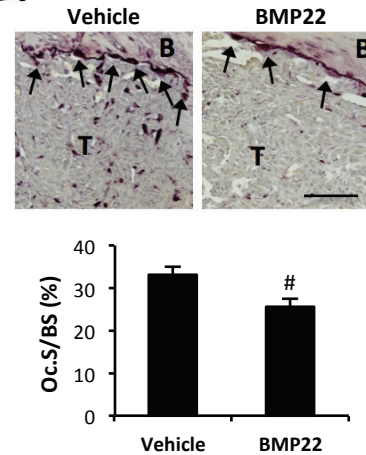


Figure 30. NT-ATX contrôle la progression des métastases osseuses ostéolytiques. A: Effet du composé BMP22 sur la sécrétion de la cytokine pro-ostéoclastique IL-6. La quantification des niveaux en IL-6 a été réalisée par test ELISA. Les résultats sont exprimés en moyenne ($\pm$ S.D) de deux expériences indépendantes réalisées en six réplicats ($p < 0.001$; vs. MDA-B02 (+) ATX (+) LPC ; one way ANOVA) B: Les cellules MDA-B02/luc ont été injectées à J0 dans l'artère caudale de la queue de souris Balb/C nude. La randomisation des animaux a été réalisée à J21 et est basée sur des signaux bioluminescents équivalents. Les souris ont été traitées avec le composé BMP22 (1mg/kg/jour, IP) ou avec le placebo (vehicle) de J21 à J36. A J36, les animaux ont été radiographiés puis mis à mort afin de récupérer les membres postérieurs. C: Radiographies représentatives des membres postérieurs des animaux métastatiques. Quantification de la surface des plages d'ostéolyse. Les résultats sont exprimés en moyenne ($\pm$ S.E.M) (#, $p < 0,05$; Mann-Wihtney). D: Analyse histologique de sections de tibias proximaux colorés au TRAP. T indique les cellules tumorales et B l'os. Les ostéoclastes sont colorés en rouge. (Echelle: 100µm). La quantification du nombre d'ostéoclastes actifs par surface osseuse trabéculaire (Oc.S/BS) est exprimée en pourcentage et représente la moyenne ($\pm$ S.E.M) (#, $p < 0,05$; Mann-Wihtney).

Nous avons ensuite analysé le rôle de NT-ATX dans la phase précoce de dissémination métastatique à l'os des cellules tumorales. Les souris ont été injectées avec les cellules MDA-B02/luc, qui ont la particularité d'être résistantes à la puromycine. Sept jours après l'inoculation, les animaux ont été mis à mort, les cellules de moelle osseuse ont été récoltées et mises en culture *in vitro* afin de quantifier les cellules tumorales ayant colonisé la moelle osseuse (TBC) (**Figure 31A**). Le traitement des animaux avec le composé BMP22 conduit à une légère diminution (4/8 souris) de l'incidence des animaux présentant des TBC comparés aux animaux traités avec le placebo (6/8 souris). Cependant, il réduit surtout de 94% le nombre de TBC présentes dans la moelle osseuse (**Figure 31B-C**).

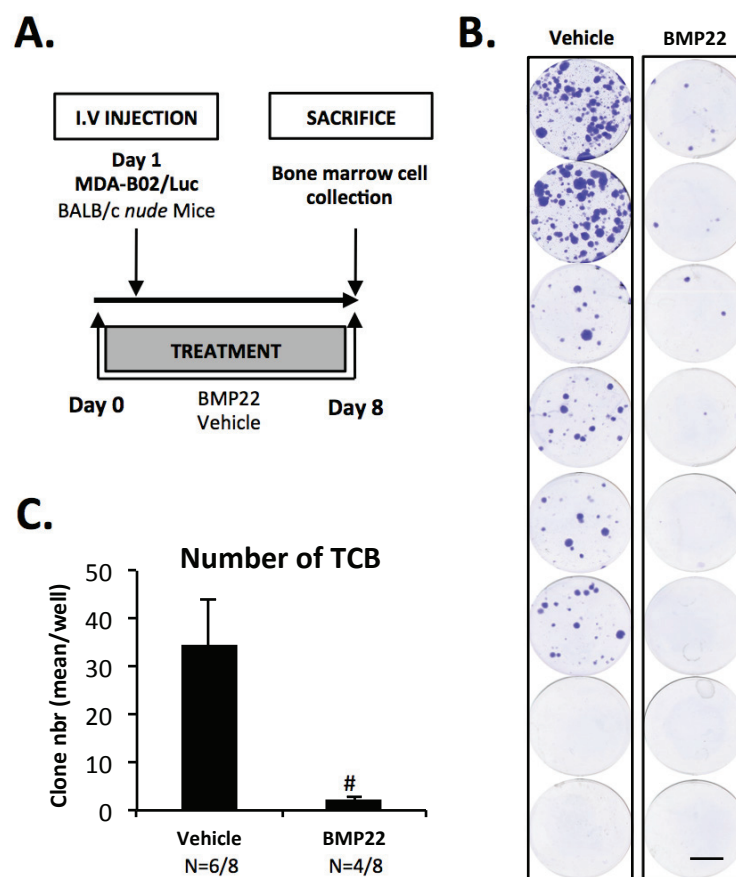


Figure 31. NT-ATX contrôle la colonisation spontanée des cellules tumorales à l'os. A: Les cellules MDA-B02/luc ont été injectées à J1 dans l'artère caudale de la queue de souris Balb/C nude. Les souris ont été traitées avec le composé BMP22 (1mg/kg/jour, IP) ou avec le placebo (vehicle) en néo-adjuvant de J0 à J8. A J8, les animaux ont été mis à mort afin de récupérer les membres postérieurs. B: Les cellules de la moelle osseuse ont été collectées à J8 et mises en culture pendant 2 semaines en présence de puromycine (1µg/ml). Les colonies correspondant aux cellules tumorales ayant colonisé l'os (Tumor cells that colonized the bone ; TCB) ont été fixées et colorées dans une solution contenant 20% de méthanol et 0.5% de cristal violet (Echelle : 100µm). Les colonies TCB ont été comptées. Les résultats sont exprimés en moyenne de TCB ($\pm$ S.D) (#, $p < 0,05$; vs. vehicle-BMP22 ; Mann-Wihtney).

Le traitement systémique des souris avec l'inhibiteur BMP22 bloque donc la colonisation de l'os par les cellules de cancer du sein n'exprimant pas l'ATX. L'ensemble de ces résultats démontre qu'au delà du rôle connu de l'ATX exprimée par les cellules tumorales, l'autotaxine non tumorale présente dans la circulation sanguine est impliquée dans la dissémination métastatique des cellules de cancer du sein à l'os.

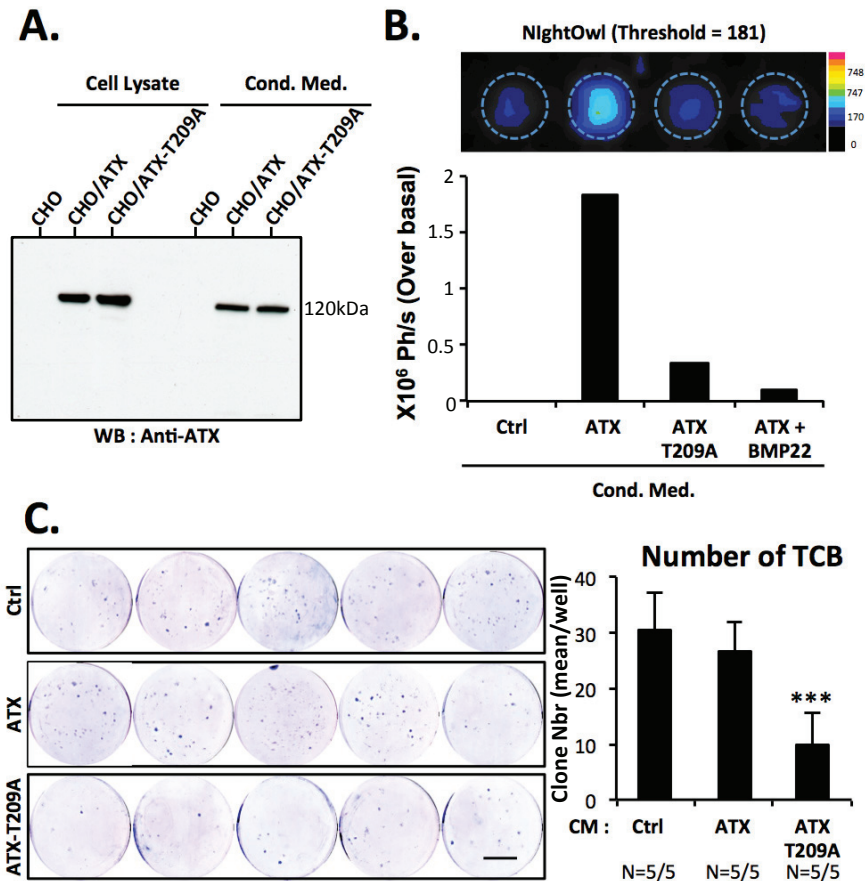


Figure 32. Inhibition de la colonisation spontanée à l'os par l'ATX inactivée pour son activité lysoPLD. A: Immuno-détection de l'ATX dans les lysats cellulaires et les milieux conditionnés des cellules CHO-dhfr+/ATX (CHO/ATX) et CHO-dhfr+/ATX-T209A (CHO/ATX-T209A). B: Quantification de l'activité lysoPLD dans les milieux conditionnés en présence ou en absence de BMP22. La fluorescence émise par le composé ATX-Red Dye (1µM) est détectée au NightOwl. Les résultats sont exprimés en ph/s par rapport au niveau basal. C: Les cellules MDA-B02/luc ont été injectées à J1 dans l'artère caudale de la queue de souris Balb/C nude. Les souris ont été traitées avec du milieu conditionné (300µl; 2 fois par jour; IP) issu des cellules parentales CHO-dhfr+ (Ctrl) ou transfectées CHO-dhfr+/ATX et CHO-dhfr+/ATX-T209A, de J0 à J8. A J8, les animaux ont été mis à mort afin de récupérer les membres postérieurs. Les cellules de la moelle osseuse ont été collectées puis mises en culture pendant 2 semaines en présence de puromycine (1µg/ml). Les colonies correspondant aux cellules tumorales ayant colonisé l'os (Tumor cells that colonized the bone; TCB) ont été fixées et colorées dans une solution contenant 20% de méthanol et 0.5% de cristal violet (Echelle: 100µm). Les colonies TCB ont été comptées. Les résultats sont exprimés en moyenne de TCB (± S.D) (***, p < 0,001; vs. Ctrl; One-way ANOVA).

Comme référencée dans l'introduction bibliographique, l'injection aux souris de lymphocytes T préalablement incubés avec de l'ATX humaine mutée, inactive pour son activité lysoPLD (ATX-T210A), inhibe le homing des lymphocytes T d'une manière

dominante négative ¹¹⁸. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'administration exogène d'ATX-T209A murine, invalidée pour son activité lysoPLD, pouvait potentiellement réduire la colonisation dépendante de NT-ATX. Les cellules CHO-dhfr+ ont été transfectées de façon stable avant mon arrivée au laboratoire pour exprimer la forme sauvage de l'autotaxine WT-ATX (CHO/ATX) ou sa forme mutée (CHO/ATX-T209A). Ces cellules ont été sélectionnées pour produire et sécréter des quantités similaires de WT-ATX ou d'ATX-T209A (**Figure 32A**). Le traitement au composé ATX-Red dye ²⁶⁰ induit l'émission d'une fluorescence détectable par bioluminescence uniquement dans le milieu conditionné des cellules CHO/ATX. L'inhibition de cette réponse par le composé BMP22 permet de confirmer que cette fluorescence est le reflet de l'activité lysoPLD (**Figure 32B**). Des souris Balb/C nude ont été injectées avec les cellules MDA-B02/luc et traitées pendant sept jours avec du milieu conditionné collecté à partir des cellules CHO-dhfr+, CHO/ATX et CHO/ATX-T209A par injection intra-péritonéale. Sept jours après l'inoculation, les animaux ont été mis à mort, les cellules de moelle osseuse ont été récoltées et mises en culture *in vitro*. Le traitement des souris avec le milieu conditionné des cellules CHO/ATX n'affecte ni l'incidence, ni le nombre de TCB, comparé aux animaux traités avec le milieu contrôle CHO-dhfr+ (**Figure 32C**). De manière surprenante, le traitement des animaux avec le milieu des cellules CHO/ATX-T209A entraîne une diminution de 66% du nombre de TCB par rapport aux autres groupes (**Figure 32C**).

L'administration exogène d'ATX inactive pour son activité lysoPLD interfère donc avec la NT-ATX circulante lors des premières étapes de colonisation à l'os par les cellules de cancer du sein. De plus, comme nous l'avons montré précédemment dans la **figure 18C**, le mutant ATX-T209A est également capable d'inhiber l'interaction entre l'ATX sauvage et l'intégrine $\alpha V\beta 3$, ce qui laisse suggérer que cette protéine entre en concurrence pour le même site de fixation *in vitro*. L'ensemble de ces résultats indique que le ciblage de la fixation de l'ATX aux intégrines présente un haut potentiel thérapeutique dans le traitement de patients en phase métastatique. Le manuscrit présentant les travaux relatifs aux plaquettes, à l'ATX non tumorales et aux intégrines est sous presse dans la revue Blood.

CHAPITRE 3 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A. Cellules tumorales et production locale de LPA

1. ATX et intégrines de la famille $\beta 3$

Les intégrines sont des récepteurs membranaires impliqués dans la reconnaissance cellulaire, contrôlant l'adhésion, la migration, la prolifération et la survie cellulaire. Au delà de leurs rôles fondamentaux dans de nombreux processus physiologiques comme lors du développement ou de l'angiogenèse, les intégrines sont des acteurs majeurs de la dissémination métastatique des cellules tumorales ⁴⁴. L'intégrine $\alpha V\beta 3$ intervient notamment dans le recrutement de facteurs pro métastatiques. La fixation des protéinases MMP-2 et uPA (urokinase Plasminogen Activator) à $\alpha V\beta 3$ permet par exemple de localiser leurs activités protéolytiques au niveau du front invasif et ainsi de favoriser le processus d'invasion des cellules tumorales ^{261,262}. Notre laboratoire a par ailleurs montré par le passé que cette intégrine confère aux cellules cancéreuses une haute capacité à induire des métastases osseuses ^{52,53}. $\alpha V\beta 3$ stimule en effet l'adhésion et la migration à l'os des cellules tumorales, via l'interaction avec des composants de la matrice osseuse contenant l'adhésiotope RGD tels que l'ostéopontine, le collagène de type 1 ou la sialoprotéine osseuse (BSP) ^{52,53}. Les travaux présentés dans ce manuscrit permettent ici de montrer que l'intégrine $\alpha V\beta 3$ intervient dans le recrutement d'un autre facteur pro-métastatique, l'autotaxine. Son interaction est directe, que ce soit sur la lignée génétiquement modifiée, CHO $\beta 3$, ou sur une série de lignées cellulaires cancéreuses naturelles. Nous avons démontré que l'adhésiotope impliqué dans cette interaction est accessible à $\alpha V\beta 3$, que l'ATX soit adhérente ou en solution. Ceci suggère que dans des conditions de croissance tumorale, l'ATX présente dans l'environnement est capable de se fixer sur les cellules cancéreuses via l'intégrine $\alpha V\beta 3$. Nos expériences de co-immunoprécipitation indiquent également que les cellules sécrétant l'ATX sont capables de maintenir l'ATX au contact de leur membrane plasmique via l'interaction avec l'intégrine $\alpha V\beta 3$. Le LPA est un lysophospholipide dont l'activité est abrogée en présence de phosphatases très représentées à la surface cellulaire et dans les liquides biologiques. Nos expériences de prolifération soutiennent l'hypothèse actuelle selon laquelle le rôle essentiel du LPA dépendrait de sa production au voisinage immédiat de la membrane cellulaire permettant ainsi son interaction rapide avec ses récepteurs. Par ailleurs, nos travaux montrent que la fixation de l'ATX aux intégrines de la famille $\beta 3$ est indépendante du motif RGD. Ces résultats sont en accord avec les travaux de l'équipe de

S. Symth où il a été observé que des mutations ponctuelles dans le domaine somatomedine-2 (SMB2) affecte la capacité de l'ATX à se fixer aux plaquettes sanguines via $\alpha\text{IIb}\beta 3$, et affecte la capacité de produire du LPA au voisinage de la cellule. Le remplacement de l'acide glutamique en position 109 (E109) ou de l'histidine en position 119 (H119) par une alanine entraîne en effet une diminution de près de 50% de la fixation des plaquettes ¹²⁷. Afin d'évaluer le rôle de ces mutations dans l'interaction avec l'intégrine $\alpha\text{V}\beta 3$, il serait intéressant de générer ces mutants ATX-E109 et ATX-H119A par mutagenèse dirigée, de tester ces protéines *in vitro*, et d'observer leur rôle dans la formation des métastases osseuses. Le ciblage de l'ATX via son interaction avec les intégrines de la famille $\beta 3$ pourrait à l'avenir être une approche thérapeutique dans le traitement des métastases.

2. ATX et Syndecan-4

Les HSPGs sont des composants essentiels des membranes cellulaires et de la matrice extracellulaire. Ils sont constitués d'un corps protéique, sur lequel est attaché un polymère d'unités disaccharidiques ²⁶³. En surface cellulaire, les deux principales familles d'HSPGs sont les syndecans (SDC), qui sont des protéines transmembranaires, et les glypicans (GPC), où la chaîne de GAG est attachée via une ancre GPI ²⁵⁷. Ils interviennent dans l'attachement des cellules à la MEC, la séquestration de certains facteurs de croissance ou des chimiokines, et certains agissent en tant que corécepteurs de ligands. De nombreuses études ont montré que certains syndecans sont impliqués dans divers processus tumoraux, tels que l'angiogenèse, la croissance tumorale ou la dissémination métastatique ²⁶³. Les données présentées dans la littérature montrent toutefois que leur rôle est assez complexe. Leur niveau d'expression et leur distribution varient selon le type de cancer. Certains sont à la fois marqueurs positifs de la progression de certains cancers et dans d'autres cas régulateurs négatifs de la progression tumorale. Ainsi, une diminution de l'expression en SDC1 est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer du larynx, alors que sa surexpression est liée aux carcinomes mammaires agressifs de mauvais pronostic ²⁶⁴. De même, l'injection aux souris de lignées de myélomes multiples qui expriment fortement SDC1 conduit à la formation de tumeurs très agressives, vascularisées et invasives ²⁶⁵. Son expression est d'ailleurs associée à une survie plus courte des patients atteints de myélomes multiples ²⁶⁵. Il a également été reporté qu'une forte expression en SDC2

favorise la survie, la prolifération et la dissémination des cellules de cancer du colon, au contraire des carcinomes pulmonaires de Lewis où cette surexpression est associée à une inactivation de MMP-2 qui empêche la dissémination métastatique ²⁶³. SDC4 est, quant à lui, exprimé dans de nombreuses tumeurs et dans le microenvironnement tumoral. A l'instar de SDC1, l'engagement de cet HSPG affecte principalement la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules. Le potentiel invasif de syndecan-4 varie en fonction des facteurs présents pour réguler la mobilité cellulaire. Ainsi, la fixation de CCL5 à SDC4 favorise la migration et l'invasion des cellules d'hépatome humain ²⁶⁶. Peu d'études relatent l'implication des glypicans dans les cancers. Il a toutefois été reporté qu'une sous régulation de l'expression en GPC3 favorise la progression des cancers du sein, du poumon et des ovaires, alors que GPC1 est lui surexprimé dans certains cancers du pancréas ou du sein ²⁶³.

Il a récemment été montré que l'isoforme α de l'ATX, forme la plus rare, est caractérisée par l'insertion d'une séquence polybasique au sein du domaine catalytique. Cette insertion, riche en résidus Arginine et Lysine, est impliquée dans la fixation à l'héparine et aux HSPGs membranaires ¹³². Néanmoins, les expériences présentées dans ce manuscrit ont été réalisées avec de l'ATX β , isoforme le plus exprimé dans l'organisme et seule forme présente dans la circulation sanguine, et qui contrairement à l'ATX α ne possède pas d'insertion polybasique (**Figure 14**). Nos tests d'inhibition par ARN interférence ou par le traitement des cellules avec un anticorps anti-SDC4 permettent ici de montrer que l'expression de SDC4 à la surface des cellules de cancer du sein et d'ostéosarcomes est nécessaire à l'interaction avec l'ATX. Les expériences de prolifération cellulaire en présence d'anticorps anti-SDC4 prouvent également que Syndecan-4 est impliqué dans le maintien de l'ATX en solution à la surface des cellules tumorales et que cette interaction augmente la biodisponibilité du LPA pour ses récepteurs. D'autre part, les cellules murines de carcinome mammaire 4T1 expriment l'ATX de façon endogène. La capacité de ces cellules à coloniser l'os et à former des métastases osseuses diminue lorsqu'elles sont incubées avec un anticorps anti-SDC4. A contrario, les cellules 4T1shATX, invalidées pour leur expression en ATX, ne sont pas affectées par ce prétraitement. Ces résultats indiquent que l'ATX est capable d'interagir avec SDC4 en condition *in vivo* et montrent l'importance de cette interaction dans la dissémination métastatique à l'os.

Cependant une interaction physique et directe entre ATX et SDC4 reste encore à démontrer. L'absence d'une séquence riche en résidus Arginine et Lysine dans la structure de l'ATX β suggère que la fixation à SDC4 ne dépend pas des chaînes de GAG, mais pourrait éventuellement être dépendante de l'ectodomaine de SDC4. Pendant plusieurs décennies, les domaines extracellulaires des syndecans ont été considérés comme de simples sites de fixation des chaînes de GAG. Plusieurs études ont récemment mis en évidence le rôle de ces structures dans l'adhésion cellulaire et la fixation de protéines ²⁶⁷. Il a notamment été montré que le domaine extracellulaire de SDC4, et plus particulièrement un motif peptidique conservé NXIP, est suffisant et nécessaire à la fixation de protéines matricielles tels que la fibronectine, et donc à l'adhésion cellulaire ^{268,269}. Les domaines de fixation de l'ATX à Syndecan-4 sont également encore inconnus. On sait maintenant que les domaines SMB de l'ATX sont impliqués dans les interactions avec les intégrines de la famille $\beta 3$ ¹²². Néanmoins, l'ATX contient également un large domaine NUC, qui comprend plusieurs motifs « EF Hand » capable de fixer les ions Ca^{2+} , et dont les fonctions sont encore inconnues ¹²². Ces séquences étant connues pour réguler les interactions protéines-protéines ²⁷⁰, on pourrait potentiellement imaginer que le domaine NUC serait impliqué dans la fixation de l'ATX à Syndecan-4. A l'avenir, le ciblage de l'interaction entre ATX et SDC4 pourrait devenir une cible thérapeutique dans la prévention des métastases.

3. Vers une coopération intégrine $\alpha V\beta 3$ /SDC4 ?

Nos résultats n'excluent pas non plus une coopération entre l'intégrine $\alpha V\beta 3$ et SDC4 dans le maintien de l'ATX à la surface des cellules tumorales. Il existe de nombreux exemples de collaborations entre HSPGs et intégrines dans la fixation de ligands. L'ancrage de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à la fibronectine dépend par exemple de la capacité de SDC4 à lier et à activer la PKC α (Protein Kinase C α) via son domaine cytoplasmique ¹²⁸. Plus récemment, il a été montré que la protéine neuronale Thy-1 engage de façon simultanée l'intégrine $\alpha V\beta 3$ et SDC4 exprimés à la surface des astrocytes. Thy-1 est une protéine extracellulaire exprimée par les neurones et attachée à la membrane cellulaire via une ancre GPI. L'engagement simultané de $\alpha V\beta 3$ et de SDC4 entraîne l'activation de RhoA qui induit un changement morphologique, et stimule en retour l'adhésion et la migration des astrocytes ²⁷¹. En accord avec ces travaux, on pourrait donc imaginer une clusterisation de SDC4 et des intégrines $\alpha V\beta 3$ qui permettrait le maintien de l'ATX à la

surface des cellules tumorales et ainsi favoriser une production locale de LPA. Afin de valider une co-localisation de ces différents récepteurs, il serait intéressant d'évaluer l'état d'activation de la protéine de signalisation RhoA et de réaliser des expériences de microscopie confocal.

B. ATX/LPA et dissémination métastatique

L'expression en ATX est augmentée dans de nombreux types de cancers. Néanmoins, l'expression de son transcrit dans les biopsies de tumeurs primaires humaines ne permet ni de prédire la récurrence métastatique, ni la survie globale des patients ²²³. Nous montrons dans ce manuscrit, que le traitement systémique des animaux, notamment avec le composé BMP22, bloque de manière remarquable la dissémination spontanée à l'os des cellules de cancer du sein exprimant ou non l'ATX de façon endogène. Ainsi, le développement de puissants inhibiteurs de l'ATX apparaît essentiel pour améliorer les soins des patients atteints de tumeurs solides ostéophiles.

Par ailleurs, une récente étude menée au sein du laboratoire de D.N. Brindley a montré que la croissance tumorale des cellules 4T1, directement injectées dans les glandes mammaires de souris Balb/C, induit une augmentation significative de l'expression en ATX par les cellules stromales environnantes ²⁴⁷. Les niveaux en ATX sont alors bien plus élevés dans l'environnement tumoral que dans la tumeur elle-même, ce qui laisse penser que l'ATX synthétisée par les cellules stromales joue un rôle prépondérant vis-à-vis de l'ATX produite par les cellules tumorales. En accord avec ces travaux, et sur la base d'expériences menées *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de formation de métastases osseuses utilisant les cellules humaines de cancer du sein (MDA-MB-231, MDA-MB-231) qui n'expriment pas l'ATX de façon endogène, notre étude montre pour la première fois que l'ATX non tumorale (NT-ATX) présente dans la circulation sanguine contrôle la diffusion des métastases osseuses, principalement à un stade précoce. La dissémination métastatique au tissu cible se fait essentiellement par la circulation sanguine. Via leur adhésion aux cellules métastatiques, les plaquettes sanguines leur confèrent une protection face aux cellules du système immunitaire et face aux contraintes mécaniques exercées par la circulation sanguine. Notre laboratoire a montré que l'agrégation plaquettaire induite par les cellules tumorales est à l'origine de la production de LPA ²³¹. Nous montrons ici que ceci est en partie dû à la formation de

précurseurs du LPA libérés par les plaquettes. Notre étude montre également pour la première fois que l'ATX est présente dans les plaquettes sanguines humaines et est mobilisée au moment de l'interaction des plaquettes avec les cellules tumorales. Or, les plaquettes sanguines sont des cellules anucléées, de formes discoïdales qui dérivent de la fragmentation des mégacaryocytes (MKs). Elles renferment trois types de granules de sécrétion qui sont essentiels à la fonction plaquettaire normale : les granules denses, les granules- α (les plus abondants - 50 à 80 par plaquette) et les lysosomes ²⁷². Chaque population de granules contient des molécules aux rôles spécifiques. Les granules denses renferment de petites molécules non protéiques (nucléotides, amines, cations bivalents), alors que les lysosomes contiennent principalement des enzymes de digestions (glycosidases, protéases). Les granules- α renferment quand à eux différents types de protéines : protéoglycanes, glycoprotéines adhésives, facteurs de l'hémostase, facteurs solubles, facteurs plasmatiques ²⁷²... Les plaquettes sanguines sont dépourvues de fonction de transcription. Leur contenu protéique a en fait deux origines. Il résulte d'une part de l'activité des mégacaryocytes (MKs), c'est ce qui se passe pour certaines protéines contenues dans les granules- α qui sont produites et exprimées tôt au cours de la maturation des MKs. Elles sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique, exportées dans l'appareil de Golgi pour maturation, pour finalement être stockées dans les granules- α ²⁷². C'est notamment le cas du vWF, l'un des facteurs les plus abondants des granules- α ²⁷³, ou de la P-sélectine, notamment impliquée dans le rolling des plaquettes activées aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins ²⁷². D'autre part, les plaquettes sanguines possèdent une grande capacité d'endocytose qui permet à certaines protéines plasmatiques d'être incorporées dans les granules- α et ceci via différents mécanismes d'internalisations. Les immunoglobulines et l'albumine sont par exemple incorporées par pinocytose ²⁷². D'autres protéines plasmatiques sont internalisées selon un processus d'endocytose médié par un ou plusieurs récepteurs de surface: la protéine se lie au(x) récepteur(s), est internalisée via un mécanisme dépendant de la clathrine, pour finalement être stockée dans des granules- α . L'exemple le plus étudié est l'incorporation du fibrinogène via son interaction avec l'intégrine α IIb β 3 ²⁷⁴. Notre analyse des bases de données publiques a montré que l'ATX n'est exprimée ni par les progéniteurs mégacaryocytaires ni par les MKs matures. Au cours de l'étude menée par le groupe de V. Aidinis sur des individus atteints ou non de polyarthrite rhumatoïde, la concentration sérique en ATX a été évaluée par ELISA à

environ 5µg/mL ²⁷⁵. Si on considère la capacité de captation des protéines plasmatiques des plaquettes, il n'est donc pas surprenant que notre analyse par microscopie électronique ait révélé la présence d'ATX dans les granules-α. Cependant, notre étude ne nous a pas permis de déterminer les mécanismes de la captation de l'ATX par les plaquettes. De manière intéressante, une étude récente montre que l'ATX exogène peut être captée et internalisée par les cellules tumorales selon un mécanisme dépendant des intégrines, puis redistribuée au niveau du front de migration ²⁷⁶. On pourrait ainsi imaginer une implication des intégrines αIIbβ3 et/ou αVβ3 plaquettaires dans la captation et le stockage de l'ATX dans les granules-α des plaquettes sanguines.

Même si l'autotaxine est la principale source de LPA dans la circulation sanguine ²³², nos résultats montrent que l'inhibition de l'ATX, par les composés BMP22 ou PF-8380, n'affecte que partiellement la prolifération tumorale induite par les plaquettes, alors que l'inhibition non spécifique des phospholipases A1/A2 bloque complètement cette prolifération. D'autre part, un traitement systémique avec le composé ONO-8430506, inhibant l'activité lysoPLD de l'ATX, ne fait que retarder la prise tumorale des cellules de carcinomes mammaires 4T1 et 4T1-12B injectées dans les glandes mammaires. Au bout de 12 jours, les différences concernant le volume des tumeurs s'estompent entre le groupe traité avec le composé et le groupe recevant le placebo. Ce traitement n'entraîne également qu'une diminution partielle de la dissémination métastatique au poumon ²⁴⁷. L'ensemble de ces résultats laisse donc penser que l'administration seule d'inhibiteurs de l'ATX n'est pas suffisante dans le cadre d'une thérapie, et il apparaît nécessaire de les combiner à des antagonistes du LPA. De récentes études s'intéressent également aux différentes voies de catabolisme du LPA afin de développer de nouveaux traitements anti-cancéreux. Le LPA peut en effet être converti en monoacylglycérol (MAG) par de nombreuses PAPs (Prostatic acid phosphatase) ⁹⁸. Parmi elles, on retrouve notamment la LPP1 (Lipid Phosphate Phosphohydrolase-1) capable d'hydrolyser le LPA extracellulaire. Ces LPP sont toutefois très faiblement exprimées par les cellules tumorales ou au niveau de biopsies tumorales ²⁷⁷. Mais de manière remarquable, la surexpression de LPP1 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 ou les cellules murines de carcinomes mammaires 4T1 diminue de plus de 80% la croissance tumorale *in vivo* et la dissémination métastatique au poumon ²⁷⁷. Par ailleurs, il a été montré que le traitement *in vitro* à la GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) de cellules de cancer ovariens stimule l'expression des LPPs en surface cellulaire et conduit à une

diminution de la prolifération cellulaire ²⁷⁸. Ces travaux apportent la « preuve de concept » que le ciblage de l'axe ATX-LPA-LPP via une surexpression de LPP1 pourrait devenir une thérapie d'avenir des cancers du sein métastatiques. Il faut néanmoins être conscient qu'il est très difficile d'augmenter l'activité enzymatique d'une protéine *in vivo* et de s'en servir comme méthode thérapeutique.

C. ATX/LPA et pathophysiologies osseuses

1. Origine du LPA au site osseux ?

L'implication de l'axe ATX/LPA dans les pathophysiologies osseuses est encore très peu documentée, mais pourrait à l'avenir devenir un champ d'investigation majeur. Il a en effet été montré que chacune des cellules osseuses contribuant au remodelage osseux (ostéoblaste, ostéoclaste et ostéocyte) exprime au moins un récepteur du LPA et répond en fonction du test à une stimulation par le LPA ²⁷⁹. L'ensemble de ces travaux suggère une grande complexité de l'impact physiologique du LPA dans l'environnement osseux. Il a été proposé plusieurs origines du LPA au site osseux : via les ostéoblastes suite à l'activation du récepteur P2X7, via les adipocytes grâce à l'expression d'ATX et via les plaquettes sanguines dans le contexte métastatique ²³¹. Cependant, l'impact fonctionnel du LPA sur l'activité ostéoclastique est encore complètement inconnu. Les données actuelles de la littérature renforcées par nos résultats récents suggèrent que l'activité biologique du LPA serait dépendante d'une production locale au voisinage immédiat de ses récepteurs présents à la surface des cellules cibles ¹⁴⁸. Nos études préliminaires non publiées montrent par ailleurs que l'ATX est exprimée au cours de l'ostéoclastogenèse et que ENPP2 est un gène cible de RANK-L dans les monocytes. Les résultats présentés dans ce manuscrit montrent également que l'intégrine $\alpha V\beta 3$ est capable de maintenir l'ATX à la surface des cellules tumorales et d'augmenter la biodisponibilité du LPA pour ses récepteurs. Or les ostéoclastes sont les cellules de l'organisme qui expriment sans doute le plus fortement cette intégrine. Il est donc parfaitement envisageable que $\alpha V\beta 3$ assure un rôle de maintien de l'ATX à la surface des ostéoclastes. L'expression en ATX par les ostéoclastes permettrait ainsi la production locale de LPA au site même du remodelage osseux contrôlant l'initiation et/ou la progression de la zone de résorption.

2. Implication dans les pathologies osseuses ?

ATX/LPA et ostéoporose

L'ostéoporose est caractérisée par une fragilité excessive du squelette, due à une diminution de la masse osseuse et à l'altération de la microarchitecture osseuse. La solidité de l'os résulte d'un équilibre subtil entre les ostéoblastes qui synthétisent l'os, et les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse. Une activité dominante des ostéoclastes conduit donc à l'ostéoporose ³². C'est une maladie fréquente chez les femmes après la ménopause, conséquence d'une diminution de la masse osseuse liée à l'âge et à une carence en hormones (estrogènes). L'ostéoporose constitue un facteur de risque important de fractures osseuses notamment au niveau du col du fémur, des vertèbres et des côtes. Une étude de notre laboratoire récemment publiée, montre que, mis à part LPA₆, le récepteur LPA₁ est majoritairement exprimé dans les ostéoclastes. Son expression augmente au fur et à mesure de la différenciation ostéoclastique pour atteindre une valeur plateau ¹⁴⁸. Les récepteurs LPA₂, LPA₄ et LPA₅ sont plus faiblement exprimés mais possèdent un profil d'expression similaire à LPA₁ au cours de l'ostéoclastogénèse. Par ailleurs, le traitement avec l'inhibiteur des récepteurs LPA₁ et LPA₃ (Ki16425) inhibe la perte osseuse induite chez la souris ovariectomisée démontrant que le LPA via son récepteur LPA₁ contrôle la résorption osseuse *in vivo* ¹⁴⁸. Il paraît donc nécessaire de comprendre le rôle de l'axe ATX/LPA sur la perte osseuse liée à la privation hormonale.

ATX/LPA et polyarthrite rhumatoïde

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. Elle peut conduire à la destruction complète du cartilage articulaire. Plusieurs facteurs interviennent dans le déclenchement de la maladie, notamment des facteurs environnementaux, un terrain génétique prédisposé et des facteurs hormonaux. Ces facteurs réunis activent une réponse immunitaire innée et acquise incontrôlée qui se traduit par une réaction inflammatoire exagérée. Les ostéoclastes jouent un rôle majeur dans le développement d'érosions osseuses et de la destruction articulaire. RANK-L intervient notamment dans la résorption osseuse sous-chondrale de l'articulation rhumatoïde ²⁸⁰. Elle est exprimée à la surface des cellules de la lignée ostéoblastique

mais aussi des cellules endothéliales, des lymphocytes activés ou de cellules mésenchymateuses. La production de RANK-L est régulée par des cytokines pro-inflammatoires, telles que le $\text{TNF}\alpha$, l'IL1, l'IL17 ²⁸⁰. L'ATX et le LPA sont également présents à de hauts niveaux dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde ²⁸¹. L'ATX stimule la migration des fibroblastes synoviaux suivant un mécanisme dépendant de la production de LPA et de l'activation des récepteurs du LPA ²⁸¹. Il a également été montré que le $\text{TNF}\alpha$ régule l'expression des récepteurs du LPA dans les synoviocytes et amplifie la sécrétion de cytokines en réponse au LPA ²⁸¹. Il a par ailleurs été reporté que, dans le contexte tumoral, le $\text{TNF}\alpha$ stimule l'expression d'ATX dans les hépatocarcinomes ²¹⁶. L'ensemble de ces données montre qu'il est important de comprendre le rôle du couple ATX/LPA sur l'activité ostéoclastique dans l'érosion osseuse en situation inflammatoire. Le ciblage de cet axe pourrait par la suite devenir une cible thérapeutique intéressante dans le cadre du traitement contre la polyarthrite rhumatoïde.

CHAPITRE 4 : ANNEXES

Dans le cadre d'un programme de développement d'inhibiteurs de l'ATX, nous avons établi une collaboration avec le Cancer Research Technology (London, UK) au cours de ma thèse. Dans ce cadre, nous avons eu à notre disposition un inhibiteur de l'activité lysoPLD, le composé CRT0161016. L'utilisation de cette drogue dans notre modèle orthotopique de formation de métastases osseuses 4T1 nous a ainsi permis d'évaluer le rôle de l'ATX sécrétée par les cellules tumorales, et plus particulièrement son activité lysophospholipase D dans la formation, la dissémination et la progression des métastases osseuses ostéolytiques.

1. Effet du composé CRT0161016 sur la croissance tumorale et la dissémination à l'os

Afin d'évaluer l'effet du composé CRT0161016 dans un modèle orthotopique de formation des métastases osseuses, les cellules 4T1 exprimant fortement et de façon endogène l'ATX ont été injectées en « fat pad » dans la 4^{ème} glande mammaire de souris femelles Balb/C âgées de 6 semaines. Les animaux ont été traités en néo-adjuvant *per os* avec la drogue ou avec un placebo de J0 à J15. A J15, les animaux ont été anesthésiés et les tumeurs primaires ont été enlevées chirurgicalement, puis pesées. Trois semaines après la résection des tumeurs, les animaux ont été mis à mort, les cellules de moelle osseuse ont été récoltées et mises en culture *in vitro* afin de quantifier les cellules tumorales ayant colonisé la moelle osseuse (TBC) (**Figure 33A**).

En accord avec les travaux du laboratoire sur le rôle de l'ATX dans la croissance tumorale ²²³, le traitement avec le composé CRT0161016 n'altère pas la croissance de la tumeur primaire (**Figure 33B**). Même s'il n'affecte pas l'incidence de la récurrence tumorale après résection (6/9 pour le placebo contre 7/11 pour les animaux traités), on constate qu'il retarde la récurrence tumorale, avec une diminution de près de 70% de la taille des récurrences chez les animaux traités avec la drogue (**Figure 33C**). En accord avec les résultats obtenus avec les cellules 4T1shATX, le traitement entraîne une diminution d'environ 40% (5/11 souris) de l'incidence des animaux présentant des TBC comparés aux animaux traités avec le placebo (7/9 souris) et il réduit d'environ 70% le nombre de TBC dans la moelle osseuse (**Figure 33D**). Ainsi, le composé CRT0161016, dans le cadre d'un traitement néo-adjuvant, inhibe la dissémination spontanée à l'os de cellules de carcinome mammaire 4T1 dans les souris Balb/C.

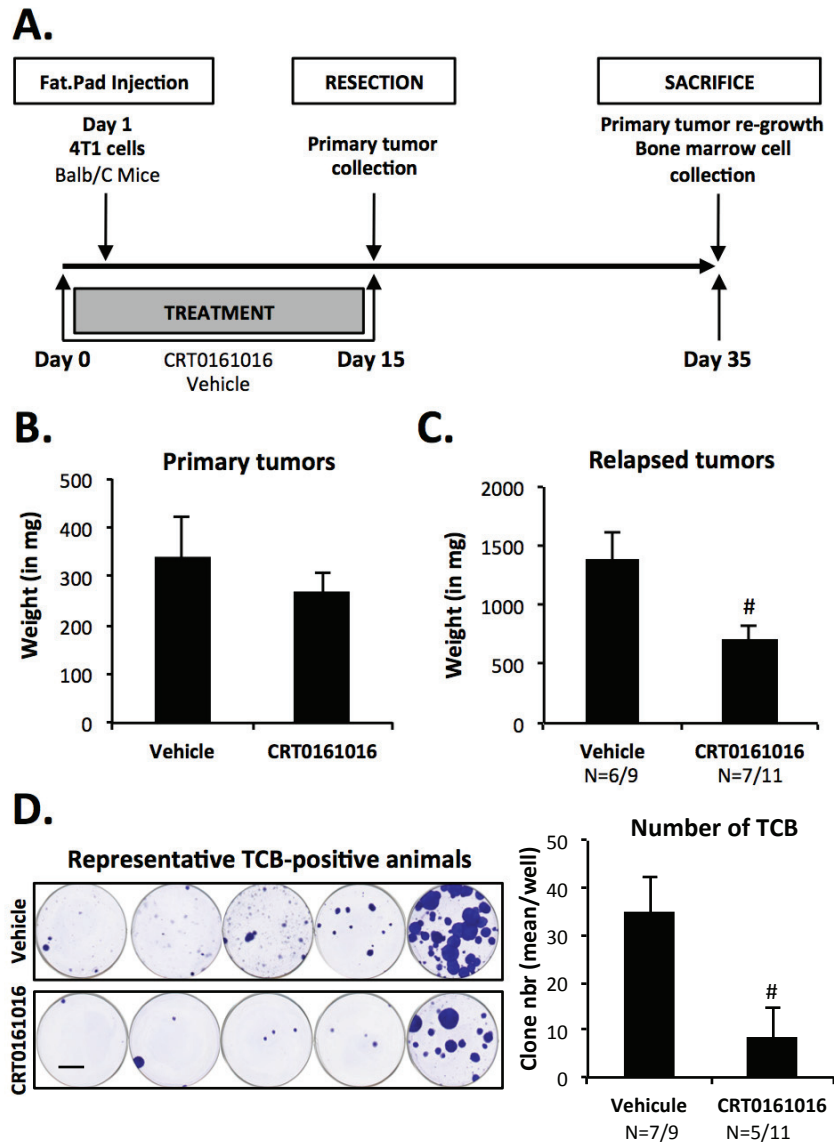


Figure 33. Le composé CRT0161016 affecte la reprise tumorale et la dissémination à l'os des cellules tumorales. A: Les cellules 4T1 ont été injectées en « Fat.pad » dans la 4^{ème} glande mammaire des souris Balb/C. Les souris ont été traitées avec le composé CRT0161016 (100mg/kg/jour, per os) ou avec le placebo (vehicle) de J0 à J15. A J15, les tumeurs primaires ont été prélevées et pesées. A J35, les animaux ont été mis à mort afin de récupérer membres postérieurs et récides tumorales (Tumor relapse). B/C: Tumeurs primaires (Primary tumor) et récides tumorales (Tumor relapse) ont été pesées. Leur poids est exprimé en mg. D: Les cellules de la moelle osseuse ont été collectées à J35 et mises en cultures pendant 2 semaines en présence de 6-Thioguanine (10µg/ml). Les colonies correspondant aux cellules tumorales ayant colonisé l'os (Tumor cells that colonized the bone ; TCB) ont été fixées et colorées dans solution contenant 20% de méthanol et 0.5% de cristal violet (Echelle :100µm). Les colonies TCB ont été comptées. Les résultats sont exprimés en moyenne de TCB ($\pm$ S.E.M) (#, $p < 0,05$; vs. vehicle-CRT0161016 ; Mann-Wihtney).

2. Effet du composé CRT0161016 sur la progression des métastases osseuses et pulmonaires

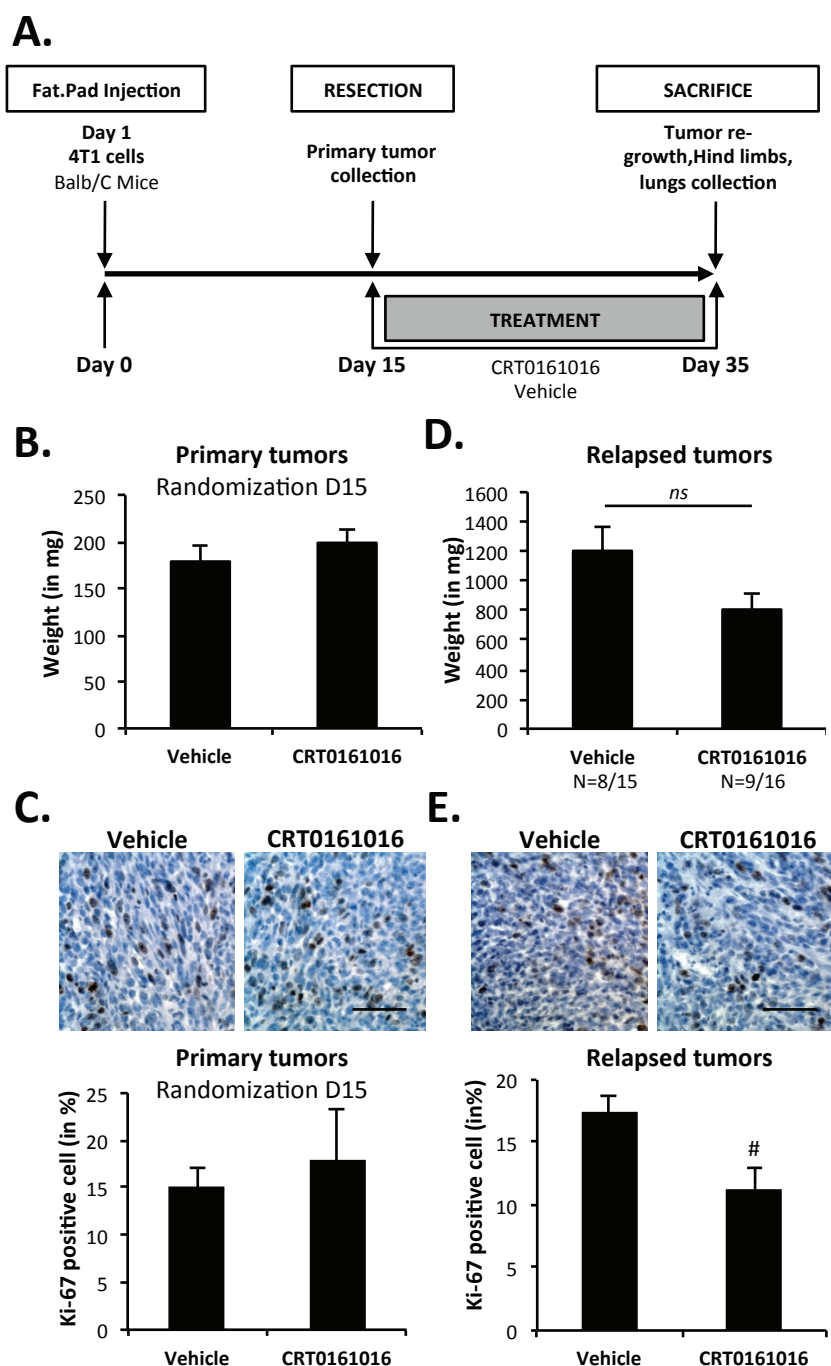


Figure 34. Le composé CRT0161016 affecte modérément la reprise tumorale. A: Les cellules 4T1 ont été injectées en « Fat.pad » dans la 4ème glande mammaire des souris Balb/C. A J15, les tumeurs primaires ont été prélevées, pesées et conservées pour analyses. Les souris ont été traitées avec le composé CRT0161016 (100mg/kg/jour, per os) ou avec le placebo (vehicle) de J15 à J35. A J35, les animaux ont été mis à mort afin de récupérer membres postérieurs (Hind limbs), récurrences tumorales (Tumor relapse) et poumons (lungs). B/D: Les tumeurs primaires (Primary tumor) et les récurrences (Tumor relapse) ont été pesées. Leur poids est exprimé en mg. C/E: Les tumeurs ont été fixées puis incluses dans de la paraffine. L'indice mitotique correspond au pourcentage de noyaux positifs pour le Ki-67 (Echelle : 100µm) (#, $p < 0,05$; vs. vehicle-CRT0161016 ; Mann-Whitney).

Afin d'évaluer l'effet du composé CRT0161016 en tant que traitement adjuvant, les cellules 4T1 ont été injectées en « fat pad » dans la 4^{ème} glande mammaire de souris femelles Balb/C âgées de 6 semaines. A J15, les animaux ont été anesthésiés, les tumeurs primaires ont été enlevées chirurgicalement, pesées puis conservées pour diverses analyses. Les animaux ont alors été traités per os avec le composé ou le placebo de J15 à J35, puis mis à mort afin de prélever membres postérieurs, récidives tumorales et poumons (**Figure 34A**). Comme on le constate sur les **figures 34B** et **34C**, la taille et l'indice mitotique (Ki-67) des tumeurs primaires sont similaires quel que soit le groupe de souris. Même s'il n'affecte pas l'incidence de la récurrence tumorale (8/15 pour le groupe placebo ; 9/16 pour le groupe traité au CRT0161016), le traitement semble affecter très légèrement la croissance de la récurrence tumorale. On observe en effet une tendance à la diminution du poids des tumeurs, mais non significative (**Figure 34D**). L'analyse de l'index Ki-67 des récidives révèle toutefois une légère diminution significative de 8% de la prolifération tumorale chez les animaux traités au CRT0161016 comparés aux animaux traités avec le placebo (**Figure 34E**).

De manière remarquable, le traitement au CRT0161016 en adjuvant bloque complètement la dissémination métastatique à l'os : aucun des animaux traités avec la drogue ne présente de TCB, contrairement aux groupes placebo où l'incidence est de 100% (8/8 souris) et où le nombre de colonies TCB est très élevé, avec une moyenne de plus de 100 colonies par puits (**Figure 35A et B**). Toutefois et de manière surprenante, le traitement n'a aucun effet sur la dissémination métastatique au poumon : le nombre de métastases pulmonaires, la surface des métastases et l'index Ki-67 sont similaires au niveau des animaux traités au CRT0161016 et du groupe placebo (**Figure 35C, D et E**). Ainsi, en concordance avec les résultats obtenus avec le traitement en néo-adjuvant, le composé CRT0161016 dans le cadre d'un traitement adjuvant, affecte légèrement la récurrence tumorale, mais il inhibe surtout complètement la dissémination spontanée à l'os. Il n'affecte toutefois pas la dissémination au poumon des cellules de carcinomes mammaires 4T1.

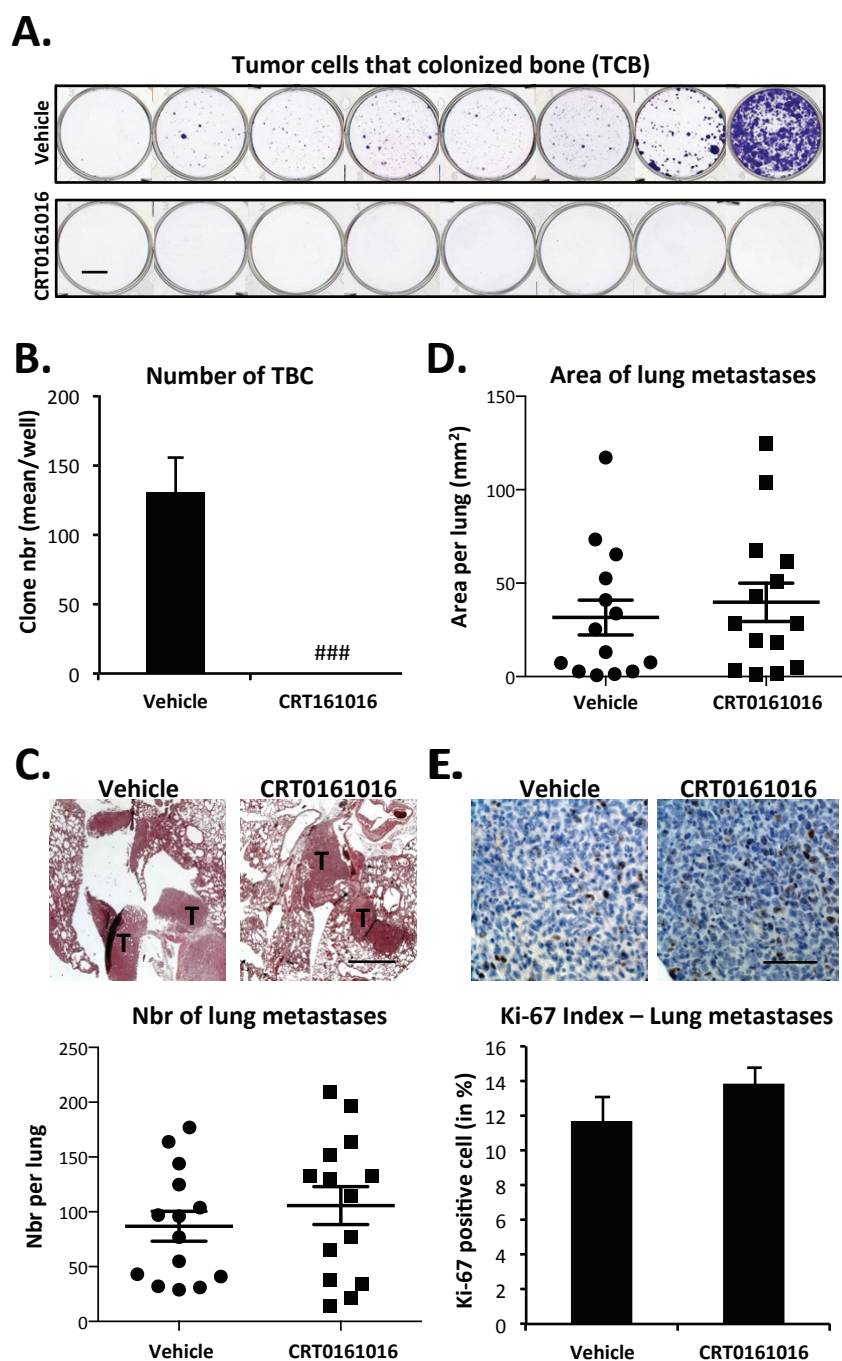


Figure 35. Le composé CRT0161016 affecte la dissémination métastatique à l'os, mais pas au poumon. A: Les cellules de la moelle osseuse des membres postérieurs ont été collectées à J35 et mises en cultures pendant 2 semaines en présence de 6-Thioguanine (10µg/ml). Les colonies correspondant aux cellules tumorales ayant colonisé l'os (TCB) ont été fixées et colorées dans une solution contenant 20% de méthanol et 0.5% de cristal violet. B: Les colonies TCB ont été comptées. Les résultats sont exprimées en moyenne de TCB ($\pm$ S.E.M). C: Les poumons ont été collectés à J35, fixés puis inclus. Des coupes de poumon ont été colorées avec une solution H&E. T indique les cellules tumorales. (Echelle : 100µm) Le nombre de métastases pulmonaires pour chaque animal a été compté et les résultats sont représentés en dot-plot. D: La surface occupée par les métastases pulmonaires est exprimée en mm². E: Des coupes de poumon ont permis de déterminer l'indice mitotique qui correspond au pourcentage de noyaux positifs pour le Ki-67 (Echelle : 100µm) (###, $p < 0,001$; vs. vehicle-CRT0161016 ; Mann-Withney).

L'utilisation du composé CRT0161016 a permis de confirmer les résultats obtenus par le laboratoire sur le rôle de l'ATX dans la progression des métastases osseuses ²²³, mais

surtout de mettre en évidence son rôle majeur dans le processus de dissémination à l'os des cellules de cancer du sein. Maintenant que la structure cristallographique de l'ATX est connue, le développement de puissants inhibiteurs de l'ATX apparaît essentiel pour améliorer les soins des patients atteints de tumeurs solides ostéophiles.

CHAPITRE 5 : PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

A. Listes des publications

Articles originaux dans des journaux internationaux à comité de lecture

- **Leblanc R**, Lee S, David M, Bordet J, Norman D, Patil R, Miller D, Sahay D, Ribeiro J, Clézardin P, Tigyi G, and Peyruchaud O. Interaction of Platelet-derived Autotaxin with Tumor Integrin AlphaV/Beta3 Controls Metastasis Dissemination of Breast Cancer Cells to Bone. *Blood*. 2014
- David M, Sahay D, Mege F, Descotes F, **Leblanc R**, Ribeiro J, Clezardin P, Peyruchaud O. Identification of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) as a biomarker for lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA1) activation in human breast and prostate cancers. *PloS One*. 2014
- David M, Machuca-Gayet I, Kikuta J, Ottewell P, Mima F, **Leblanc R**, Bonnelye E, Ribeiro J, Holen I, Lopez Vales R, Jurdic P, Chun J, Clezardin P, Ishii M, Peyruchaud O. Lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA1) plays a functional role in osteoclast differentiation and bone resorption activity. *J Biol Chem*. 2014.

Revue acceptée dans des journaux internationaux à comité de lecture

- Peyruchaud O, **Leblanc R**, David M. Pleiotropic activity of lysophosphatidic acid in bone metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2013

B. Liste des communications à des congrès scientifiques

- 13th International meeting on Cancer-Induced Bone Disease (CIBD), 6-9 Novembre 2013, Miami, USA.
Leblanc R, Sahay D, Ribeiro J, Clézardin P and Peyruchaud O. Blocking Syndecan-4 inhibits bone metastasis formation: potential involvement in the prometastatic activity of Autotaxin. Présentation orale et poster
- FASEB Summer Conferences, 4-9 Août 2013, Niseko, Japon.
Sahay D, **Leblanc R**, Ribeiro J, Clézardin P and Peyruchaud O. Lysophosphatidic acid promotes metastasis through LPA1/ZEB1/mir21-dependent activation pathway in breast cancer cells. Poster

- 11th International meeting on Cancer-Induced Bone Disease (CIBD), 6-9 Novembre 2011, Chicago, USA.
Leblanc R, David M, Ribeiro J, Clézardin P and Peyruchaud O. AlphaV/Beta3 integrin mediates Autotaxin binding to cancer cells independently of its RGD motif. Poster

- 6ème Journée Scientifiques du Clara, 28-29 Mars 2011, Lyon, France.
 David M, **Leblanc R**, Deux B, Serre CM, Ribeiro J, Clézardin P, Peyruchaud O. Potential control of the progress of bone metastasis through interaction between autotaxin and AlphaV-Beta3 integrin. Poster

- 10th international meeting on Cancer induced Bone Diseases (CIBD). 22-25 Septembre 2010, Sheffield, UK.
 David M, **Leblanc R**, Deux B, Serre CM, Ribeiro J, Clézardin P and Peyruchaud O. Interaction of Autotaxin with breast cancer cell integrins might contribute to lysophosphatidic acid-mediated bone metastases. Poster

CHAPITRE 6 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Taichman, R. S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* **105**, 2631-2639, doi:10.1182/blood-2004-06-2480 (2005).
- 2 Ilvesaro, J., Metsikko, K., Vaananen, K. & Tuukkanen, J. Polarity of osteoblasts and osteoblast-like UMR-108 cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **14**, 1338-1344, doi:10.1359/jbmr.1999.14.8.1338 (1999).
- 3 Lories, R. J., Corr, M. & Lane, N. E. To Wnt or not to Wnt: the bone and joint health dilemma. *Nature reviews. Rheumatology* **9**, 328-339, doi:10.1038/nrrheum.2013.25 (2013).
- 4 Matsubara, T. *et al.* BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* **283**, 29119-29125, doi:10.1074/jbc.M801774200 (2008).
- 5 Samee, N. *et al.* Dlx5, a positive regulator of osteoblastogenesis, is essential for osteoblast-osteoclast coupling. *The American journal of pathology* **173**, 773-780, doi:10.2353/ajpath.2008.080243 (2008).
- 6 Liu, Y. H. *et al.* 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. *Developmental biology* **205**, 260-274, doi:10.1006/dbio.1998.9114 (1999).
- 7 Grigoriadis, A. E., Schellander, K., Wang, Z. Q. & Wagner, E. F. Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol* **122**, 685-701 (1993).
- 8 Yousfi, M., Lasmoles, F. & Marie, P. J. TWIST inactivation reduces CBFA1/RUNX2 expression and DNA binding to the osteocalcin promoter in osteoblasts. *Biochemical and biophysical research communications* **297**, 641-644 (2002).
- 9 Hay, E. *et al.* N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *Journal of cellular physiology* **183**, 117-128, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1<117::AID-JCP14>3.0.CO;2-# (2000).
- 10 Chen, G., Deng, C. & Li, Y. P. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences* **8**, 272-288, doi:10.7150/ijbs.2929 (2012).
- 11 Chow, J. W., Wilson, A. J., Chambers, T. J. & Fox, S. W. Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **13**, 1760-1767, doi:10.1359/jbmr.1998.13.11.1760 (1998).
- 12 Poole, K. E. *et al.* Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *Faseb J* **19**, 1842-1844, doi:10.1096/fj.05-4221fje (2005).
- 13 Gu, G., Mulari, M., Peng, Z., Hentunen, T. A. & Vaananen, H. K. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochemical and biophysical research communications* **335**, 1095-1101, doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.211 (2005).
- 14 David, M. *et al.* Lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA1) plays a functional role in osteoclast differentiation and bone resorption activity. *J Biol Chem*, doi:10.1074/jbc.M113.533232 (2014).

- 15 Jurdic, P., Saltel, F., Chabadel, A. & Destaing, O. Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *European journal of cell biology* **85**, 195-202, doi:10.1016/j.ejcb.2005.09.008 (2006).
- 16 Holliday, L. S., Bubb, M. R., Jiang, J., Hurst, I. R. & Zuo, J. Interactions between vacuolar H⁺-ATPases and microfilaments in osteoclasts. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **37**, 419-423, doi:10.1007/s10863-005-9483-y (2005).
- 17 Pfaff, M. & Jurdic, P. Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin alphaVbeta3. *J Cell Sci* **114**, 2775-2786 (2001).
- 18 Li, J. *et al.* 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 (2000).
- 19 Simonet, W. S. *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309-319 (1997).
- 20 Tanaka, S. *et al.* Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* **91**, 257-263, doi:10.1172/JCI116179 (1993).
- 21 Kobayashi, Y., Udagawa, N. & Takahashi, N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* **19**, 61-72 (2009).
- 22 Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. & Smith, J. W. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* **275**, 21785-21788, doi:10.1074/jbc.R000003200 (2000).
- 23 Neve, A., Corrado, A. & Cantatore, F. P. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *Journal of cellular physiology* **228**, 1149-1153, doi:10.1002/jcp.24278 (2013).
- 24 Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D. E. & Gundberg, C. M. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological reviews* **69**, 990-1047 (1989).
- 25 Owen, M. & Triffitt, J. T. Extravascular albumin in bone tissue. *The Journal of physiology* **257**, 293-307 (1976).
- 26 Mbuyi, J. M., Dequeker, J., Bloemmen, F. & Stevens, E. Plasma proteins in human cortical bone: enrichment of alpha 2 HS-glycoprotein, alpha 1 acid-glycoprotein, and IgE. *Calcified tissue international* **34**, 229-231 (1982).
- 27 Mundy, G. R. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **8 Suppl 2**, S505-510, doi:10.1002/jbmr.5650081315 (1993).
- 28 Turner, C. H. & Pavalko, F. M. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association* **3**, 346-355 (1998).
- 29 Bellido, T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcified tissue international* **94**, 25-34, doi:10.1007/s00223-013-9774-y (2014).
- 30 Heino, T. J., Hentunen, T. A. & Vaananen, H. K. Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen. *Journal of cellular biochemistry* **85**, 185-197 (2002).
- 31 Matsuo, K. & Irie, N. Osteoclast-osteoblast communication. *Archives of biochemistry and biophysics* **473**, 201-209, doi:10.1016/j.abb.2008.03.027 (2008).

- 32 Saftig, P. *et al.* Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13453-13458 (1998).
- 33 Everts, V. *et al.* The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **17**, 77-90, doi:10.1359/jbmr.2002.17.1.77 (2002).
- 34 Tang, Y. *et al.* TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med* **15**, 757-765, doi:10.1038/nm.1979 (2009).
- 35 Mundy, G. R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Cancer* **2**, 584-593, doi:10.1038/nrc867 (2002).
- 36 Clines, G. A. & Guise, T. A. Mechanisms and treatment for bone metastases. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* **2**, 295-302 (2004).
- 37 Clezardin, P. & Teti, A. Bone metastasis: pathogenesis and therapeutic implications. *Clin Exp Metastasis* **24**, 599-608, doi:10.1007/s10585-007-9112-8 (2007).
- 38 Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8**, 98-101 (1989).
- 39 Malanchi, I. *et al.* Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* **481**, 85-89, doi:10.1038/nature10694 (2012).
- 40 Li, X. *et al.* A destructive cascade mediated by CCL2 facilitates prostate cancer growth in bone. *Cancer Res* **69**, 1685-1692, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2164 (2009).
- 41 Muller, A. *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50-56, doi:10.1038/35065016 (2001).
- 42 Karparkin, S. & Pearlstein, E. Role of platelets in tumor cell metastases. *Ann Intern Med* **95**, 636-641 (1981).
- 43 Konstantopoulos, K. & Thomas, S. N. Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells. *Annu Rev Biomed Eng* **11**, 177-202, doi:10.1146/annurev-bioeng-061008-124949 (2009).
- 44 Felding-Habermann, B. *et al.* Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1853-1858, doi:10.1073/pnas.98.4.185398/4/1853 [pii] (2001).
- 45 Guo, W. & Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 816-826, doi:10.1038/nrm1490 [pii] (2004).
- 46 Sun, Y. X. *et al.* Expression and activation of alpha v beta 3 integrins by SDF-1/CXC12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells. *The Prostate* **67**, 61-73, doi:10.1002/pros.20500 (2007).
- 47 Kang, Y. *et al.* A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* **3**, 537-549 (2003).
- 48 Richert, M. M. *et al.* Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone. *Oncology reports* **21**, 761-767 (2009).
- 49 Clezardin, P. [The role of RANK/RANKL/osteoprotegerin (OPG) triad in cancer-induced bone diseases: physiopathology and clinical implications]. *Bulletin du cancer* **98**, 837-846, doi:10.1684/bdc.2011.1398 (2011).
- 50 Rucci, N. *et al.* Receptor activator of NF-kappaB ligand enhances breast cancer-induced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147. *Cancer Res* **70**, 6150-6160, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2758 (2010).

- 51 Le Gall, C. *et al.* A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Res* **67**, 9894-9902, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3940 (2007).
- 52 Pecheur, I. *et al.* Integrin alpha(v)beta3 expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *Faseb J* **16**, 1266-1268, doi:10.1096/fj.01-0911fje (2002).
- 53 Zhao, Y. *et al.* Tumor alphavbeta3 integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. *Cancer Res* **67**, 5821-5830, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4499 (2007).
- 54 Schneider, J. G., Amend, S. R. & Weilbaecher, K. N. Integrins and bone metastasis: integrating tumor cell and stromal cell interactions. *Bone* **48**, 54-65, doi:10.1016/j.bone.2010.09.016 (2011).
- 55 Bellahcene, A. *et al.* Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **101**, 135-148, doi:10.1007/s10549-006-9279-8 (2007).
- 56 Zayzafoon, M., Abdulkadir, S. A. & McDonald, J. M. Notch signaling and ERK activation are important for the osteomimetic properties of prostate cancer bone metastatic cell lines. *J Biol Chem* **279**, 3662-3670, doi:10.1074/jbc.M308158200 (2004).
- 57 Guise, T. A. Parathyroid hormone-related protein and bone metastases. *Cancer* **80**, 1572-1580 (1997).
- 58 Shimo, T. *et al.* Pathogenic role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in osteolytic metastasis of breast cancer. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **21**, 1045-1059, doi:10.1359/jbmr.060416 (2006).
- 59 Ara, T. & Declerck, Y. A. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *European journal of cancer* **46**, 1223-1231, doi:10.1016/j.ejca.2010.02.026 (2010).
- 60 Sotiriou, C. *et al.* Interleukins-6 and -11 expression in primary breast cancer and subsequent development of bone metastases. *Cancer Lett* **169**, 87-95 (2001).
- 61 Voorzanger-Rousselot, N. *et al.* Increased Dickkopf-1 expression in breast cancer bone metastases. *Br J Cancer* **97**, 964-970, doi:10.1038/sj.bjc.6603959 (2007).
- 62 Secondini, C., Wetterwald, A., Schwaninger, R., Thalmann, G. N. & Cecchini, M. G. The role of the BMP signaling antagonist noggin in the development of prostate cancer osteolytic bone metastasis. *PLoS One* **6**, e16078, doi:10.1371/journal.pone.0016078 (2011).
- 63 Sanders, J. L. *et al.* 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, doi:10.1210/endo.141.12.7849 (2000).
- 64 Yano, S. *et al.* Calcium-sensing receptor activation stimulates parathyroid hormone-related protein secretion in prostate cancer cells: role of epidermal growth factor receptor transactivation. *Bone* **35**, 664-672, doi:10.1016/j.bone.2004.04.014 (2004).
- 65 Guise, T. A. & Chirgwin, J. M. Transforming growth factor-beta in osteolytic breast cancer bone metastases. *Clin Orthop Relat Res*, S32-38, doi:10.1097/01.blo.0000093055.96273.69 (2003).

- 66 Yin, J. J. *et al.* TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* **103**, 197-206, doi:10.1172/JCI3523 (1999).
- 67 Zhang, J. *et al.* Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J Clin Invest* **107**, 1235-1244, doi:10.1172/JCI11685 (2001).
- 68 Logothetis, C. J. & Lin, S. H. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* **5**, 21-28, doi:10.1038/nrc1528 (2005).
- 69 Yin, J. J. *et al.* A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10954-10959, doi:10.1073/pnas.1830978100 (2003).
- 70 Akech, J. *et al.* Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. *Oncogene* **29**, 811-821, doi:10.1038/onc.2009.389 (2010).
- 71 Aboulafia, A. J., Levine, A. M., Schmidt, D. & Aboulafia, D. Surgical therapy of bone metastases. *Seminars in oncology* **34**, 206-214, doi:10.1053/j.seminoncol.2007.03.002 (2007).
- 72 Santiago, F. R., Del Mar Castellano Garcia, M., Montes, J. L., Garcia, M. R. & Fernandez, J. M. Treatment of bone tumours by radiofrequency thermal ablation. *Current reviews in musculoskeletal medicine* **2**, 43-50, doi:10.1007/s12178-008-9042-3 (2009).
- 73 Lutz, S. *et al.* Palliative radiotherapy for bone metastases: an ASTRO evidence-based guideline. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **79**, 965-976, doi:10.1016/j.ijrobp.2010.11.026 (2011).
- 74 Reddy, E. K., Robinson, R. G. & Mansfield, C. M. Strontium 89 for palliation of bone metastases. *Journal of the National Medical Association* **78**, 27-32 (1986).
- 75 Sartor, O. *et al.* Samarium-153-Lexidronam complex for treatment of painful bone metastases in hormone-refractory prostate cancer. *Urology* **63**, 940-945, doi:10.1016/j.urology.2004.01.034 (2004).
- 76 Roelofs, A. J., Thompson, K., Gordon, S. & Rogers, M. J. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res* **12**, 6222s-6230s, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0843 (2006).
- 77 Woodward, J. K., Neville-Webbe, H. L., Coleman, R. E. & Holen, I. Combined effects of zoledronic acid and doxorubicin on breast cancer cell invasion in vitro. *Anti-cancer drugs* **16**, 845-854 (2005).
- 78 Marx, R. E., Sawatari, Y., Fortin, M. & Broumand, V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **63**, 1567-1575, doi:10.1016/j.joms.2005.07.010 (2005).
- 79 Aapro, M. S. Denosumab for bone metastases from breast cancer: a new therapy option? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, e419-420; author reply e421-414, doi:10.1200/JCO.2010.33.9150 (2011).
- 80 Lipton, A. *et al.* Randomized active-controlled phase II study of denosumab efficacy and safety in patients with breast cancer-related bone metastases. *Journal of clinical*

- oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**, 4431-4437, doi:10.1200/JCO.2007.11.8604 (2007).
- 81 Vogt, W. Pharmacologically active acidic phospholipids and glycolipids. *Biochemical pharmacology* **12**, 415-420 (1963).
- 82 Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X. & Chun, J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* **73**, 321-354, doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073731 (2004).
- 83 Tokumura, A., Fukuzawa, K., Isobe, J. & Tsukatani, H. Lysophosphatidic acid-induced aggregation of human and feline platelets: structure-activity relationship. *Biochemical and biophysical research communications* **99**, 391-398 (1981).
- 84 Tigyi, G. & Miledi, R. Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* **267**, 21360-21367 (1992).
- 85 Meerschaert, K., De Corte, V., De Ville, Y., Vandekerckhove, J. & Gettemans, J. Gelsolin and functionally similar actin-binding proteins are regulated by lysophosphatidic acid. *The EMBO journal* **17**, 5923-5932, doi:10.1093/emboj/17.20.5923 (1998).
- 86 Westermann, A. M. *et al.* Malignant effusions contain lysophosphatidic acid (LPA)-like activity. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **9**, 437-442 (1998).
- 87 Valet, P. *et al.* Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *J Clin Invest* **101**, 1431-1438, doi:10.1172/JCI806 (1998).
- 88 Nakane, S. *et al.* 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate, an arachidonic acid-containing lysophosphatidic acid: occurrence and rapid enzymatic conversion to 2-arachidonoyl-sn-glycerol, a cannabinoid receptor ligand, in rat brain. *Archives of biochemistry and biophysics* **402**, 51-58, doi:10.1016/S0003-9861(02)00038-3 (2002).
- 89 Pages, C., Simon, M. F., Valet, P. & Saulnier-Blache, J. S. Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins & other lipid mediators* **64**, 1-10 (2001).
- 90 Aoki, J., Inoue, A. & Okudaira, S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta* **1781**, 513-518, doi:10.1016/j.bbalip.2008.06.005 (2008).
- 91 Lambeau, G. & Gelb, M. H. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem* **77**, 495-520, doi:10.1146/annurev.biochem.76.062405.154007 (2008).
- 92 Umezu-Goto, M. *et al.* Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* **158**, 227-233, doi:10.1083/jcb.200204026 (2002).
- 93 Tanaka, M. *et al.* Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **281**, 25822-25830, doi:10.1074/jbc.M605142200 (2006).
- 94 McKean, M. L., Smith, J. B. & Silver, M. J. Formation of lysophosphatidylcholine by human platelets in response to thrombin. Support for the phospholipase A2 pathway for the liberation of arachidonic acid. *J Biol Chem* **256**, 1522-1524 (1981).
- 95 Aoki, J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Seminars in cell & developmental biology* **15**, 477-489, doi:10.1016/j.semcdb.2004.05.001 (2004).
- 96 Pages, C., Simon, M., Valet, P. & Saulnier-Blache, J. S. Lysophosphatidic acid synthesis and release(1). *Prostaglandins* **64**, 1-10 (2001).

- 97 Bishop, W. R. & Bell, R. M. Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annual review of cell biology* **4**, 579-610, doi:10.1146/annurev.cb.04.110188.003051 (1988).
- 98 Tanaka, M. *et al.* Prostatic acid phosphatase degrades lysophosphatidic acid in seminal plasma. *FEBS letters* **571**, 197-204, doi:10.1016/j.febslet.2004.06.083 (2004).
- 99 Jasinska, R. *et al.* Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters. *The Biochemical journal* **340 (Pt 3)**, 677-686 (1999).
- 100 Tomsig, J. L. *et al.* Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *The Biochemical journal* **419**, 611-618, doi:10.1042/BJ20081888 (2009).
- 101 Thompson, F. J. & Clark, M. A. Purification of a lysophosphatidic acid-hydrolysing lysophospholipase from rat brain. *The Biochemical journal* **300 (Pt 2)**, 457-461 (1994).
- 102 Ishii, I., Contos, J. J., Fukushima, N. & Chun, J. 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. *Molecular pharmacology* **58**, 895-902 (2000).
- 103 Yung, Y. C., Stoddard, N. C. & Chun, J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res* **55**, 1192-1214, doi:10.1194/jlr.R046458 (2014).
- 104 Ishii, S., Noguchi, K. & Yanagida, K. Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostaglandins & other lipid mediators* **89**, 57-65, doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.06.001 (2009).
- 105 Ohuchi, H. *et al.* Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **237**, 3280-3294, doi:10.1002/dvdy.21736 (2008).
- 106 Fukushima, N., Kimura, Y. & Chun, J. 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 (1998).
- 107 Bandoh, K. *et al.* Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS letters* **478**, 159-165 (2000).
- 108 Yanagida, K., Ishii, S., Hamano, F., Noguchi, K. & Shimizu, T. LPA4/p2y9/GPR23 mediates rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line. *J Biol Chem* **282**, 5814-5824, doi:10.1074/jbc.M610767200 (2007).
- 109 Lee, C. W., Rivera, R., Dubin, A. E. & Chun, J. 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, doi:10.1074/jbc.M610826200 (2007).
- 110 Lee, C. W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A. E. & Chun, J. GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J Biol Chem* **281**, 23589-23597, doi:10.1074/jbc.M603670200 (2006).
- 111 Yanagida, K. *et al.* Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem* **284**, 17731-17741, doi:10.1074/jbc.M808506200 (2009).

- 112 Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A. & Giepmans, B. N. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **26**, 870-881, doi:10.1002/bies.20081 (2004).
- 113 McIntyre, T. M. *et al.* 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, doi:10.1073/pnas.0135855100 (2003).
- 114 Marrache, A. M., Gobeil, F., Zhu, T. & Chemtob, S. Intracellular signaling of lipid mediators via cognate nuclear G protein-coupled receptors. *Endothelium : journal of endothelial cell research* **12**, 63-72, doi:10.1080/10623320590933815 (2005).
- 115 Tigyi, G. Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *British journal of pharmacology* **161**, 241-270, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00815.x (2010).
- 116 Stracke, M. L. *et al.* Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* **267**, 2524-2529 (1992).
- 117 Lee, H. Y. *et al.* Cloning, chromosomal localization, and tissue expression of autotaxin from human teratocarcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* **218**, 714-719, doi:10.1006/bbrc.1996.0127 (1996).
- 118 Kanda, H. *et al.* Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol* **9**, 415-423, doi:10.1038/ni1573 (2008).
- 119 Salous, A. K. *et al.* Mechanism of rapid elimination of lysophosphatidic acid and related lipids from the circulation of mice. *J Lipid Res* **54**, 2775-2784, doi:10.1194/jlr.M039685 (2013).
- 120 Stefan, C., Jansen, S. & Bollen, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends in biochemical sciences* **30**, 542-550, doi:10.1016/j.tibs.2005.08.005 (2005).
- 121 Koike, S., Keino-Masu, K., Ohto, T. & Masu, M. The N-terminal hydrophobic sequence of autotaxin (ENPP2) functions as a signal peptide. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **11**, 133-142, doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00924.x (2006).
- 122 Hausmann, J. *et al.* Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 198-204, doi:10.1038/nsmb.1980 (2011).
- 123 Hausmann, J. *et al.* Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 198-204, doi:10.1038/nsmb.1980 (2011).
- 124 Nishimasu, H. *et al.* Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 205-212, doi:10.1038/nsmb.1998 (2011).
- 125 Moolenaar, W. H. & Perrakis, A. Insights into autotaxin: how to produce and present a lipid mediator. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 674-679, doi:10.1038/nrm3188 (2011).
- 126 Deng, G., Royle, G., Wang, S., Crain, K. & Loskutoff, D. J. 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 (1996).
- 127 Fulkerson, Z. *et al.* Binding of autotaxin to integrins localizes lysophosphatidic acid production to platelets and mammalian cells. *J Biol Chem* **286**, 34654-34663, doi:10.1074/jbc.M111.276725 (2011).
- 128 Mostafavi-Pour, Z. *et al.* Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Biol* **161**, 155-167, doi:10.1083/jcb.200210176 (2003).

- 129 Giganti, A. *et al.* Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *J Biol Chem* **283**, 7776-7789, doi:10.1074/jbc.M708705200 (2008).
- 130 Hashimoto, T. *et al.* Identification and biochemical characterization of a novel autotaxin isoform, ATXdelta, with a four-amino acid deletion. *Journal of biochemistry* **151**, 89-97, doi:10.1093/jb/mvr126 (2012).
- 131 Tokumura, A. *et al.* Increased production of bioactive lysophosphatidic acid by serum lysophospholipase D in human pregnancy. *Biol Reprod* **67**, 1386-1392 (2002).
- 132 Houben, A. J. *et al.* The polybasic insertion in autotaxin alpha confers specific binding to heparin and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **288**, 510-519, doi:10.1074/jbc.M112.358416 (2013).
- 133 Saunders, L. P. *et al.* Kinetic analysis of autotaxin reveals substrate-specific catalytic pathways and a mechanism for lysophosphatidic acid distribution. *J Biol Chem* **286**, 30130-30141, doi:10.1074/jbc.M111.246884 (2011).
- 134 Clair, T. *et al.* Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res* **63**, 5446-5453 (2003).
- 135 van Meeteren, L. A. *et al.* Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* **280**, 21155-21161, doi:10.1074/jbc.M413183200 (2005).
- 136 van Meeteren, L. A. *et al.* Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* **26**, 5015-5022, doi:10.1128/MCB.02419-05 (2006).
- 137 Koike, S., Keino-Masu, K. & Masu, M. Deficiency of autotaxin/lysophospholipase D results in head cavity formation in mouse embryos through the LPA receptor-Rho-ROCK pathway. *Biochemical and biophysical research communications* **400**, 66-71, doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.008 (2010).
- 138 Sumida, H. *et al.* LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood* **116**, 5060-5070, doi:10.1182/blood-2010-03-272443 (2010).
- 139 Fotopoulou, S. *et al.* ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Developmental biology* **339**, 451-464, doi:10.1016/j.ydbio.2010.01.007 (2010).
- 140 Yuelling, L. W., Waggener, C. T., Afshari, F. S., Lister, J. A. & Fuss, B. Autotaxin/ENPP2 regulates oligodendrocyte differentiation in vivo in the developing zebrafish hindbrain. *Glia* **60**, 1605-1618, doi:10.1002/glia.22381 (2012).
- 141 Cheng, H. Y. *et al.* Lysophosphatidic acid signaling protects pulmonary vasculature from hypoxia-induced remodeling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**, 24-32, doi:10.1161/ATVBAHA.111.234708 (2012).
- 142 Nakasaki, T. *et al.* Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions. *The American journal of pathology* **173**, 1566-1576, doi:10.2353/ajpath.2008.071153 (2008).
- 143 Liu, Y. B. *et al.* LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4. *Journal of cellular biochemistry* **109**, 794-800, doi:10.1002/jcb.22471 (2010).
- 144 Panupinthu, N. *et al.* P2X7 receptors on osteoblasts couple to production of lysophosphatidic acid: a signaling axis promoting osteogenesis. *J Cell Biol* **181**, 859-871, doi:10.1083/jcb.200708037 (2008).

- 145 Grey, A. *et al.* 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, doi:10.1210/endo.142.3.8011 (2001).
- 146 Gidley, J., Openshaw, S., Pring, E. T., Sale, S. & Mansell, J. P. Lysophosphatidic acid cooperates with 1 α ,25(OH)2D3 in stimulating human MG63 osteoblast maturation. *Prostaglandins & other lipid mediators* **80**, 46-61, doi:10.1016/j.prostaglandins.2006.04.001 (2006).
- 147 Gennero, I. *et al.* Absence of the lysophosphatidic acid receptor LPA1 results in abnormal bone development and decreased bone mass. *Bone* **49**, 395-403, doi:10.1016/j.bone.2011.04.018 (2011).
- 148 David, M. *et al.* Lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA1) plays a functional role in osteoclast differentiation and bone resorption activity. *J Biol Chem* **289**, 6551-6564, doi:10.1074/jbc.M113.533232 (2014).
- 149 Lapierre, D. M. *et al.* 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, doi:10.1074/jbc.M110.109322 (2010).
- 150 Contos, J. J., Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D. & Chun, J. Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13384-13389, doi:10.1073/pnas.97.24.13384 (2000).
- 151 Roberts, C. *et al.* Neurochemical changes in LPA1 receptor deficient mice--a putative model of schizophrenia. *Neurochemical research* **30**, 371-377 (2005).
- 152 Simon, M. F. *et al.* 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, doi:10.1074/jbc.M412585200 (2005).
- 153 Kingsbury, M. A., Rehen, S. K., Contos, J. J., Higgins, C. M. & Chun, J. Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nature neuroscience* **6**, 1292-1299, doi:10.1038/nn1157 (2003).
- 154 Pradere, J. P. *et al.* LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**, 3110-3118, doi:10.1681/ASN.2007020196 (2007).
- 155 Tager, A. M. *et al.* The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* **14**, 45-54, doi:10.1038/nm1685 (2008).
- 156 Lin, S. *et al.* The absence of LPA2 attenuates tumor formation in an experimental model of colitis-associated cancer. *Gastroenterology* **136**, 1711-1720, doi:10.1053/j.gastro.2009.01.002 (2009).
- 157 Ye, X. *et al.* LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* **435**, 104-108, doi:10.1038/nature03505 (2005).
- 158 Lee, Z. *et al.* Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Molecular biology of the cell* **19**, 5435-5445, doi:10.1091/mbc.E08-03-0316 (2008).
- 159 Pasternack, S. M. *et al.* G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nature genetics* **40**, 329-334, doi:10.1038/ng.84 (2008).
- 160 Barnes, P. J. Th2 cytokines and asthma: an introduction. *Respiratory research* **2**, 64-65 (2001).

- 161 Rubinfeld, J. *et al.* Lysophosphatidic acid enhances interleukin-13 gene expression and promoter activity in T cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **290**, L66-74, doi:10.1152/ajplung.00473.2004 (2006).
- 162 Park, G. Y. *et al.* Autotaxin production of lysophosphatidic acid mediates allergic asthmatic inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* **188**, 928-940, doi:10.1164/rccm.201306-1014OC (2013).
- 163 Swaney, J. S. *et al.* A novel, orally active LPA(1) receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model. *British journal of pharmacology* **160**, 1699-1713, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00828.x (2010).
- 164 Oikonomou, N. *et al.* Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **47**, 566-574, doi:10.1165/rcmb.2012-0004OC (2012).
- 165 Dusaulcy, R. *et al.* Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res* **52**, 1247-1255, doi:10.1194/jlr.M014985 (2011).
- 166 Halberg, N. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol* **29**, 4467-4483, doi:10.1128/MCB.00192-09 (2009).
- 167 Rancoule, C. *et al.* Pro-fibrotic activity of lysophosphatidic acid in adipose tissue: in vivo and in vitro evidence. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 88-96, doi:10.1016/j.bbalip.2013.10.003 (2014).
- 168 Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine* **352**, 1685-1695, doi:10.1056/NEJMra043430 (2005).
- 169 Zhou, Z. *et al.* Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell metabolism* **13**, 592-600, doi:10.1016/j.cmet.2011.02.016 (2011).
- 170 Rother, E. *et al.* Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* **108**, 741-747, doi:10.1161/01.CIR.0000083715.37658.C4 (2003).
- 171 Teo, S. T., Yung, Y. C., Herr, D. R. & Chun, J. Lysophosphatidic acid in vascular development and disease. *IUBMB life* **61**, 791-799, doi:10.1002/iub.220 (2009).
- 172 Pamuklar, Z. *et al.* Autotaxin/lysopholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis. *J Biol Chem* **284**, 7385-7394, doi:10.1074/jbc.M807820200 (2009).
- 173 Watanabe, N. *et al.* Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *Journal of clinical gastroenterology* **41**, 616-623, doi:10.1097/01.mcg.0000225642.90898.0e (2007).
- 174 Watanabe, N. *et al.* Plasma lysophosphatidic acid level and serum autotaxin activity are increased in liver injury in rats in relation to its severity. *Life sciences* **81**, 1009-1015, doi:10.1016/j.lfs.2007.08.013 (2007).
- 175 Ikeda, H. & Yatomi, Y. Autotaxin in liver fibrosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **413**, 1817-1821, doi:10.1016/j.cca.2012.07.014 (2012).
- 176 Kremer, A. E. *et al.* Lysophosphatidic acid is a potential mediator of cholestatic pruritus. *Gastroenterology* **139**, 1008-1018, 1018 e1001, doi:10.1053/j.gastro.2010.05.009 (2010).

- 177 Rancoule, C. *et al.* Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis. *Expert opinion on investigational drugs* **20**, 657-667, doi:10.1517/13543784.2011.566864 (2011).
- 178 Merchant, T. E. *et al.* Phospholipid profiles of human colon cancer using 31P magnetic resonance spectroscopy. *International journal of colorectal disease* **6**, 121-126 (1991).
- 179 Mills, G. B. & Moolenaar, W. H. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 582-591, doi:10.1038/nrc1143 (2003).
- 180 Sasagawa, T., Okita, M., Murakami, J., Kato, T. & Watanabe, A. Abnormal serum lysophospholipids in multiple myeloma patients. *Lipids* **34**, 17-21 (1999).
- 181 Baker, D. L. *et al.* Plasma lysophosphatidic acid concentration and ovarian cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **287**, 3081-3082 (2002).
- 182 Eder, A. M., Sasagawa, T., Mao, M., Aoki, J. & Mills, G. B. Constitutive and lysophosphatidic acid (LPA)-induced LPA production: role of phospholipase D and phospholipase A2. *Clin Cancer Res* **6**, 2482-2491 (2000).
- 183 Furui, T. *et al.* Overexpression of edg-2/vzg-1 induces apoptosis and anoikis in ovarian cancer cells in a lysophosphatidic acid-independent manner. *Clin Cancer Res* **5**, 4308-4318 (1999).
- 184 Goetzl, E. J. *et al.* Distinctive expression and functions of the type 4 endothelial differentiation gene-encoded G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid in ovarian cancer. *Cancer Res* **59**, 5370-5375 (1999).
- 185 Sutphen, R. *et al.* Lysophospholipids are potential biomarkers of ovarian cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **13**, 1185-1191 (2004).
- 186 Pustilnik, T. B. *et al.* Lysophosphatidic acid induces urokinase secretion by ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* **5**, 3704-3710 (1999).
- 187 Shida, D. *et al.* Lysophosphatidic acid (LPA) enhances the metastatic potential of human colon carcinoma DLD1 cells through LPA1. *Cancer Res* **63**, 1706-1711 (2003).
- 188 Schulte, K. M., Beyer, A., Kohrer, K., Oberhauser, S. & Roher, H. D. Lysophosphatidic acid, a novel lipid growth factor for human thyroid cells: over-expression of the high-affinity receptor edg4 in differentiated thyroid cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **92**, 249-256 (2001).
- 189 Kitayama, J. *et al.* Over-expression of lysophosphatidic acid receptor-2 in human invasive ductal carcinoma. *Breast cancer research : BCR* **6**, R640-646, doi:10.1186/bcr935 (2004).
- 190 Shida, D. *et al.* Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **84**, 1352-1362, doi:10.1038/labinvest.3700146 (2004).
- 191 Tsujiuchi, T., Okabe, K. & Fukushima, N. Genetic and epigenetic alterations of lysophosphatidic Acid receptor genes in rodent tumors by experimental models. *Journal of toxicologic pathology* **24**, 143-148, doi:10.1293/tox.24.143 (2011).
- 192 Jongsma, M., Matas-Rico, E., Rzadkowski, A., Jalink, K. & Moolenaar, W. H. LPA is a chemorepellent for B16 melanoma cells: action through the cAMP-elevating LPA5 receptor. *PLoS One* **6**, e29260, doi:10.1371/journal.pone.0029260 (2011).

- 193 Lee, S. *et al.* Forerunner genes contiguous to RB1 contribute to the development of in situ neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13732-13737, doi:10.1073/pnas.0701771104 (2007).
- 194 Majewski, T. *et al.* Understanding the development of human bladder cancer by using a whole-organ genomic mapping strategy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **88**, 694-721, doi:10.1038/labinvest.2008.27 (2008).
- 195 David, M. *et al.* Targeting lysophosphatidic acid receptor type 1 with Debio 0719 inhibits spontaneous metastasis dissemination of breast cancer cells independently of cell proliferation and angiogenesis. *International journal of oncology* **40**, 1133-1141, doi:10.3892/ijo.2011.1309 (2012).
- 196 Yu, S. *et al.* Lysophosphatidic acid receptors determine tumorigenicity and aggressiveness of ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst* **100**, 1630-1642, doi:10.1093/jnci/djn378 (2008).
- 197 Jeong, K. J. *et al.* The Rho/ROCK pathway for lysophosphatidic acid-induced proteolytic enzyme expression and ovarian cancer cell invasion. *Oncogene* **31**, 4279-4289, doi:10.1038/onc.2011.595 (2012).
- 198 Park, S. Y. *et al.* Lysophosphatidic acid augments human hepatocellular carcinoma cell invasion through LPA1 receptor and MMP-9 expression. *Oncogene* **30**, 1351-1359, doi:10.1038/onc.2010.517 (2011).
- 199 Hope, J. M. *et al.* LPA receptor 2 mediates LPA-induced endometrial cancer invasion. *Gynecologic oncology* **112**, 215-223, doi:10.1016/j.ygyno.2008.09.019 (2009).
- 200 Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**, 669-676, doi:10.1038/nm0603-669 (2003).
- 201 Hu, Y. L. *et al.* Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst* **93**, 762-768 (2001).
- 202 Fujita, T. *et al.* Expression of lysophosphatidic acid receptors and vascular endothelial growth factor mediating lysophosphatidic acid in the development of human ovarian cancer. *Cancer Lett* **192**, 161-169 (2003).
- 203 Su, S. C. *et al.* Autotaxin-lysophosphatidic acid signaling axis mediates tumorigenesis and development of acquired resistance to sunitinib in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **19**, 6461-6472, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1284 (2013).
- 204 Lin, C. I. *et al.* Lysophosphatidic acid regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through LPA1 and LPA3. *Biochemical and biophysical research communications* **363**, 1001-1008, doi:10.1016/j.bbrc.2007.09.081 (2007).
- 205 Liu, S. *et al.* Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell* **15**, 539-550, doi:10.1016/j.ccr.2009.03.027 (2009).
- 206 Gillet, J. P. & Gottesman, M. M. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods in molecular biology* **596**, 47-76, doi:10.1007/978-1-60761-416-6_4 (2010).
- 207 Fukui, R. *et al.* Enhancement of Drug Resistance by Lysophosphatidic Acid Receptor-3 in Mouse Mammary Tumor FM3A Cells. *Journal of toxicologic pathology* **25**, 225-228, doi:10.1293/tox.25.225 (2012).
- 208 Kawagoe, H., Stracke, M. L., Nakamura, H. & Sano, K. Expression and transcriptional regulation of the PD-lalpha/autotaxin gene in neuroblastoma. *Cancer Res* **57**, 2516-2521 (1997).

- 209 Hoelzinger, D. B. *et al.* Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia* **7**, 7-16, doi:10.1593/neo.04535 (2005).
- 210 Zhang, G., Zhao, Z., Xu, S., Ni, L. & Wang, X. Expression of autotaxin mRNA in human hepatocellular carcinoma. *Chinese medical journal* **112**, 330-332 (1999).
- 211 Stassar, M. J. *et al.* Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer* **85**, 1372-1382, doi:10.1054/bjoc.2001.2074 (2001).
- 212 Kehlen, A. *et al.* Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinomas. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **109**, 833-838, doi:10.1002/ijc.20022 (2004).
- 213 Yang, S. Y. *et al.* Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* **19**, 603-608 (2002).
- 214 Yang, Y., Mou, L., Liu, N. & Tsao, M. S. Autotaxin expression in non-small-cell lung cancer. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **21**, 216-222, doi:10.1165/ajrcmb.21.2.3667 (1999).
- 215 Masuda, A. *et al.* Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma. *British journal of haematology* **143**, 60-70, doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07325.x (2008).
- 216 Wu, J. M. *et al.* Autotaxin expression and its connection with the TNF-alpha-NF-kappaB axis in human hepatocellular carcinoma. *Molecular cancer* **9**, 71, doi:10.1186/1476-4598-9-71 (2010).
- 217 Zirn, B. *et al.* Target genes of the WNT/beta-catenin pathway in Wilms tumors. *Genes, chromosomes & cancer* **45**, 565-574, doi:10.1002/gcc.20319 (2006).
- 218 Tice, D. A. *et al.* Synergistic induction of tumor antigens by Wnt-1 signaling and retinoic acid revealed by gene expression profiling. *J Biol Chem* **277**, 14329-14335, doi:10.1074/jbc.M200334200 (2002).
- 219 Black, E. J., Clair, T., Delrow, J., Neiman, P. & Gillespie, D. A. 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, doi:10.1038/sj.onc.1207377 (2004).
- 220 Dufner-Beattie, J., Lemons, R. S. & Thorburn, A. Retinoic acid-induced expression of autotaxin in N-myc-amplified neuroblastoma cells. *Molecular carcinogenesis* **30**, 181-189 (2001).
- 221 Chen, M. & O'Connor, K. L. Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells. *Oncogene* **24**, 5125-5130, doi:10.1038/sj.onc.1208729 (2005).
- 222 Nam, S. W. *et al.* Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor. *Cancer Res* **61**, 6938-6944 (2001).
- 223 David, M. *et al.* Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts. *PLoS One* **5**, e9741, doi:10.1371/journal.pone.0009741 (2010).
- 224 Houben, A. J. & Moolenaar, W. H. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **30**, 557-565, doi:10.1007/s10555-011-9319-7 (2011).
- 225 Nakai, Y. *et al.* Specific increase in serum autotaxin activity in patients with pancreatic cancer. *Clinical biochemistry* **44**, 576-581, doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.03.128 (2011).

- 226 Lu, Y. *et al.* A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS medicine* **3**, e467, doi:10.1371/journal.pmed.0030467 (2006).
- 227 Peyruchaud, O. *et al.* Early detection of bone metastases in a murine model using fluorescent human breast cancer cells: application to the use of the bisphosphonate zoledronic acid in the treatment of osteolytic lesions. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **16**, 2027-2034, doi:10.1359/jbmr.2001.16.11.2027 (2001).
- 228 Boucharaba, A. *et al.* The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9643-9648, doi:10.1073/pnas.0600979103 (2006).
- 229 Ohta, H. *et al.* Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. *Molecular pharmacology* **64**, 994-1005, doi:10.1124/mol.64.4.994 (2003).
- 230 Gupta, G. P. & Massague, J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J Clin Invest* **114**, 1691-1693, doi:10.1172/JCI23823 (2004).
- 231 Boucharaba, A. *et al.* Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest* **114**, 1714-1725, doi:10.1172/JCI22123 (2004).
- 232 Aoki, J. *et al.* Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem* **277**, 48737-48744, doi:10.1074/jbc.M206812200 (2002).
- 233 Pamuklar, Z. *et al.* Autotaxin/lysopholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis. *J Biol Chem* **284**, 7385-7394, doi:10.1074/jbc.M807820200 (2009).
- 234 Daaka, Y. Mitogenic action of LPA in prostate. *Biochim Biophys Acta* **1582**, 265-269 (2002).
- 235 Xie, Y., Gibbs, T. C., Mukhin, Y. V. & Meier, K. E. Role for 18:1 lysophosphatidic acid as an autocrine mediator in prostate cancer cells. *J Biol Chem* **277**, 32516-32526, doi:10.1074/jbc.M203864200 (2002).
- 236 Li, Y. & Sarkar, F. H. Down-regulation of invasion and angiogenesis-related genes identified by cDNA microarray analysis of PC3 prostate cancer cells treated with genistein. *Cancer Lett* **186**, 157-164 (2002).
- 237 Guo, R. *et al.* Expression and function of lysophosphatidic acid LPA1 receptor in prostate cancer cells. *Endocrinology* **147**, 4883-4892, doi:10.1210/en.2005-1635 (2006).
- 238 Sivashanmugam, P., Tang, L. & Daaka, Y. Interleukin 6 mediates the lysophosphatidic acid-regulated cross-talk between stromal and epithelial prostate cancer cells. *J Biol Chem* **279**, 21154-21159, doi:10.1074/jbc.M313776200 (2004).
- 239 Hartman, Z. C. *et al.* Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res* **73**, 3470-3480, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4524-T (2013).
- 240 Choi, J. W. *et al.* LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annual review of pharmacology and toxicology* **50**, 157-186, doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105753 (2010).
- 241 Parrill, A. L. & Tigyi, G. Integrating the puzzle pieces: the current atomistic picture of phospholipid-G protein coupled receptor interactions. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 2-12, doi:10.1016/j.bbalip.2012.09.002 (2013).

- 242 van Meeteren, L. A., Brinkmann, V., Saulnier-Blache, J. S., Lynch, K. R. & Moolenaar, W. H. Anticancer activity of FTY720: phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D. *Cancer Lett* **266**, 203-208, doi:10.1016/j.canlet.2008.02.052 (2008).
- 243 Ferry, G. *et al.* S32826, a nanomolar inhibitor of autotaxin: discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **327**, 809-819, doi:10.1124/jpet.108.141911 (2008).
- 244 Albers, H. M. *et al.* Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7257-7262, doi:10.1073/pnas.1001529107 (2010).
- 245 Gierse, J. *et al.* A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **334**, 310-317, doi:10.1124/jpet.110.165845 (2010).
- 246 Saga, H. *et al.* A novel highly potent autotaxin/ENPP2 inhibitor produces prolonged decreases in plasma lysophosphatidic acid formation in vivo and regulates urethral tension. *PLoS One* **9**, e93230, doi:10.1371/journal.pone.0093230 (2014).
- 247 Benesch, M. G. *et al.* Inhibition of autotaxin delays breast tumor growth and lung metastasis in mice. *Faseb J* **28**, 2655-2666, doi:10.1096/fj.13-248641 (2014).
- 248 Body, J. J. New developments for treatment and prevention of bone metastases. *Current opinion in oncology* **23**, 338-342, doi:10.1097/CCO.0b013e328347918b (2011).
- 249 Gupte, R. *et al.* Benzyl and naphthalene methylphosphonic acid inhibitors of autotaxin with anti-invasive and anti-metastatic activity. *ChemMedChem* **6**, 922-935, doi:10.1002/cmdc.201000425 (2011).
- 250 Tarui, T. *et al.* Direct interaction of the kringle domain of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and integrin alpha v beta 3 induces signal transduction and enhances plasminogen activation. *Thromb Haemost* **95**, 524-534, doi:10.1267/THRO06030524 (2006).
- 251 Chen, Z., Hu, M. & Shivdasani, R. A. Expression analysis of primary mouse megakaryocyte differentiation and its application in identifying stage-specific molecular markers and a novel transcriptional target of NF-E2. *Blood* **109**, 1451-1459, doi:10.1182/blood-2006-08-038901 (2007).
- 252 Fells, J. I. *et al.* Hits of a high-throughput screen identify the hydrophobic pocket of autotaxin/lysophospholipase D as an inhibitory surface. *Molecular pharmacology* **84**, 415-424, doi:10.1124/mol.113.087080 (2013).
- 253 VanGuilder, H. D., Vrana, K. E. & Freeman, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* **44**, 619-626, doi:10.2144/000112776 (2008).
- 254 Yoneda, T. *et al.* Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer* **88**, 2979-2988 (2000).
- 255 Lelekakis, M. *et al.* A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis* **17**, 163-170 (1999).
- 256 Moolenaar, W. H. & Perrakis, A. Insights into autotaxin: how to produce and present a lipid mediator. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 674-679, doi:10.1038/nrm3188 (2011).
- 257 Bernfield, M. *et al.* Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* **68**, 729-777, doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.729 (1999).

- 258 Handagama, P., Rappolee, D. A., Werb, Z., Levin, J. & Bainton, D. F. Platelet alpha-granule fibrinogen, albumin, and immunoglobulin G are not synthesized by rat and mouse megakaryocytes. *J Clin Invest* **86**, 1364-1368, doi:10.1172/JCI114848 (1990).
- 259 Benesch, M. G., Ko, Y. M., McMullen, T. P. & Brindley, D. N. Autotaxin in the crosshairs: Taking aim at cancer and other inflammatory conditions. *FEBS letters* **588**, 2712-2727, doi:10.1016/j.febslet.2014.02.009 (2014).
- 260 Madan, D., Ferguson, C. G., Lee, W. Y., Prestwich, G. D. & Testa, C. A. Non-invasive imaging of tumors by monitoring autotaxin activity using an enzyme-activated near-infrared fluorogenic substrate. *PLoS One* **8**, e79065, doi:10.1371/journal.pone.0079065 (2013).
- 261 Pellikainen, J. M. *et al.* Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res* **10**, 7621-7628, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1061 (2004).
- 262 Silletti, S., Kessler, T., Goldberg, J., Boger, D. L. & Cheresh, D. A. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha vbeta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 119-124, doi:10.1073/pnas.011343298 (2001).
- 263 Iozzo, R. V. & Sanderson, R. D. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine* **15**, 1013-1031, doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x (2011).
- 264 Barbareschi, M. *et al.* High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer* **98**, 474-483, doi:10.1002/cncr.11515 (2003).
- 265 Andersen, N. F. *et al.* Syndecan-1 and angiogenic cytokines in multiple myeloma: correlation with bone marrow angiogenesis and survival. *British journal of haematology* **128**, 210-217, doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05299.x (2005).
- 266 Charni, F. *et al.* Syndecan-1 and syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 1314-1326, doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.015 (2009).
- 267 Xian, X., Gopal, S. & Couchman, J. R. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell and tissue research* **339**, 31-46, doi:10.1007/s00441-009-0829-3 (2010).
- 268 McFall, A. J. & Rapraeger, A. C. Identification of an adhesion site within the syndecan-4 extracellular protein domain. *J Biol Chem* **272**, 12901-12904 (1997).
- 269 Whiteford, J. R. & Couchman, J. R. A conserved NXIP motif is required for cell adhesion properties of the syndecan-4 ectodomain. *J Biol Chem* **281**, 32156-32163, doi:10.1074/jbc.M605553200 (2006).
- 270 Lewit-Bentley, A. & Rety, S. EF-hand calcium-binding proteins. *Current opinion in structural biology* **10**, 637-643 (2000).
- 271 Kong, M. *et al.* Thy-1-mediated cell-cell contact induces astrocyte migration through the engagement of alphaVbeta3 integrin and syndecan-4. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 1409-1420, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.02.013 (2013).
- 272 Blair, P. & Flaumenhaft, R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews* **23**, 177-189, doi:10.1016/j.blre.2009.04.001 (2009).
- 273 Sehgal, S. & Storrie, B. Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential

- release. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **5**, 2009-2016, doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02698.x (2007).
- 274 Handagama, P., Scarborough, R. M., Shuman, M. A. & Bainton, D. F. Endocytosis of fibrinogen into megakaryocyte and platelet alpha-granules is mediated by alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa). *Blood* **82**, 135-138 (1993).
- 275 Nikitopoulou, I. *et al.* Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *The Journal of experimental medicine* **209**, 925-933, doi:10.1084/jem.20112012 (2012).
- 276 Wu, T. *et al.* Integrin-mediated cell surface recruitment of autotaxin promotes persistent directional cell migration. *Faseb J* **28**, 861-870, doi:10.1096/fj.13-232868 (2014).
- 277 Tang, X. *et al.* Lipid phosphate phosphatase-1 expression in cancer cells attenuates tumor growth and metastasis in mice. *J Lipid Res*, doi:10.1194/jlr.M053462 (2014).
- 278 Imai, A., Furui, T., Tamaya, T. & Mills, G. B. A gonadotropin-releasing hormone-responsive phosphatase hydrolyses lysophosphatidic acid within the plasma membrane of ovarian cancer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **85**, 3370-3375, doi:10.1210/jcem.85.9.6793 (2000).
- 279 Peyruchaud, O., Leblanc, R. & David, M. Pleiotropic activity of lysophosphatidic acid in bone metastasis. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 99-104, doi:10.1016/j.bbailip.2012.06.004 (2013).
- 280 Romas, E., Gillespie, M. T. & Martin, T. J. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* **30**, 340-346 (2002).
- 281 Bourgoin, S. G. & Zhao, C. Autotaxin and lysophospholipids in rheumatoid arthritis. *Current opinion in investigational drugs* **11**, 515-526 (2010).