



HAL
open science

Établissement précoce des cellules métastatiques dans la moelle osseuse : implication d'une forme non glycosylée du récepteur de guidage axonal ROBO4

Lise Clément-Demange

► To cite this version:

Lise Clément-Demange. Établissement précoce des cellules métastatiques dans la moelle osseuse : implication d'une forme non glycosylée du récepteur de guidage axonal ROBO4. Biologie moléculaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10077 . tel-01229550

HAL Id: tel-01229550

<https://theses.hal.science/tel-01229550>

Submitted on 16 Nov 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.

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

En vue de l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES DE LA VIE (arrêté du 7 août 2006)

Délivré par :
L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE INTÉGRATIVE ET CELLULAIRE

soutenue publiquement le 15 juin 2015 par

Lise CLÉMENT-DEMANGE

**ÉTABLISSEMENT PRÉCOCE DES CELLULES
MÉTASTATIQUES DANS LA MOELLE OSSEUSE :
IMPLICATION D'UNE FORME NON GLYCOSYLÉE DU
RÉCEPTEUR DE GUIDAGE AXONAL ROBO4**

Directeur de thèse : Dr Chantal DIAZ

MEMBRES DU JURY :

Pr Marie-Hélène LAFAGE-PROUST	Président du jury
Dr Akeila BELLAHCÈNE	Rapporteur
Dr Marie-Caroline LE BOUSSE-KERDILÈS	Rapporteur
Dr Frédéric MORET	Examineur
Dr Chantal DIAZ	Directeur de thèse
Dr Philippe CLÉZARDIN	Directeur de l'UMR 1033

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	M. François-Noël GILLY
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme Caroline FELIX
Département GEP	Directeur : M. le Professeur Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

«Une journée sans rire est une journée perdue»
Charles Chaplin

Remerciements

Ma première pensée s'adresse à ma Directrice de thèse, Chantal Diaz, pour m'avoir "embarquée" dans cette aventure scientifique et humaine. Tu as été l'encadrante motivante et motivée qui m'a permis de devenir autonome scientifiquement, de découvrir les joies de l'enseignement et de travailler tous les jours dans la bonne humeur.

Je remercie également le Dr Philippe Clézardin pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour m'avoir apporté tout le soutien scientifique et matériel et de m'avoir permis de participer à plusieurs congrès à travers le monde (et apporter mon poster ...).

J'exprime également mes profonds remerciements au Dr Akeila Bellahcène et au Dr Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit et apporté leurs critiques constructives. Je tiens également à exprimer mes remerciements au Pr Marie-Hélène Lafage-Proust et au Dr Frédéric Moret pour m'avoir suivie depuis mes débuts lors de mes comités de thèse et pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de soutenance.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui ont partagé mon quotidien pendant ces dernières années. Marie-Claude pour avoir "oxygéné" mes pauses repas et pour son efficacité (et pour être restée jusqu'à la fin de mes trois ans de thèse). Lamia, la maman idéale que je voudrais devenir. Mathilde, qui a remotivé toute l'unité à passer les concours. Sacha, la dresseuse de Pokéclast®. Sandra, Johnny, Tristan et Elodie pour leur bonne humeur. François "mon" stagiaire devenu grand qui correspond pratiquement au stagiaire parfait (intéressé, intéressant et ... gaffeur !) et son acolyte Geoffrey. Martine pour son aide précieuse et tous les bons moments partagés. Casina pour avoir discuté avec moi malgré mon anglais très moyen. Caroline pour m'avoir accompagnée lors de mes premiers pas sur le sol américain et Cyrille pour m'avoir motivée à y retourner. Je remercie également Christine, Irma, Olivier, Édith et de manière générale tous les autres membres du laboratoire avec qui j'ai pu échanger et discuter.

Je souhaite aussi remercier ma famille pour son soutien, pour m'avoir transmis son sens de l'humour (merci papa, c'est toujours utile pour détendre l'atmosphère) et son sens critique (merci maman, cela est essentiel pour une scientifique). Merci à ma sœur qui fait des études de rêves dans un lieu magique qu'est l'École du Louvre et merci à BPG et BMF pour m'avoir chouchoutée à chaque venue chez eux.

Et si ces trois années de thèse se sont aussi bien déroulées, c'est aussi grâce à ceux qui ont occupé nombres de mes soirées et week-ends. Guillaume pour nos blagues et nos marches en pleine montagne qui durent depuis la maternelle et je l'espère pour encore longtemps ! Mes trois Grâces (et pas grasses :p) Anaïs, Béné et Marion ainsi que Sylvain, Vincent, Elsa, Jérôme et Jess pour m'avoir fait passer des soirées magiques. Merci les amis ! Une pensée émue pour les deux américains que j'aurais vraiment aimé avoir à mes côtés en cette journée. Bastien, mon premier colocataire, qui m'a permis de m'installer dans la ville des lumières et qui m'a fait découvrir Lyon au rythme de ses études (notamment Confluence avant la rénovation du quartier ...). Joe, pour ses discussions passionnées et Anaïs (qui le supporte). Sophia qui a suivi l'avancée de ma thèse à chaque rencontre et qui était notre caution sécurité (ou pas ^^) pour nos soirées. Je pense aussi à l'équipe vélo et spécialement à mon cher William, à Guillaume (Team #Scientifique), à Bastien (mon fournisseur officiel de pièces détachées de vélo), à Mika et ses chocolatinas, ... Mais également aux filles qui ont rejoint petit à petit le groupe (Julie, Lou, Lucie, Lénaïc). Il y a également ceux qui me suivent de plus loin mais qui sont toujours présents. Je pense à mes premières rencontres à l'Université Lyon1, Elodie, Benjamin, Chloé, Alexandra, Mathilde, Aurélie et à nos soirées crêpes annuelles ainsi qu'à Dee, Manu et Bastien pour nos soirées jeux et Game of Thrones.

Plus largement je remercie toutes les personnes que j'ai croisées qui m'ont aidée personnellement ou professionnellement à avancer et que j'ai pu, malencontreusement, oublier de citer.

Et pour finir, bien entendu, je remercie mon amoureux qui m'aurait donné ma thèse dès ma 1^{ère} journée à l'Université. Ce n'est donc pas peu dire qu'il m'a soutenue !! Et j'espère que la suite de l'aventure sera toujours aussi chouette :)

Résumé

Établissement précoce des cellules métastatiques dans la moelle osseuse : implication d'une forme non glycosylée du récepteur de guidage axonal ROBO4

Les métastases osseuses sont des complications de nombreux cancers tels que le cancer du poumon, du sein et de la prostate. Chez la femme, 70% des patientes présentant un cancer du sein avancé développent des métastases principalement ostéolytiques. Ce type de métastases est associé à une destruction importante de l'os causant chez les patientes des douleurs osseuses et des fractures pathologiques. Les traitements actuellement dispensés tels que les bisphosphonates et le denosumab ne sont pas curatifs mais seulement palliatifs, il est donc indispensable d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la progression métastatique afin d'améliorer le pronostic et d'imaginer de nouvelles approches thérapeutiques.

Dans ce contexte, une analyse transcriptomique comparative a montré que les gènes codant les récepteurs de guidage axonal ROBO1 et ROBO4 étaient surexprimés dans une sous-population de cellules de cancer du sein MDA-MB-231 qui métastasent spécifiquement à l'os (nommée B02). De manière intéressante, une expression élevée de *ROBO4* dans les tumeurs primaires de patientes atteintes d'un cancer du sein corrèle avec un mauvais pronostic et un risque accru de rechute à l'os. Chez la souris, une réduction de 50% de la charge tumorale a été observée lorsque les cellules B02 déplétées en ROBO4 ont été inoculées dans la glande mammaire de souris ; et le ciblage des cellules parentales B02 avec un anticorps anti-ROBO4 avant l'injection intra-tibiale diminue l'incidence de la formation de colonies de cellules tumorales. *In vitro*, la co-culture des cellules B02 avec des cellules ostéoblastiques murines MC3T3-E1 a entraîné une augmentation de la production de SLIT2, le ligand naturel des récepteurs ROBO, par les cellules MC3T3-E1. De plus, le traitement avec un anticorps anti-ROBO4 réduit considérablement l'adhésion des cellules B02 sur les cellules MC3T3-E1. Par ailleurs, la surexpression de *ROBO4* dans d'autres modèles cellulaires de cancer du sein a conduit à mettre en évidence la présence d'une glycoforme de ROBO4. L'étude des deux isoformes de ROBO4 (glycosylée et non glycosylée) a révélé le caractère agressif de la forme non glycosylée comparée à la forme glycosylée.

Ces résultats fournissent des preuves solides que le récepteur de guidage axonal ROBO4 est impliqué dans la formation de métastases osseuses et que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la forme non glycosylée de ce récepteur pourrait conduire à la mise au point de thérapies innovantes pour empêcher la formation de métastases dans la moelle osseuse.

Mots-clés : ROBO4, métastases osseuses, cancer du sein, outil thérapeutique

Abstract

Early establishment of metastatic cells in the bone marrow: involvement of a non-glycosylated form of axon guidance receptor ROBO4

Bone metastasis is a complication of many cancers such as lung, breast and prostate. In women, 70% of patients with advanced breast cancer predominantly develop osteolytic metastases. This type of metastasis is associated with significant bone destruction in patients causing bone pain and pathological fractures. The current treatments, such as bisphosphonates and denosumab, are not curative but only palliative, so it is essential to identify new factors involved in the metastatic progression to improve prognosis and to devise new therapeutic approaches.

In this context, a comparative transcriptomic analysis demonstrated that axon guidance ROBO1 and ROBO4 receptors were overexpressed in a subpopulation of MDA-MB-231 breast cancer cells that only metastasize to bone (referred to as B02). Interestingly, high *ROBO4* expression in primary tumors from patients with breast cancer correlated with poor prognosis and increased risk of relapse to bone. In mice, a 50% reduction in tumor burden was observed when ROBO4-depleted B02 cells were inoculated in the mammary fat pad of mice; and targeting of parental B02 cells with an anti-ROBO4 antibody before intra-tibia inoculation decreased the incidence of tumor cell colony formation. *In vitro*, the co-culture of B02 cells with murine MC3T3-E1 osteoblastic cells increased SLIT2 production, the primary ligand of ROBO receptors, by MC3T3 cells. Further, the treatment with an anti-ROBO4 antibody dramatically reduced B02 cell adhesion to MC3T3-E1 cells. Moreover, over-expression of *ROBO4* in other models of breast cancer led to the discovery of a glycoform of ROBO4. The study of the two ROBO4 isoforms (glycosylated and non-glycosylated) revealed the aggressive nature of the non-glycosylated form compared to the glycosylated form.

These results provide strong evidence that the axon guidance receptor ROBO4 is involved in bone metastasis formation and that the use of an antibody directed against the non-glycosylated form of this receptor could lead to the development of innovative therapies to prevent metastasis formation in the bone marrow.

Keywords : ROBO4, bone metastasis, breast cancer, therapeutic tool

Sommaire

Remerciements.....	4
Résumé.....	6
Abstract	7
Sommaire	8
Liste des illustrations	12
Liste des tableaux	15
Liste des abréviations	16
PARTIE I : Avant-propos	19
PARTIE II : Etat de l'art	22
A- Physiologie osseuse.....	23
1- Tissu osseux	23
1.1- Anatomie du tissu osseux (organisation macroscopique).....	23
1.1.1- Structure de l'os.....	23
1.1.2- Vascularisation	24
1.2.3- Innervation.....	25
1.2- Composition du tissu osseux (organisation microscopique)	26
1.2.1- Matrice organique.....	27
1.2.2- Matrice inorganique	28
2- Cellules du tissu osseux	28
2.1- Architecture osseuse	28
2.1.1- Ostéoclastes	28
2.1.2- Ostéoblastes	30
2.1.3- Ostéocytes.....	33
2.1.4- Ostéomacrophages	34
2.2- Niches hématopoïétiques médullaires.....	34
2.2.1- Cellules souches hématopoïétiques.....	34
2.2.2- Niche endostéale.....	36
2.2.3- Niche vasculaire	37

2.2.4- Niche mésenchymateuse.....	37
3- Remodelage osseux.....	38
3.1- Processus du remodelage osseux	38
3-2. Canopée	39
3.3- Régulation du remodelage osseux	40
3.3.1- Facteurs systémiques	40
3.3.2- Facteurs locaux	42
3.3.3- Le système RANK/RANKL/OPG	44
3.3.4- Les molécules de guidage axonal	45
3.3.4.1- Éphrines/EPH	45
3.3.4.2- Sémaphorines/plexines, neuropilines	46
B- Les métastases osseuses des carcinomes mammaires	48
1- Cancers du sein	48
1.1- Grades du cancer du sein.....	48
1.2- Stades du cancer du sein	49
1.3- Classification moléculaire	49
2- Processus métastatique	50
2.1- Invasion locale et transition épithélio-mésenchymateuse	51
2.2- Circulation dans le sang.....	52
2.3- Extravasation.....	52
2.4- Colonisation et transition mésenchymo-épithéliale	53
3- Ostéotropisme	55
3.1- Niche pré-métastatique.....	55
3.2- Chimiotactisme	56
3.3- Nidation dans la moelle osseuse.....	58
3.4- Ostéomimétisme.....	58
4- Métastases ostéolytiques	59
4.1- Stimulateurs de la résorption osseuse.....	60
4.2- Inhibiteurs de la formation osseuse	62
4.3- Contribution du tissu osseux	62
5- Stratégies thérapeutiques médicamenteuses.....	65

5.1- Thérapies ciblant les ostéoclastes.....	66
5.2- Thérapies ciblant les ostéoblastes.....	67
5.3- Thérapies ciblant le microenvironnement osseux.....	68
5.4- Thérapies ciblant les cellules dormantes.....	70
C- Les récepteurs de guidage axonal roundabout dans le développement tumoral.....	72
1- Les récepteurs ROBO et leurs ligands SLIT.....	73
1.1- Structure.....	73
1.2- Liaison SLIT/ROBO.....	75
1.2.1- Structure cristallographique.....	75
1.2.2- Ménage à 3 ?.....	75
1.2.3- Dimérisation.....	76
1.2.4- Quel ligand pour ROBO4 ?.....	78
1.3- Régulation.....	79
1.3.1- Régulations épigénétiques par méthylation des promoteurs.....	79
1.3.2- Régulations transcriptionnelles de <i>ROBO4</i>	79
1.3.3- Variants.....	80
1.3.4- Clivages.....	80
1.3.4.1- SLIT.....	80
1.3.4.2- ROBO.....	81
1.3.5- Répression par miR-218.....	82
1.3.6- Commissureless (COMM).....	83
1.3.7- USP33.....	84
1.4- Voies de signalisation.....	85
1.4.1- Rho GTPases.....	85
1.4.2- Effecteurs cytoplasmiques.....	86
1.4.2.1- ABL et MENA.....	86
1.4.2.2- Protéines WASP.....	87
2- Fonctions de la voie SLIT/ROBO dans la progression tumorale.....	87
2.1- Altérations géniques.....	87
2.2- Survie/prolifération.....	89
2.3- Mobilité.....	89

2.3.1- Migration.....	89
2.3.2- Transition épithélio-mésenchymateuse.....	92
2.3.3- Chimiotaxisme	94
2.4- Angiogenèse.....	95
3- Ancrage des cellules souches hématopoïétiques	98
PARTIE III : Travail expérimental	99
A- Introduction : But du travail.....	100
B- Matériels et méthodes.....	103
Biologie cellulaire.....	103
Biologie moléculaire	105
Expérimentation animale	107
C- Résultats.....	109
1- Implication du récepteur ROBO4 dans la formation des métastases osseuses	109
2- Mise en évidence et caractérisation de deux isoformes de ROBO4.....	115
3- Ciblage de la forme non glycosylée de ROBO4 et du microenvironnement osseux	125
4- Développement de nouveaux outils thérapeutiques	131
PARTIE IV : Discussion et perspectives.....	137
Publications et communications scientifiques	147
Bibliographie	149

Liste des illustrations

Figure 1 : Structure d'un os long.....	23
Figure 2 : Système vasculaire d'un os long.....	24
Figure 3 : Ostéoclaste	28
Figure 4 : Ostéoclastogénèse	29
Figure 5 : Résorption osseuse.....	30
Figure 6 : Ostéoblastes	31
Figure 7 : Ostéoblastogénèse	32
Figure 8 : Minéralisation osseuse.....	33
Figure 9 : Ostéocyte.....	33
Figure 10 : Coopération de CXCR4 et ROBO4 pour le tropisme et l'ancrage des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse	35
Figure 11 : Niches hématopoïétiques médullaires	36
Figure 12 : Remodelage osseux.....	38
Figure 13 : Canopée	39
Figure 14 : Régulation du remodelage osseux	41
Figure 15 : Régulation de la différenciation ostéoclastique par le système immunitaire	43
Figure 16 : Interaction ostéoclaste/ostéoblaste <i>via</i> la voie de signalisation éphrine/EPH.....	46
Figure 17 : Interaction ostéoclaste/ostéoblaste <i>via</i> la voie de signalisation sémaphorines/plexines, neuropilines.....	47
Figure 18 : Cancers les plus fréquents chez la femme	48
Figure 19 : Représentation schématique des différentes étapes de la cascade métastatique.....	54
Figure 20 : Visualisation de métastases ostéolytiques et ostéocondensantes en radiographie et en histologie	59
Figure 21 : Rôle la triade RANK/RANKL/OPG dans la formation des métastases osseuses	60
Figure 22 : Voie jagged/notch	61
Figure 23 : Représentation des interactions moléculaires entre les cellules tumorales et l'environnement osseux dans le développement de métastases ostéolytiques.....	64
Figure 24 : Agents thérapeutiques dans le traitement des lésions ostéolytiques	68
Figure 25 : Structure typique d'un neurone	72
Figure 26 : Diversité des récepteurs de guidage axonal	73
Figure 27 : Structure des protéines SLIT et ROBO	74
Figure 28 : Mécanismes possibles de signalisation SLIT/ROBO	76
Figure 29 : Interaction ROBO/DCC	77
Figure 30 : Séquence promotrice du gène <i>ROBO4</i>	80
Figure 31 : Clivage de ROBO1.....	81
Figure 32 : Boucle de régulation SLIT/ROBO/miR-218	82

Figure 33 : Régulation de l'expression de ROBO dans la traversée de la ligne médiane	84
Figure 34 : Stabilisation de ROBO1 par USP33.....	85
Figure 35 : Régulation de la migration cellulaire par la voie de signalisation SLIT/ROBO <i>via</i> l'activation de régulateurs du cytosquelette d'actine	91
Figure 36 : Transition épithélio-mésenchymateuse et voie de signalisation SLIT2/ROBO1	92
Figure 37 : Transition mésenchymo-épithéliale et voie de signalisation SLIT2/ROBO1	93
Figure 38 : Inhibition par ROBO4 de l'angiogenèse induite par la voie du VEGF	97
Figure 39 : Association de l'expression de ROBO1 ou ROBO4 avec la rechute clinique du cancer du sein	110
Figure 40 : Effet de l'inhibition de l'expression du récepteur ROBO4 sur la croissance orthotopique de tumeurs mammaires et sur la formation de métastases osseuses à long terme chez la souris	112
Figure 41 : Colonisation de la moelle osseuse par les cellules B02	113
Figure 42 : Analyse des taux de transcrits de <i>ROBO1</i> , <i>ROBO2</i> , <i>ROBO3</i> , <i>ROBO4</i> et <i>SLIT2</i> dans des lignées de carcinomes mammaires.....	115
Figure 43 : Analyse des niveaux d'expression des protéines ROBO1 et ROBO4 dans des lignées de carcinomes mammaires.....	116
Figure 44 : Analyse du taux des transcrits et de la protéine ROBO4 dans les lignées humaines de cancer du sein transduites.....	117
Figure 45 : Caractérisation de la glycosylation du récepteur ROBO4.	118
Figure 46 : Tableau récapitulatif des différents anticorps anti-ROBO4 utilisés	118
Figure 47 : Mise au point des tests de migration par les HUVEC.	119
Figure 48 : Mise au point du test de formation de pseudo-capillaires par les HUVEC.....	120
Figure 49 : Différenciation des cellules pré-ostéoblastiques murines MC3T3-E1 en lignée ostéoblastique mature.	121
Figure 50 : Mise au point du test d'adhésion des cellules tumorales B02 sur les cellules ostéoblastiques murines MC3T3-E1.....	122
Figure 51 : Effet du ciblage des isoformes de ROBO4 sur la migration des HUVEC et la formation de pseudo-capillaires.....	123
Figure 52 : Effet du ciblage des isoformes de ROBO4 sur l'invasion des cellules B02 et l'adhésion aux cellules ostéoblastiques MC3T3-E1.	124
Figure 53 : Effet du ciblage de ROBO4 sur l'adhésion des cellules Hs578T aux cellules ostéoblastiques MC3T3-E1.....	124
Figure 54 : Effets du ciblage par un anticorps anti-ROBO4 sur l'invasion et l'ancrage dans la moelle osseuse des cellules tumorales B02	125
Figure 55 : Analyse du taux d'expression des transcrits <i>Slit2</i> , <i>Slit3</i> et <i>Unc5b</i> dans l'environnement osseux murin	127
Figure 56 : Effet du ciblage par des anticorps sur l'adhésion des cellules tumorales B02 sur les cellules ostéoblastiques MC3T3-E1	128

Figure 57 : Effet de la déplétion de ROBO1 dans les cellules B02 sur l'ancrage.....	129
Figure 58 : Effet des scFv-Fc anti-ROBO4 sur la migration des HUVEC.....	132
Figure 59 : Effet des scFv-Fc anti-ROBO4 sur l'adhésion des cellules B02 aux cellules ostéoblastiques MC3T3-E1.	133
Figure 60 : Production des protéines de fusion hROBO4-Fc et mUNC5B-Fc.	134
Figure 61 : Effets de la molécule de fusion UNC5B-Fc sur la migration des cellules endothéliales et l'invasion des cellules tumorales B02.....	135
Figure 62 : Effet de la molécule de fusion ROBO4-Fc sur l'adhésion des cellules B02 aux cellules ostéoblastiques MC3T3-E1.	136

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition des types de fibres nerveuses innervant les os longs	26
Tableau 2 : Principaux facteurs systémiques impliqués dans la régulation du remodelage osseux.....	42
Tableau 3 : Principaux facteurs locaux impliqués dans le contrôle du remodelage osseux.	44
Tableau 4 : Présentation des grandes caractéristiques des sous-types majeurs de cancers du sein	49
Tableau 5 : Fréquence des sites métastatiques chez les patientes avec un cancer du sein invasif.....	50
Tableau 6 : Survie à 5 ans selon le stade au moment du diagnostic	51
Tableau 7 : Récapitulatif des principales molécules impliquées dans la mise en place des métastases ostéolytiques.	64
Tableau 8 : Agents thérapeutiques émergents pour le traitement des lésions ostéolytiques.....	71
Tableau 9 : Modifications génétiques et épigénétiques des acteurs de la voie de signalisation SLIT/ROBO dans les cancers.....	88
Tableau 10 : Cohorte des Hospices Civils de Lyon (n=254).....	109

Liste des abréviations

3' UTR	3' UnTranslated Region
5' UTR	5' UnTranslated Region
ABL	Abelson
ADAM10	A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 10
ADAMTS1	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs 1
ALP	Phosphatase alcaline
ARF6	ADP-ribosylation factor 6
ATF4	Activating Transcription Factor 4
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Basal Multicellular Unit
BSP	Sialoprotéine osseuse
CAR	Calcium-sensing Receptor
CAR	CXCL12-Abundant Reticular
CASR	Calcium-Sensing Receptor
CC	Conserved Cytoplasmic
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
CTF	Carboxy-Terminal Fragment
CTR	Calcitonin Receptor
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CNO	Canoe
COMM	Commissureless
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSM	Cellule stromale mésenchymateuse
CTC	Circulated Tumor Cell
CXCL12	Chemokine CXC Ligand 12
CXCR4	Chemokine CXC Receptor 4
CXCR7	Chemokine CXC Receptor 7
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DKK-1	Dickkopf-1
DTC	Disseminated Tumor Cell
EGF	Epidermal Growth Factor
EMA	European Medicines Agency -
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ER	Estrogen Receptor
ETS	E26 Transformation-Specific
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLRT3	Fibronectin Leucin-Rich Transmembrane protein 3
FN	Fibronectine

GABP	GA-Binding Protein
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GLCE	Heparan-Sulfate-Modifying Enzyme Glucuronyl C5-epimerase
GTP	Guanosine Triphosphate
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor-2
HIF1	Hypoxia-Inducible Factor 1
HO-1	Heme Oxygenase-1
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglycan
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IFN	Interféron
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgCAM	Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecule
Ig	Immunoglobuline
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL	Interleukine
K _D	Constance de dissociation
LEPR	Leptin Receptor
LOX	Lysyl Oxydase
LRR	Leucine-Rich Repeat
NF-H	NeuroFilament, Heavy polypeptide 200kDa
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MENA	Mammalian Enabled
MET	Mesenchymal-Epithelial Transition
miR-218	microARN-218
MMP	Matrix MetalloProteinases
MT-MPP	Membrane-Type Matrix MetalloProteinase
NOD-SCID	Non Obese Diabetic-Severe Combined ImmunoDeficiency
N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
OCN	Ostéocalcine
OPG	Ostéoprotégérine
OPN	Ostéopontine
OSX	Ostérix
PAK	p21-activated protein kinase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGE2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIGF	Placental Growth Factor
Pi	Phosphate inorganique

PHOSPHO1	Phosphatase, orphan 1
PPi	Pyrophosphate inorganique
PR	Progesterone Receptor
PTH	Parathyroid hormone
PTH1R	Parathyroid Hormone 1 Receptor
PTHRP	Parathyroid Hormone-Related Protein
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand
ROBO	Roundabout
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
scFv	single-chain variable fragment
SH3	SRC Homology 3
SNO	Spindle-shaped N-cadherin+ CD45- Osteoblast
SOST	Sclérostine
SOX	Sry-related high mobility box
srGAP	SLIT/ROBO GTPase Activating Protein
SVF	Sérum de Veau Foetal
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TDSF	Tumor-Derived Secreted Factor
TIMP-1/2	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1/2
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
TNM	Tumor Node Metastasis
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
TRKA	Tropomyosin-related kinase A
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1/2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1/2
USP33	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 33
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
ZEB1	Zinc finger E-Box-binding homeobox 1

PARTIE I : Avant-propos

Dans les pays occidentaux, le cancer est la première cause de mortalité chez l'homme et la seconde chez la femme. En France, le nombre de nouveaux cas est estimé en 2012 à environ 355 000 (200 000 hommes et 155 000 femmes). Les cancers de la prostate chez l'homme (53 500 nouveaux cas) et du sein chez la femme (48 800 nouveaux cas) sont les plus fréquents (Institut National du Cancer, 2015). Bien que l'incidence du cancer du sein ait augmenté de façon importante et constante entre 1980 et 2012, le taux de mortalité a baissé, lui, de manière régulière. De plus, le taux global de survie relative à 5 ans après le diagnostic d'un cancer du sein est très bon et estimé à près de 86% (Institut National du Cancer, 2015). La prise en charge des patientes présentant un cancer localisé par des approches chirurgicales ou radiothérapeutiques est efficace. Malheureusement, ces traitements sont beaucoup moins efficaces dans le cas de cancers avec métastases.

L'os constitue l'un des sites anatomiques les plus fréquents pour le développement de métastases des tumeurs solides avec le foie, le poumon et le cerveau. Les métastases osseuses sont donc des complications fréquentes de nombreux cancers comme le cancer du poumon, de la prostate et du sein et sont associées à une morbidité sévère induisant des douleurs osseuses, des fractures pathologiques, des compressions médullaires et une hypercalcémie (Weilbaecher et al., 2011). Ces complications entraînent une réduction importante de la qualité mais aussi de l'espérance de vie : la médiane de vie d'une patiente atteinte d'un cancer du sein métastatique est d'environ 2 ans. Avec 50 000 à 70 000 personnes concernées par an en France, les métastases osseuses constituent donc un problème majeur de santé publique.

L'os est une structure dynamique, en perpétuel renouvellement, résultant de l'équilibre entre sa formation, assurée par les ostéoblastes, et sa résorption, assurée par les ostéoclastes. Cette balance résorption/formation doit être parfaitement contrôlée, le dérèglement de l'une de ces deux activités conduisant à des anomalies osseuses telle que l'ostéoporose (perte de masse osseuse) ou, au contraire, l'ostéopétrose (gain de masse osseuse). Sur le plan physiopathologique, les cellules tumorales de cancer du sein qui métastasent dans la moelle osseuse sécrètent différents facteurs (interleukines, cytokines, facteurs de croissance, ...) qui stimulent l'activité des ostéoclastes et inhibent celle des ostéoblastes. Ces métastases sont dites ostéolytiques et entraînent une destruction massive de la matrice osseuse. Cette observation a conduit à l'élaboration de thérapies visant à inhiber l'activité des ostéoclastes par traitement des patientes avec des bisphosphonates ou du dénosumab (Clézardin, 2011a). Toutefois, ces traitements sont uniquement donnés à visée palliative et n'améliorent pas la survie des patientes. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de ces lésions osseuses afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans ce contexte une analyse transcriptomique différentielle des cellules de cancer du sein de la lignée MDA-MB-231 et de la lignée B02 (dérivée des cellules MDA-MB-231 et métastasent

spécifiquement vers l'os) a été entreprise au laboratoire afin d'identifier les acteurs intervenants dans l'ostéotropisme des cellules de cette lignée. Cette étude a révélé, en particulier, une surexpression des gènes codant les récepteurs de guidage axonal ROBO1 et ROBO4 dans les cellules Bo2. Initialement identifiées comme facteurs de répulsion, ces protéines jouent un rôle crucial en inhibant le franchissement de la ligne médiane de façon inappropriée par des neurones (Ypsilanti et al., 2010). Les membres de cette famille sont impliqués dans plusieurs pathologies telles que les cancers ou bien l'inflammation allergique (Mehlen et al., 2011)(Ye et al., 2010). Toutefois, leur rôle dans la formation de métastases osseuses reste inconnu.

Afin d'étudier l'implication des récepteurs ROBO1 et ROBO4 dans la formation et le développement des métastases osseuses, leur synthèse a été inhibée, dans les cellules métastatiques Bo2, par des stratégies de génétique inverse. L'étude *in vitro* et *in vivo* des clones ainsi obtenus a permis de démontrer un rôle antagoniste des récepteurs ROBO1 et ROBO4 : ROBO1 joue un rôle anti-invasif tandis que ROBO4 favorise l'invasion du microenvironnement osseux par les cellules métastatiques.

Mon projet de thèse se place dans la continuité de ces travaux. Après avoir replacé ce travail dans son contexte bibliographique en présentant l'état des connaissances actuelles sur le tissu osseux, les métastases osseuses des cancers du sein, et les récepteurs de guidage axonal roundabout (ROBO) dans le développement tumoral, les résultats obtenus au cours des travaux de thèse ainsi que les perspectives qui en découlent seront présentés.

PARTIE II : Etat de l'art

A- Physiologie osseuse

1- Tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif minéralisé qui assure plusieurs fonctions dans l'organisme. Tout d'abord, une fonction mécanique que ce soit dans le soutien de l'organisme (soutien des tissus mous et point d'attache aux muscles) mais également dans la locomotion. De plus, il garantit une protection pour les organes vitaux, telle la boîte crânienne qui protège l'encéphale, ou la moelle osseuse et par extension le sang. C'est aussi le lieu de l'hématopoïèse. Et plus récemment une fonction métabolique a été décrite pour le tissu osseux qui sert de réservoir à ions (calcium, phosphate) mais qui peut également être considéré comme un organe endocrine à part entière.

1.1- Anatomie du tissu osseux (organisation macroscopique)

1.1.1- Structure de l'os

Selon des critères anatomiques et géométriques, les os qui forment le squelette sont classés en trois catégories : les os longs (fémur, tibia), les os courts (vertèbres) et les os plats (sternum, omoplate, os du crâne). Nous décrirons en détail seulement la structure des os longs.

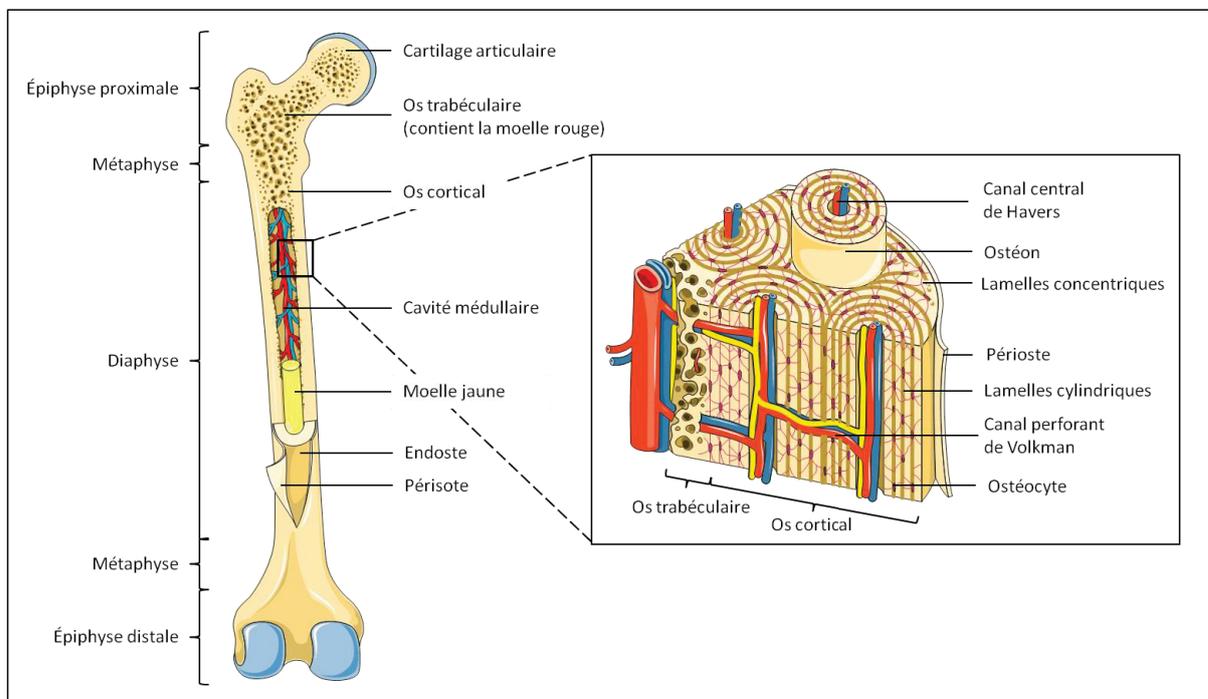


Figure 1 : Structure d'un os long

La partie centrale de l'os se nomme la diaphyse, elle est encadrée de part et d'autre par les deux épiphyses recouvertes de cartilage articulaire. Durant l'enfance, un cartilage de conjugaison sépare les épiphyses de la diaphyse. La croissance en longueur de l'os se fait à partir de cette zone de cartilage en direction de la diaphyse. On nomme ces régions les métaphyses. La partie centrale de l'os est creusée par une cavité dite médullaire qui renferme la moelle osseuse. Au niveau de la diaphyse on trouve surtout la moelle jaune riche en graisse et en adipocytes alors que les métaphyses renferment la moelle rouge responsable de l'hématopoïèse (Figure 1).

1.1.2- Vascularisation

L'os est un organe très vascularisé : en dehors de son rôle dans l'apport des nutriments, des facteurs de croissance, des hormones et des cytokines et dans le nettoyage des déchets, la vascularisation osseuse possède également une mission de communication entre l'os et les tissus voisins (Grellier et al., 2009). La vascularisation est nécessaire lors de l'ostéogenèse, où l'invasion vasculaire favorise la dégradation par les ostéoclastes du cartilage hypertrophié de l'os primaire qui est éventuellement remplacé par un nouvel os. Comme dans n'importe quel tissu, la vascularisation d'un os long mature comporte un système artériel, un système capillaire et un système veineux (Figure 2).

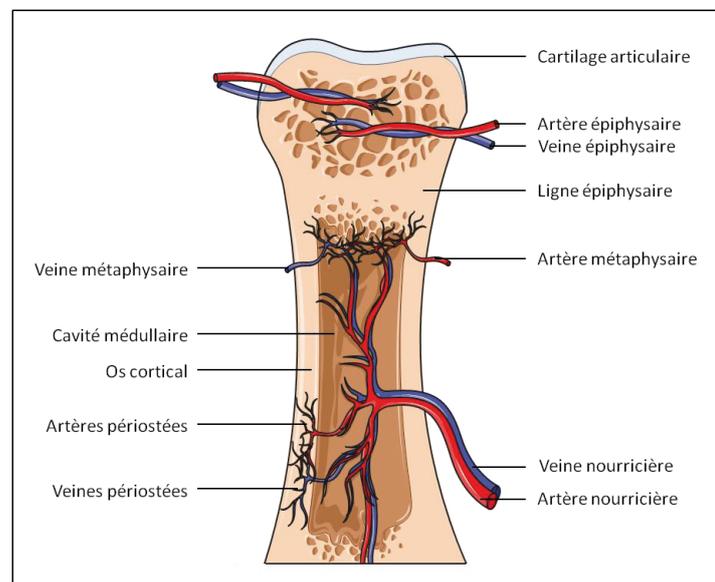


Figure 2 : Système vasculaire d'un os long

Trois types d'artères composent le système artériel qui assure toute la vascularisation des os longs : (1) l'artère nourricière qui pénètre dans le canal médullaire puis se divise en artères médullaires ascendante et descendante qui vont vers les deux extrémités de l'os assurant ainsi la quasi-totalité de la vascularisation diaphysaire. Elle fournit plus de 50% du sang total aux os longs. (2) les artères épiphyso-métaphysaires sont multiples, pénètrent dans l'os métaphysaire par les zones d'insertion capsulaires, ligamentaires, musculaires et tendineuses. (3) les artères

périostées qui irriguent la couche externe du périoste dont le rôle est principalement nutritif. Quant au système capillaire, il se compose de petits vaisseaux qui empruntent le système haversien. Pour finir, les épiphyses et les métaphyses sont drainées par de nombreuses veines épiphyso-métaphysaires satellites des artères. Du périoste partent de nombreuses veines collectrices qui rejoignent les veines musculaires.

Au-delà de son rôle essentiel au cours du processus d'ossification et du remodelage osseux, l'angiogenèse est l'élément clé lors de la réparation de l'os. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la régénération d'un cal osseux métaboliquement actif est nécessaire pour l'apport d'éléments nutritifs, d'oxygène, de facteurs de croissance et de cytokines. Ainsi, l'association spatiale et temporelle étroite de la formation osseuse avec la vascularisation a été nommée «couplage angiogénique-ostéogénique» (Kusumbe et al., 2014).

1.2.3- Innervation

Dès le XVI^{ème} siècle des fibres nerveuses ont été représentées au niveau du squelette sur des gravures sur bois. A présent, il est clairement établi, grâce aux expériences de dénervation sélective par voie chimique ou chirurgicale, que les fibres nerveuses présentes dans le périoste et dans l'os sont d'origine à la fois motrice et sensitive (système sympathique). Les fibres efférentes motrices destinées à l'os prennent leur origine dans les ganglions sympathiques tandis que les fibres afférentes sensibles sont issues des ganglions spinaux. Ces fibres sont fréquemment associés aux vaisseaux sanguins (Tabarowski et al., 1996).

D'autres études ont caractérisé plus précisément le type de fibres innervant l'os. Celui-ci est innervé principalement par des fibres nerveuses sensorielles fines et peu myélinisées A-delta et des fibres nerveuses riches en CGRP (calcitonin gene-related peptide) et en NF-H (neurofilament, heavy polypeptide 200kDa) mais très peu par des fibres épaisses et myélinisées A-beta. De plus, il a également été constaté que, bien que les différents compartiments du fémur soient tous innervés par des fibres nerveuses sensorielles CGRP⁺ et NF-H⁺, la densité d'innervation sensorielle des différents compartiments était différente et de type 100 : 2 : 0,1 : 0 dans le périoste, la moelle osseuse, l'os minéralisé, et le cartilage, respectivement. Les douleurs osseuses caractéristiques par exemple des métastases osseuses proviendraient donc essentiellement, sinon exclusivement, du périoste densément innervé. L'ensemble de ces fibres nerveuses sont positionnées de façon à transmettre les messages nociceptifs de la moelle osseuse vers la colonne vertébrale. Par ailleurs, ces fibres pourraient également être impliquées dans la régulation des cellules hématopoïétiques (Mach et al., 2002).

Jusqu'à présent, peu de travaux s'étaient intéressés aux neurotransmetteurs, aux récepteurs et aux canaux ioniques exprimés par ces fibres nerveuses. Or de récentes données pré-cliniques

suggèrent que des thérapies bloquant le facteur de croissance des nerfs (NGF) ou son récepteur, le récepteur de kinase A lié à la tropomyosine (TRKA) pourraient être efficaces. En effet, l'analyse de l'expression de TRKA dans les fibres nerveuses sensorielles qui innervent le fémur de souris par immunohistochimie et microscopie confocale, a montré que plus de 80% des fibres nerveuses sensibles qui innervent l'os sont TRKA⁺ (Tableau 1) (Castañeda-Corral et al., 2011). Et sur des modèles animaux d'arthrite (McNamee et al., 2010), de fracture osseuse (Ghilardi et al., 2011) et de cancers (ostéosarcome, cancer de la prostate) (Sevcik et al., 2005) (Jimenez-Andrade et al., 2010), une diminution de 50% des comportements douloureux est observée lorsque les souris sont traitées avec un antagoniste de TRKA ou un anticorps anti-TRKA ou anti-NGF.

Type	Sous-type	%
Fibres nerveuses A-delta myélinisées	NF-H ⁺ , TRKA ⁻	15
	NF-H ⁺ , CGRP ⁺ , TRKA ⁺	60
Fibres nerveuses C non myélinisées	CGRP ⁺ , TRKA ⁺	20
	CGRP ⁺ , TRKA ⁻	<5

Tableau 1 : Répartition des types de fibres nerveuses innervant les os longs

Source : (Castañeda-Corral et al., 2011).

1.2- Composition du tissu osseux (organisation microscopique)

Au niveau microscopique deux types de structures existent : l'os cortical et l'os trabéculaire. Ils sont tous deux constitués des mêmes éléments constitutifs (cellules, matrice, minéral) mais diffèrent au niveau structurel et fonctionnel.

L'os cortical ou compact qui correspond à environ 80-90% du volume osseux constitue la diaphyse des os longs. L'os trabéculaire ou spongieux représente seulement 15 à 25% du volume osseux mais plus de 80% de l'interface os/moelle osseuse. Il constitue les épiphyses et les métaphyses des os. Classiquement on dit que l'os cortical a une fonction mécanique et l'os trabéculaire une fonction métabolique.

Deux membranes de tissu conjonctif tapissent la surface de l'os cortical. Sur la face externe on trouve le périoste séparé en deux couches. La couche externe dite fibreuse du périoste contient les artères nourricières et les nerfs. La couche interne dite ostéogène est constituée d'ostéoblastes participant à la croissance en épaisseur de l'os et de fibres de collagène disposées parallèlement à la surface de l'os. La face interne de l'os cortical est recouverte par l'endoste (Figure 1). Cette membrane est formée d'une seule couche, qui enveloppe les cellules constitutives de l'os que sont les ostéoclastes et les ostéoblastes.

La structure de base du tissu osseux est appelée ostéon ou système haversien. L'os compact cortical comporte de nombreux ostéons de structure régulière, alors que dans l'os spongieux trabéculaire, ceux-ci sont beaucoup moins nombreux. Un ostéon se compose d'un canal central appelé canal haversien, parallèle au grand axe de l'os entouré d'anneaux concentriques d'os, les lamelles. Les canaux haversiens conduisent les vaisseaux sanguins, quelques vaisseaux lymphatiques et des fibres nerveuses qui alimentent chaque ostéon ; ceux-ci passent aussi par des conduits plus fins, les canaux de Volkmann, perpendiculaires aux canaux haversiens (Figure 1 page 23).

1.2.1- Matrice organique

Le tissu osseux qu'il soit trabéculaire ou cortical est constitué d'une matrice osseuse minéralisée composée essentiellement de collagène de type I (90% de la matrice protéique). Le collagène est une glycoprotéine fibreuse rigide en forme de tresse à trois brins riche en proline et en hydroxyproline. Le collagène est synthétisé sous la forme de tropocollagène constitué de trois sous-unités (deux chaînes α_1 et une chaîne α_2). Cinq molécules de tropocollagène sont ensuite agencées en microfibrilles. Une fibrille est ensuite constituée par un assemblage régulier de microfibrilles. Enfin la fibre collagénique est un agrégat de fibrilles en forme de ruban visible au microscope optique.

Les protéines non collagéniques représentent uniquement 10%-15% du contenu protéique osseux mais assurent des fonctions importantes. Ces protéines peuvent provenir du sérum comme l'albumine ou la transferrine qui se retrouvent piégées dans la matrice osseuse en raison de leur affinité pour l'hydroxyapatite et participent à la régulation de la minéralisation osseuse. Les protéines non collagéniques restantes sont produites de façon endogène (notamment par les ostéoblastes) et sont divisées en trois catégories : les glycoprotéines, les protéoglycanes et les gla-protéines. Ces protéines dotées d'un grand pouvoir osmotique, attirent et retiennent l'eau pour former une sorte de gel permettant la diffusion rapide des nutriments, métabolites et hormones entre le sang et les cellules du tissu osseux. Cette phase aqueuse est rapidement remplacée par des minéraux qui vont durcir la matrice.

La matrice osseuse contient également un grand nombre de facteurs de croissance dont les IGF (Insulin-like Growth Factors), le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), les BMP (Bone Morphogenetic Proteins), le TGF β (Transforming Growth Factor β) et des interleukines. Ces protéines jouent un rôle dans le contrôle local de la formation et de la dégradation osseuse. On peut également trouver des protéases : les métalloprotéases (MMP) et leurs inhibiteurs TIMP-1 et -2 (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1/2).

1.2.2- Matrice inorganique

La matrice minérale est constituée essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite de calcium de formule générale $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ qui ont la forme de petites aiguilles conférant à l'os sa solidité. Ces cristaux se situent dans le réseau de fibres de collagène. L'interface entre matrice organique collagénique et matrice minérale est assurée par des protéines non collagéniques telles que l'ostéocalcine et l'ostéonectine qui présentent une forte affinité pour le calcium et contribuent à la minéralisation du collagène auquel elles sont associées.

Le squelette contient 120 à 1100 g de calcium et constitue donc la principale réserve en calcium de l'organisme. Ce calcium est très rapidement mobilisable grâce à l'activation des ostéoclastes par les hormones du métabolisme phospho-calcique.

2- Cellules du tissu osseux

Il existe trois principaux types de cellules osseuses, les ostéoblastes qui sont les cellules responsables de la formation osseuse, les ostéoclastes qui sont les cellules responsables de la résorption osseuse et les ostéocytes qui sont des cellules emprisonnées dans la matrice minérale et qui régulent le remodelage osseux. On retrouve également des cellules du système immunitaire ainsi que des cellules souches hémétopoïétiques.

2.1- Architecture osseuse

2.1.1- Ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées polarisées qui dérivent de la lignée monocyte/macrophage capables de résorber la matrice osseuse minéralisée (Figure 3).

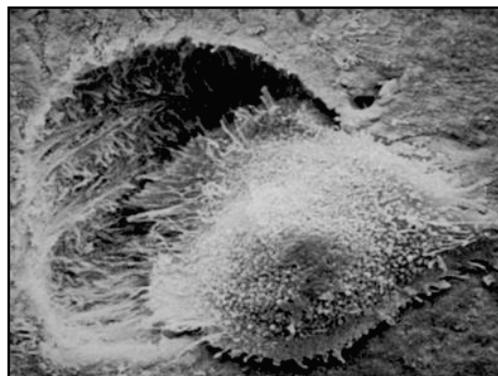


Figure 3 : Ostéoclaste

L'ostéoclastogenèse est initiée et contrôlée par des interactions directes avec les ostéoblastes/cellules stromales mais aussi par des facteurs synthétisés par ces cellules. Les ostéoblastes produisent trois facteurs essentiels à ce processus de différenciation : le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), le RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand), et l'OPG (ostéoprotégérine). Le M-CSF et le RANKL sont des cytokines nécessaires à la survie, au développement et à la différenciation des cellules précurseurs des ostéoclastes (Lacey et al., 1998). Les souris knock-out pour ces deux gènes présentent un phénotype ostéopétritique dû à l'absence totale d'ostéoclastes (Yoshida et al., 1990)(Kong et al., 1999). L'OPG est un récepteur leurre soluble pour RANKL et de ce fait, un régulateur négatif de l'ostéoclastogenèse : la perte du gène codant pour l'*Opg* chez la souris entraîne une ostéoporose en raison d'une ostéoclastogenèse excessive (Simonet et al., 1997). Le modèle actuel propose que l'expression de RANKL/OPG détermine le degré de différenciation et la fonction des ostéoclastes (Figure 4) (Hofbauer et al., 2000).

Plus de 20 gènes ont été décrits pour réguler positivement et négativement l'ostéoclastogenèse et l'activation des ostéoclastes. L'identification de ces différents gènes a été permise grâce aux mutations naturelles ou aux mutations knock-out ciblées chez les rongeurs. La perturbation de ces différents gènes du développement et/ou du fonctionnement des ostéoclastes, entraîne le plus souvent une ostéopérose comme décrit précédemment pour M-CSF et RANKL. Certains facteurs agissent sur la formation et/ou la survie des précurseurs ostéoblastiques (facteur de transcription PU.1, M-CSF), tandis que d'autres agissent sur la différenciation (c-FOS) ou l'adhésion et la fonction lytique des ostéoclastes matures (intégrines AV β 3, c-SRC, cathépsine K) (Wagner and Karsenty, 2001).

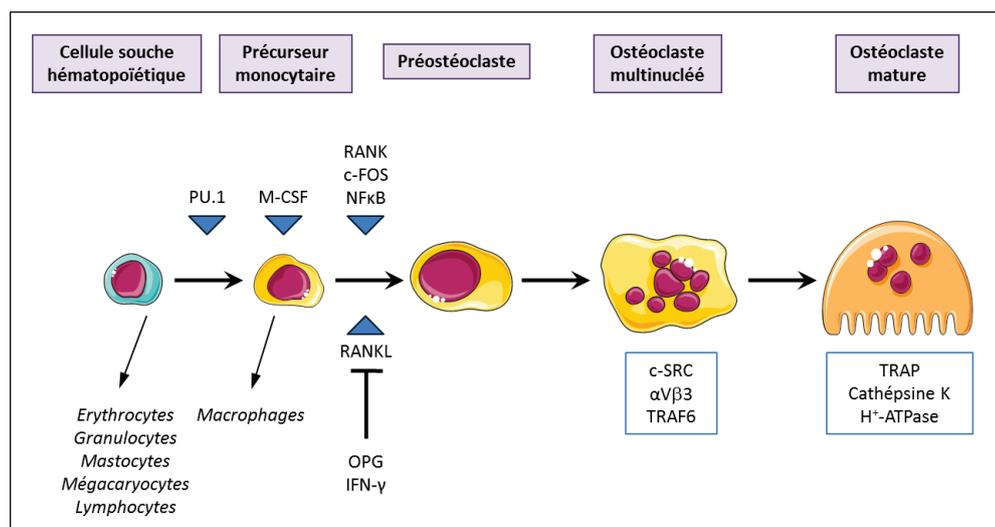


Figure 4 : Ostéoclastogenèse

Schéma de la différenciation de cellules précurseurs hématopoïétiques en ostéoclastes matures.

Les ostéoclastes matures multinucléés provenant de la fusion de 10 à 20 cellules individuelles peuvent être activés par divers signaux, ce qui conduit à l'initiation du remodelage osseux. Le corps cellulaire des ostéoclastes est polarisé, et en réponse à l'activation de RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B) par son ligand une restructuration interne se met en place avec des réarrangements du cytosquelette d'actine et la formation d'une jonction étanche entre la surface de l'os et la membrane basale pour former un compartiment étanche (Burgess et al., 1999). Cette vacuole externe est ensuite acidifiée par l'exportation d'ions hydrogène générés par le complexe ATP6i et la sécrétion d'enzymes lytiques TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) et de pro-cathépsine K formant une fosse de résorption appelée lacune de Howship (Li et al., 1999). Grâce à ce processus, les ostéoclastes résorbent l'os sous-jacent (Figure 5). Les produits de dégradation (calcium, phosphate, fragments de collagène solubilisés) sont recyclés dans l'ostéoclaste et libérés dans la circulation. La survie des ostéoclastes matures, et leur participation à des cycles successifs de la résorption osseuse, est régulée en partie par les hormones et cytokines (Rodan, 1998).

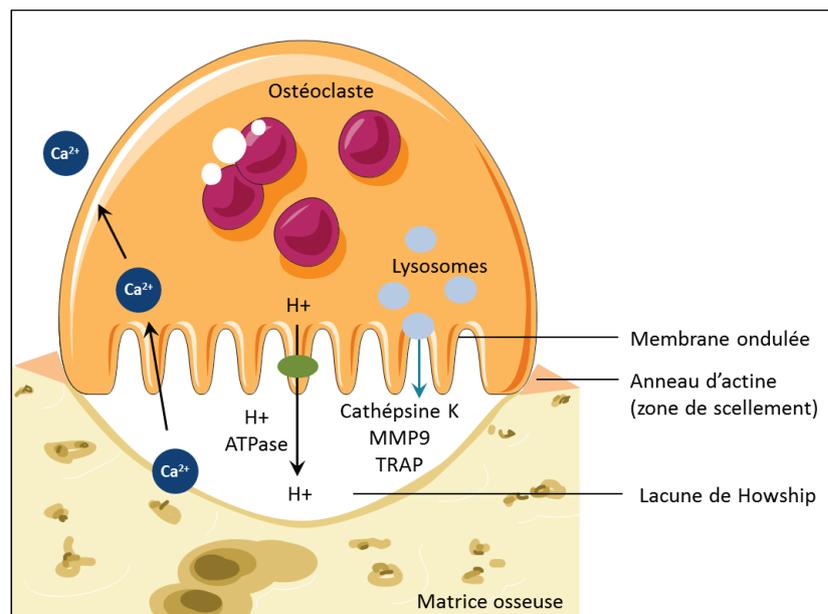


Figure 5 : Résorption osseuse

Lors de la résorption de la matrice osseuse, les ostéoclastes demeurent dans des dépressions peu profondes appelées lacunes de Howship et présentent une bordure ondulée distinctive qui adhère étroitement à l'os en formant un anneau périphérique de scellement. Les replis profonds de la membrane plasmique de cette région ondulée augmentent considérablement la surface exposée à la dégradation enzymatique de l'os et isolent l'aire de destruction du reste de la matrice. Modifié d'après (Crockett et al., 2011).

2.1.2- Ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules spécialisées dans la formation osseuse et qui jouent plusieurs rôles majeurs dans le remodelage osseux : expression des facteurs ostéoclastogéniques, production des protéines de la matrice osseuse, et minéralisation de l'os (Figure 6).

Il s'agit d'une population hétérogène comprenant des ostéoblastes immatures, des ostéoblastes différenciés et des ostéoblastes matures produisant de la matrice. Le stade de différenciation des ostéoblastes influence leur contribution dans le remodelage osseux (Karsenty, 2008). Des souris déficientes en ostéoblastes le seront également en ostéoclastes (Komori et al., 1997) ; cependant, la déplétion conditionnelle des ostéoblastes matures supprime seulement la formation osseuse alors que la résorption ostéoclastique perdure (Corral et al., 1998). Ces données suggèrent que les ostéoblastes immatures ont un rôle direct sur l'ostéoclastogénèse, tandis que les ostéoblastes matures produisent la matrice osseuse et aident à sa minéralisation.

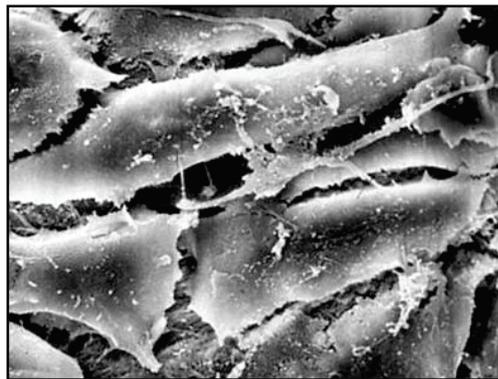


Figure 6 : Ostéoblastes

Les ostéoblastes dérivent des cellules stromales mésenchymateuses qui sont également précurseurs des chondrocytes, des myoblastes et des adipocytes. Leur différenciation est régulée par des facteurs de transcription spécifiques. Dans le cas des cellules ostéoblastiques, RUNX2 (runt-related transcription factor 2) et OSX (ostérix) apparaissent comme les régulateurs essentiels. Les souris déficientes pour *Runx2* par exemple ne développent pas de tissus osseux (Komori et al., 1997). RUNX2 est un facteur de transcription clé car il est capable de se lier au promoteur du gène de l'*ostéocalcine* mais il contribue également à l'expression de l'*ostéopontine*, de la *sialoprotéine osseuse*, et du *recepteur I au TGF β* (Ducy et al., 1997). OSX, quant à lui, est impliqué dans la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures capables de synthétiser le collagène de type I et la phosphatase alcaline (Nakashima et al., 2002). Il est exprimé en aval de RUNX2 comme ATF4 (Activating Transcription Factor 4) qui intervient dans les stades tardifs de différenciation en permettant la production de l'*ostéocalcine*, de la *sialoprotéine osseuse* et de RANKL (Figure 7) (Matsuguchi et al., 2009).

La différenciation ostéoblastogénique est aussi régulée par diverses hormones incluant l'hormone parathyroïdienne (PTH), les œstrogènes et des facteurs de croissance de la famille des BMP (BMP2 et BMP4 notamment) (Lin and Hankenson, 2011). La voie de signalisation WNT/ β -caténine est également impliquée dans le développement précoce en favorisant la différenciation des ostéoprogéniteurs. Plus précisément, les protéines WNT interagissent avec les récepteurs frizzled, présents dans les précurseurs ostéoblastiques, ce qui inhibe la phosphorylation de la B-

caténine. La protéine non phosphorylée est alors stabilisée dans la cellule et transportée dans le noyau où elle pourra activer l'expression de gènes comme *RUNX2*. Cette voie est régulée par des inhibiteurs, tels que la sclérostine (SOST) et dickkopf-1 (DKK-1) (Lin and Hankenson, 2011).

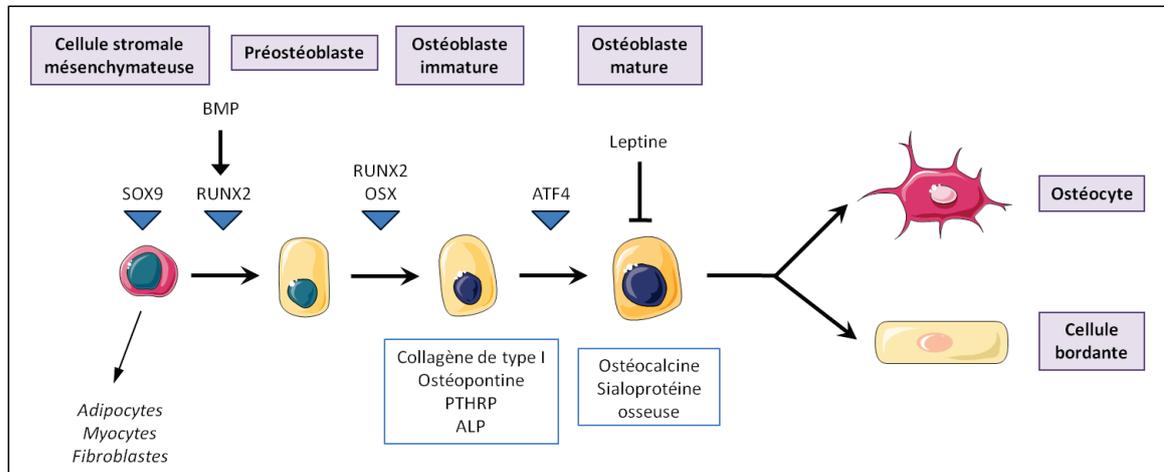


Figure 7 : Ostéoblastogenèse

Schéma de la différenciation de cellules précurseurs mésenchymateux en ostéoblastes matures.

Les ostéoblastes sont responsables de la minéralisation. La protéine PHOSPHO1 (phosphatase, orphan 1) va permettre, dans le cytoplasme, la production de phosphate inorganique (Pi) à partir de la phosphoéthanolamine et de la phosphocholine (Houston et al., 2004). Le Pi produit va s'accumuler dans les vésicules matricielles avec les ions Ca^{2+} pour former des cristaux d'apatite. Les vésicules matricielles vont ensuite se rompre et libérer les cristaux dans la matrice extracellulaire où ils vont grossir en fixant d'autres ions. En parallèle, la phosphatase alcaline (ALP) présente à la surface des ostéoblastes hydrolyse le pyrophosphate inorganique (PPi) présent dans la matrice extracellulaire en Pi qui va aller enrichir les cristaux d'apatite. Pour finir les cristaux vont aller se déposer au niveau des fibrilles de collagène afin de calcifier la matrice (Figure 8) (Addison et al., 2015).

Une des fonctions majeures de l'ostéoblaste est la synthèse des protéines de la matrice organique et notamment le collagène de type I qui constitue 90% de cette matrice. Ils produisent également des protéines non collagéniques. C'est le cas :

- de glycoprotéines, comme la phosphatase alcaline (ALP) et l'ostéonectine qui est l'une des glycoprotéines les plus abondantes dans la matrice organique.
- de glycoprotéines à site RGD qui possèdent une séquence Arg-Gly-Asn, qui correspond à une séquence consensus de liaison aux intégrines comme la sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéopontine (OPN), qui jouent un rôle au niveau de l'adhésion et de la résorption osseuse.
- de protéoglycanes qui sont des protéines possédant une chaîne glycosaminoglycane telle que la décorine qui est capable de se fixer au collagène et de réguler le diamètre des fibres.

- de gla-protéines qui possèdent un résidu acide γ -carboxy-glutamique qui leur permet de se lier avec le calcium et donc avec le minéral osseux. C'est le cas de l'ostéocalcine (OCN) qui régule l'activité des ostéoclastes.

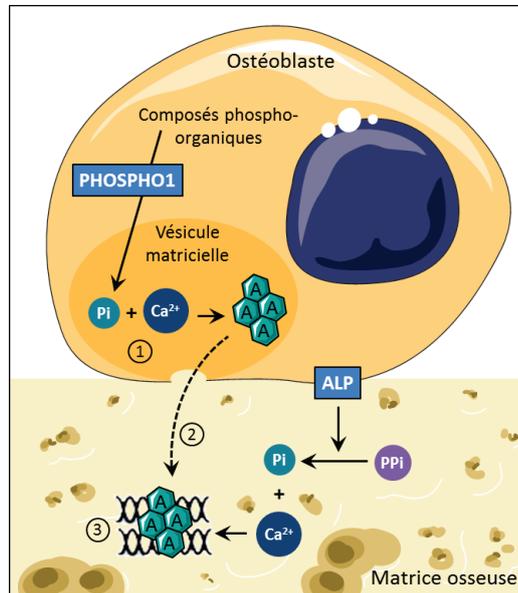


Figure 8 : Minéralisation osseuse

Lors du processus de minéralisation osseuse, le Pi s'accumule dans les vésicules matricielles des ostéoblastes et forme des cristaux d'hydroxyapatite en s'associant avec le Ca^{2+} (1). Cependant, les vésicules matricielles finissent par se rompre et les cristaux d'hydroxyapatite sont alors libérés dans la matrice extracellulaire (2) où ils se déposent sur les fibrilles de collagène de façon ordonnée (3). Modifié d'après (Sapir-Koren and Livshits, 2011).

2.1.3- Ostéocytes

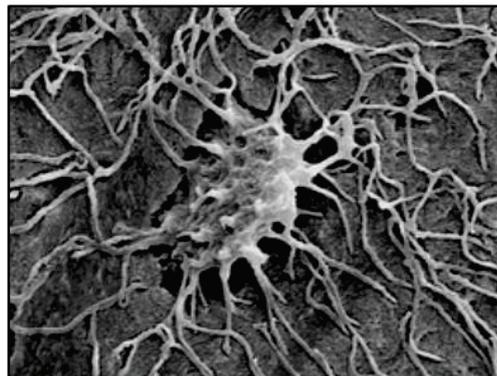


Figure 9 : Ostéocyte

Source : Kevin MacKenzie, University of Aberdeen.

Les ostéocytes sont considérés comme le stade terminal de différenciation des ostéoblastes. On les retrouve "emmurés" au niveau des lacunes ostéocytiques reliées entre eux par des canalicules. Ces canalicules permettent l'acheminement des nutriments et de l'oxygène à partir des capillaires sanguins. Les ostéocytes ont des propriétés mécano-sensitives qui leur permettent de "détecter"

les microfissures environnantes et d'initier un remodelage ciblé de la zone osseuse concernée. Les ostéocytes peuvent rester jusqu'à plusieurs années dans leur lacune, cette longévité leur permettant de représenter jusqu'à 90% des cellules de l'os (Figure 9) (Bonewald, 2011).

2.1.4- Ostéomacrophages

Les ostéomacrophages sont des macrophages tissulaires résidents qui ont un rôle prépondérant dans le développement tissulaire, l'homéostasie, et la réparation (Hume, 2008). Dans l'os humain, les ostéomacrophages peuvent être identifiés par la présence du marqueur myéloïde CD68, leur morphologie stellaire distinctive, et leur localisation à la surface osseuse (Chang et al., 2008). Ils forment une voûte au-dessus des ostéoblastes matures. La perte des macrophages *in vivo* se traduit par une perte complète des ostéomacrophages mais également des ostéoblastes qui leur sont associés, ce qui suggère que leur présence permet le maintien des ostéoblastes matures.

2.2- Niches hématopoïétiques médullaires

2.2.1- Cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules souches adultes multipotentes qui représentent 0,005 à 0,01% des cellules totales de la moelle osseuse (Sutherland et al., 1990). Ce sont des cellules capables, lorsqu'elles sont activées, de reconstituer l'ensemble des lignées myéloïdes et lymphoïdes du sang et du système immunitaire (Morrison et al., 1995). Après la naissance, les CSH se retrouvent uniquement dans la moelle osseuse et en particulier au niveau de l'os sternal, des os iliaques et de la tête fémorale.

L'un des principaux mécanismes de maintenance du pool de CSH est l'axe CXCR4/CXCL12 (Sugiyama et al., 2006). CXCL12 (Chemokine CXC Ligand 12) appartient à la grande famille des cytokines chimioattractantes et CXCR4 (Chemokine CXC Receptor 4) est un de ses récepteurs physiologiques. Des souris mutantes pour ces deux gènes ont permis de mettre en évidence que la voie de signalisation CXCL12/CXCR4 était essentielle pour l'hématopoïèse, et notamment pour la colonisation par les CSH de la moelle osseuse (Ara et al., 2003). De plus, le traitement de cellules hématopoïétiques humaines immatures CD34⁺ avec un anticorps anti-CXCR4 inhibe la repopulation cellulaire de souris NOD-SCID (non obese diabetic-severe combined immunodeficiency) (Peled et al., 1999), ce qui suggère un rôle de l'axe CXCR4/CXCL12 dans l'ancrage des CSH dans la moelle osseuse. Le traitement par un antagoniste spécifique de CXCR4, l'AMD3100, provoque une augmentation du nombre de CSH dans le sang périphérique (Broxmeyer et al., 2005), cette observation appuie l'hypothèse que la voie de signalisation CXCL12/CXCR4 est nécessaire à l'enracinement des CSH dans le microenvironnement osseux.

Cependant, la délétion de CXCR4 chez l'adulte montre, de manière surprenante, que les CSH sont toujours capables d'un tropisme et d'un ancrage dans l'os. Par analyse transcriptomique un autre récepteur, le récepteur de guidage axonal roundabout 4 (ROBO4), a été caractérisé pour son rôle dans l'ancrage spécifique des CSH dans la moelle osseuse (Forsberg et al., 2005). Une étude plus approfondie a ensuite montré que le taux de ROBO4 était particulièrement élevé dans les LT-CSH (LT pour Long Term) qui sont les CSH les plus primitives alors qu'il diminue durant la différenciation des CSH (Shibata et al., 2009). Les CSH *ROBO4*^{-/-} présentent des défauts de tropisme spécifiquement à l'os (et non dans la rate) et surexpriment CXCR4 (Smith-Berdan et al., 2011). ROBO4 coopère donc avec CXCR4 pour permettre la localisation des CSH dans l'environnement osseux (Figure 10).

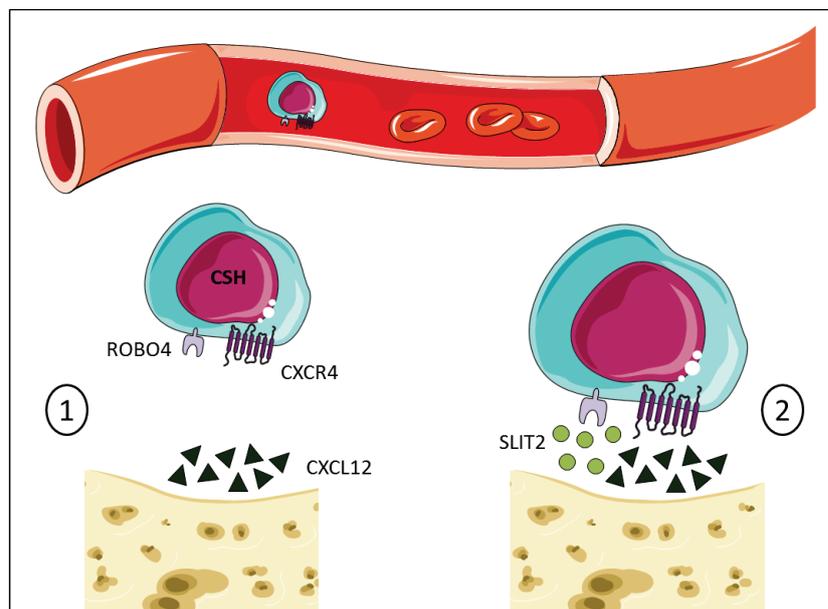


Figure 10 : Coopération de CXCR4 et ROBO4 pour le tropisme et l'ancrage des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse

Durant l'hématopoïèse, les CSH qui expriment le récepteur CXCR4 vont migrer du foie fœtal à la moelle osseuse en réponse au CXCL12 libéré dans le microenvironnement osseux. L'ancrage à long terme des CSH dans la moelle osseuse est renforcé par la présence du récepteur ROBO4 à la surface des cellules et du ligand SLIT2 dans la matrice osseuse. Modifié d'après (Smith-Berdan et al., 2011).

Les cellules souches sont localisées dans des sites anatomiques particuliers appelés « niches ». Les cellules souches hématopoïétiques, pour la plupart, résident dans la moelle osseuse (Xie et al., 2009)(Lo Celso et al., 2009). Le concept de niche hématopoïétique osseuse (ou médullaire) a été proposé pour la première fois en 1978 par R. Schofield. Cette niche permettrait de réguler la survie, la quiescence, l'autorenouvellement et la différenciation des CSH. Au début des années 2000, plusieurs travaux ont permis de décrire différents types de niches pour les CSH : la niche endostéale, la niche vasculaire et dernièrement la niche mésenchymateuse. Des études d'imagerie en temps réel suggèrent que les CSH sont plus dormantes lorsqu'elles se trouvent près de la niche endostéale riche en ostéoclastes, ostéoblastes et fibroblastes (80% des CSH) tandis qu'elles

seraient plus actives lorsqu'elles sont proches de la niche vasculaire (20% des CSH), qui se trouve plus au centre de la cavité médullaire en contact avec les cellules stromales mésenchymateuses, les cellules endothéliales sinusoidales et les cellules de Schwann (Figure 11) (Mendelson and Frenette, 2014).

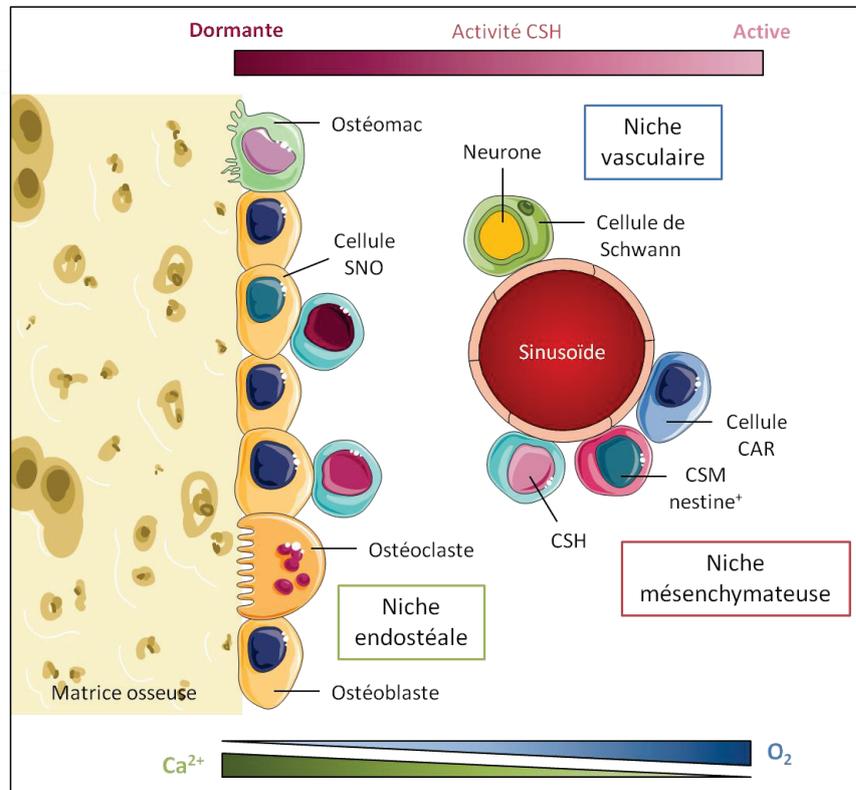


Figure 11 : Niches hématopoïétiques médullaires

La plupart des cellules souches hématopoïétiques (CSH) résident dans la moelle osseuse, qui peut être subdivisée en niche vasculaire, niche mésenchymateuse et niche endostéale. Les CSH situées du côté osseux ont tendance à être plus quiescentes, alors que les CSH situées à proximité des sinusoides sont plus actives. Modifié d'après (Hsu and Fuchs, 2012).

2.2.2- Niche endostéale

Les ostéoblastes ont été parmi les premiers résidents de la niche à être caractérisés (Taichman, 2005)(Lévesque et al., 2010). Une catégorie particulière d'ostéoblastes appelés cellules SNO (pour spindle-shaped n-cadherin⁺ CD45⁻ osteoblast) a été récemment décrite. Les cellules SNO maintiendraient les CSH en dormance grâce à des contacts directs via la N-cadhérine (Zhang et al., 2003) et à la sécrétion d'angiopoïétine (Arai et al., 2004) et d'ostéopontine (Nilsson et al., 2005). Les ostéoclastes semblent eux aussi être indispensables à la maintenance des CSH : en leur absence une mobilisation accrue des CSH est observée suggérant une fonction de régulateur négatif du système hématopoïétique par les ostéoclastes (Miyamoto et al., 2011).

Un autre facteur spécifique de la niche endostéale est sa concentration en Ca^{2+} . En effet, elle est élevée dans l'endostéum où le remodelage osseux fait augmenter la concentration extracellulaire en ion calcium Ca^{2+} . Or les CSH présentent des récepteurs au Ca^{2+} , CAR (calcium-sensing receptor) ce qui fait qu'elles sont sensibles aux concentrations de Ca^{2+} dans le microenvironnement osseux. Les résultats d'expériences réalisées chez des souris dépourvues en CAR montrent que les CSH ne parviennent pas à s'ancrer dans la région endostéale et présentent des défauts dans la prise de greffe (Adams et al., 2006).

2.2.3- Niche vasculaire

La niche vasculaire, plus oxygénée que la niche endostéale, favoriserait la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques.

Les fibres nerveuses sympathiques qui innervent l'os peuvent sécréter des catécholamines (dopamine, épinéphrine, et norépinéphrine) qui activent des récepteurs adrénergiques β_2 présents à la surface des CSH. La particularité de ce système est qu'il est dynamique et activé en période de stress en jouant sur la mobilisation des CSH hors de la niche (Spiegel et al., 2007). Enfin, les cellules de Schwann non-myélinisantes, un type de cellules gliales enveloppant les cellules nerveuses, semblent également maintenir les CSH en quiescence en régulant l'activation du TGF β . Ces cellules constituent une source majeure de TGF β actif dans la moelle osseuse, qui en se liant à son récepteur présent sur les CSH, induit une cascade de réactions conduisant à la dormance des CSH (Yamazaki et al., 2011).

2.2.4- Niche mésenchymateuse

La notion de niche mésenchymateuse est récente avec la découverte d'une population spécifique de cellules stromales mésenchymateuses positives pour la nestine (CSM nestine⁺) et impliquées dans la régulation des CSH (Méndez-Ferrer et al., 2010). La plupart des CSM nestine⁺ sont localisées à proximité des CSH au niveau des zones périvasculaires centro-médullaires.

Deux autres petites populations cellulaires ont été décrites et pourraient aussi faire partie de cette niche mésenchymateuse. D'une part, des cellules réticulaires exprimant très fortement CXCL12 nommées cellules CAR (CXCL12-abundant reticular). Ces cellules, reliées entre elles, forment un réseau autour des cellules endothéliales sinusoides et sont en contact avec les CSH (Sugiyama et al., 2006). Les souris déplétées en cellules CAR possèdent moins de CSH et celles-ci sont dans un état plus quiescent. Ces cellules sont donc requises pour la prolifération des CSH en lignée érythrocytaire et lymphoïde (Omatsu et al., 2010). D'autre part, des cellules stromales périvasculaires qui expriment le récepteur à la leptine (LEPR⁺). Ces cellules sont également une des sources majeures de CXCL12 dans la moelle osseuse et l'inactivation de CXCL12

spécifiquement dans les cellules LEPR⁺ entraîne une diminution du nombre de CSH et de progéniteurs mobilisés dans la circulation sanguine (Ding and Morrison, 2013).

3- Remodelage osseux

3.1- Processus du remodelage osseux

L'os est un tissu dynamique en perpétuel renouvellement. Ainsi, 10% du squelette adulte est renouvelé chaque année. Ce remodelage osseux est un processus actif et cellulaire par lequel la matrice osseuse minéralisée est constamment résorbée et reformée, de sorte à assurer tout au long de la vie trois fonctions majeures : la garantie des propriétés biomécaniques optimales, la libération des minéraux nécessaires à l'organisme et la réparation des lésions subies par l'os. Dans les conditions normales, le remodelage osseux maintient un bilan minéral neutre, à savoir que la quantité d'os reformé équivaut à la quantité d'os soustrait par résorption. Lorsque cet équilibre vient à être rompu avec un déséquilibre en faveur de la résorption osseuse ou de la formation osseuse cela conduit à des pathologies comme l'ostéoporose et l'ostéopétrose respectivement.

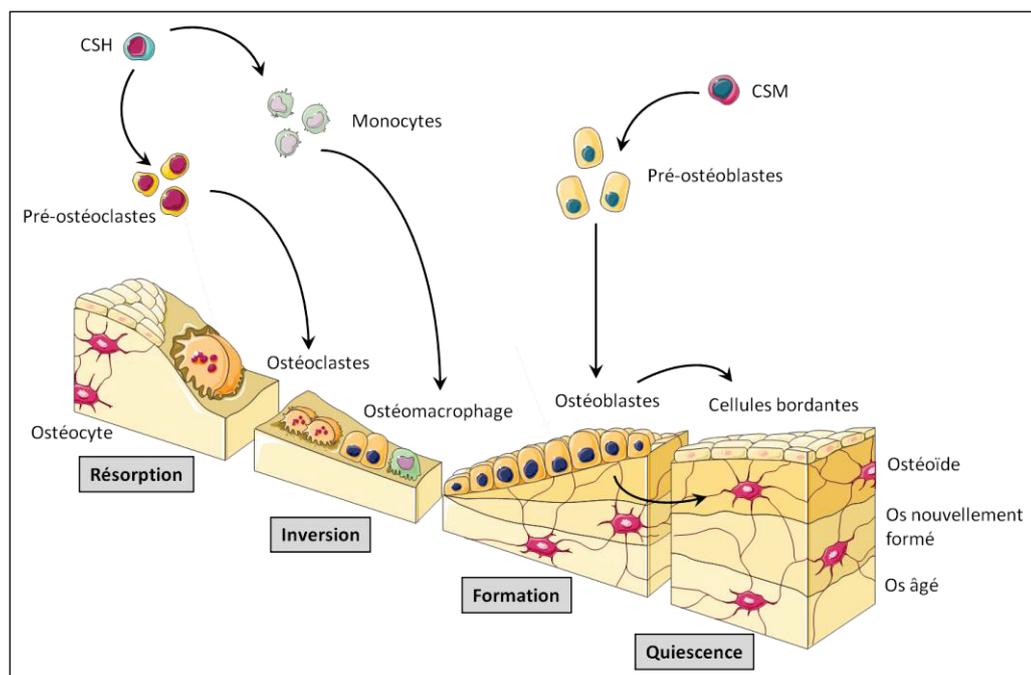


Figure 12 : Remodelage osseux

Le remodelage s'effectue dans une structure définie appelée unité multicellulaire de base (BMU) dans laquelle les activités de résorption et de formation sont très précisément orchestrées spatialement et temporellement. Le remodelage osseux peut se diviser en plusieurs étapes incluant : (1) la résorption où les précurseurs ostéoclastiques vont être recrutés au site osseux puis activés ; (2) la transition, correspondant à l'arrêt de la résorption et au recrutement des ostéoblastes ; (3) la formation d'une nouvelle matrice par les ostéoblastes, appelée ostéoïde qui

sera par la suite minéralisée. A la fin d'un cycle de remodelage osseux, les ostéoblastes se différencient en cellules bordantes ou en ostéocytes, on parlera d'os en phase de quiescence (Figure 12).

3-2. Canopée

Au cours des dernières années, une couche de cellules mésenchymateuses plates et chevauchantes recouvrant les unités de remodelage osseux a été décrite. Ces cellules forment une sorte d'enveloppe entourant l'ensemble de la moelle osseuse appelée canopée (en référence à l'étage supérieur de la forêt). Morphologiquement ces cellules semblent empilées et former une sorte de surcouche. Néanmoins, il s'agit d'une entité anatomique distincte, car elles n'interagissent pas physiquement avec la matrice osseuse. Ces cellules apparaissent donc comme une voûte couvrant la surface du remodelage osseux en cours (Figure 13) (Delaisse, 2014)(Sims and Martin, 2014).

Cette structure permettrait notamment l'échange de constituants de la matrice et de minéraux, la modulation du recrutement des cellules osseuses et le couplage du remodelage osseux (résorption et formation). La perturbation de la canopée semble d'ailleurs associée à l'ostéoporose, soulignant l'importance de cette structure dans le processus de remodelage osseux (Jensen et al., 2015). Fait important, *in vitro* des cellules issues de la canopée peuvent se différencier en ostéoblastes matures (Bi et al., 2008)(Kristensen et al., 2014).

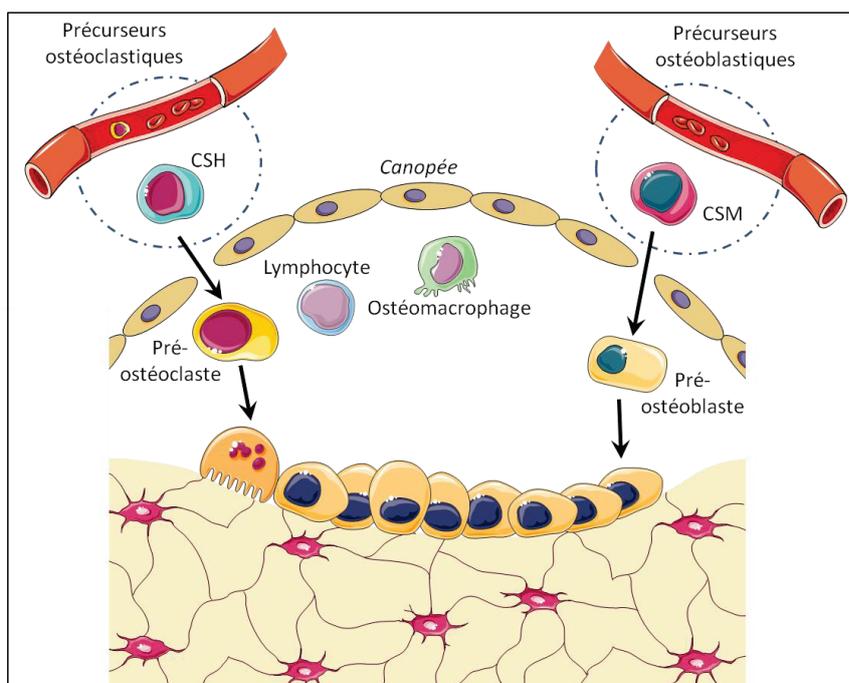


Figure 13 : Canopée

La canopée a été décrite comme une structure spécialisée qui recouvre chaque unité de remodelage osseux en la séparant de la moelle osseuse. Modifié d'après (Sims and Martin, 2014).

3.3- Régulation du remodelage osseux

Comme précédemment mentionné, le remodelage osseux est principalement orchestré par deux types cellulaires, les ostéoclastes et les ostéoblastes. Toutefois ce processus complexe est régulé à la fois par des facteurs systémiques, tels les œstrogènes et l'hormone parathyroïdienne, par la stimulation mécanique du squelette lors de la marche et de l'exercice, ainsi que par de nombreux facteurs du microenvironnement, facteurs de croissance et cytokines, produits localement. Le système RANK/RANKL/OPG représente un axe essentiel de cette régulation (Figure 14).

3.3.1- Facteurs systémiques

Le tissu osseux est sous l'influence de nombreuses hormones, parmi lesquelles des hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire, des hormones calciotropes, des hormones sexuelles ou encore des hormones thyroïdiennes. Les effets de ces différents facteurs sont résumés dans le Tableau 2 (page 42).

L'hormone parathyroïdienne (PTH), sécrétée par les glandes parathyroïdes, est une hormone hypercalcémiant. Selon la dose et la voie d'administration utilisées, la PTH peut aussi bien stimuler la formation que la résorption osseuse. Cette dualité d'action pourrait s'expliquer par le fait que la liaison de la PTH à son récepteur régule l'expression de *RUNX2* dans les ostéoblastes (Krishnan et al., 2003) mais active également l'expression de *M-CSF* et *RANKL* et inhibe la sécrétion de l'OPG (Huang et al., 2004). En influant ainsi sur la balance RANKL/OPG, la PTH peut stimuler indirectement la formation des ostéoclastes.

La calcitonine, sécrétée elle aussi par les glandes parathyroïdes, est une hormone hypocalcémiant. C'est l'une des rares hormones à avoir une action directe sur les ostéoclastes en se fixant sur son récepteur (CTR) présent sur leur membrane. Cette interaction inhibe la fonction ostéoclastique en perturbant l'organisation du cytosquelette d'actine et la polarité cellulaire (Shyu et al., 2007).

La vitamine D joue un rôle majeur dans la minéralisation osseuse en favorisant la fixation du calcium sur l'os. Elle agit également sur la différenciation et la maturation des ostéoblastes en stimulant l'expression de gènes ostéoblastiques comme l'*ostéopontine* et l'*ostéocalcine* (van der Meijden et al., 2014).

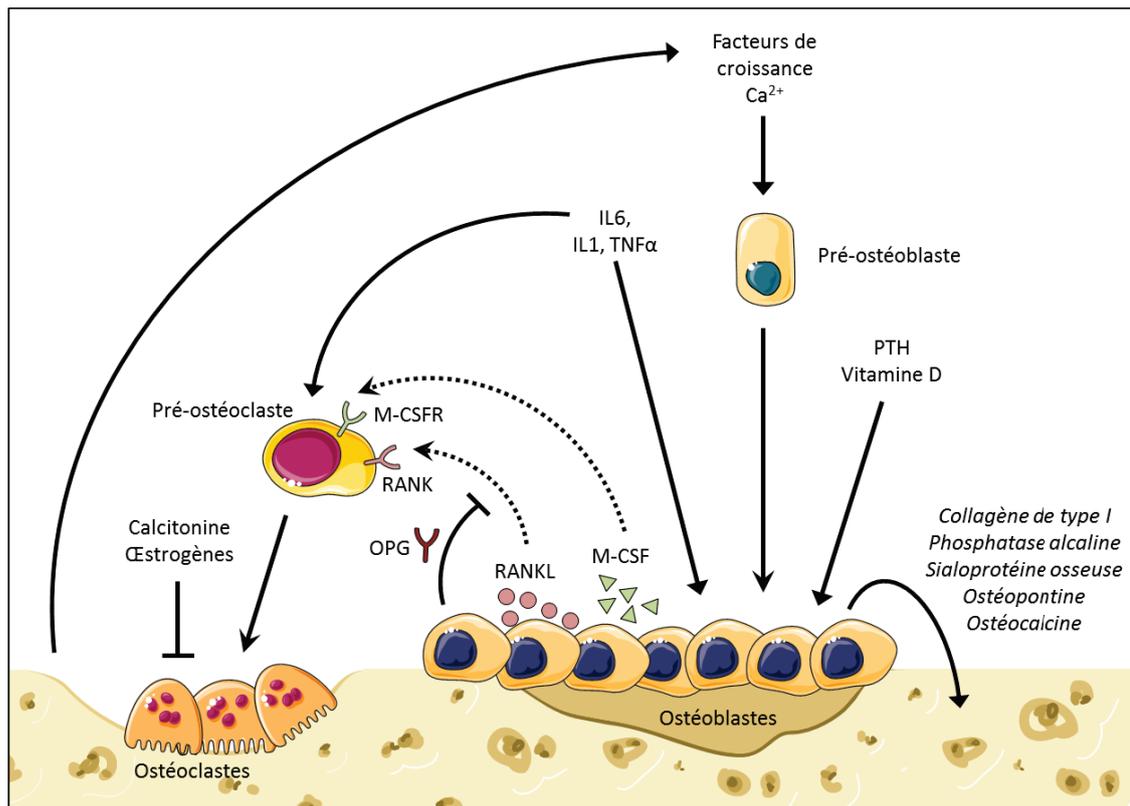


Figure 14 : Régulation du remodelage osseux

Les œstrogènes sont avant tout des inhibiteurs de la résorption osseuse. Ils se lient aux récepteurs des ostéoblastes et induisent des effets positifs directs sur la formation osseuse par l'activation de la prolifération, l'induction de la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire osseuse et la sécrétion de facteurs de croissance (IGF, TGFβ). De plus les œstrogènes possèdent également des effets anti-résorptifs indirects en inhibant la production de cytokines pro-ostéoclastiques tels que l'IL1 (interleukine 1), l'IL6 (interleukine 6) et le TNFα (tumor necrosis factor α) (Pacifici, 1996). Les estrogènes ont aussi des effets anti-apoptotiques sur les ostéoblastes.

Le système nerveux intervient également dans le remodelage, notamment via la LEPTINE, une hormone produite par le tissu adipeux, qui inhibe la formation osseuse en se liant à son récepteur hypothalamique. Le système nerveux sympathique sert alors de médiateur à l'action de l'hormone sur le contrôle de la formation osseuse via le récepteur adrénergique B2 (ADRB2), seul récepteur adrénergique exprimé par les ostéoblastes. Les souris *Adrb2*^{-/-} présentent une élévation des marqueurs de la formation osseuse et l'injection de leptine par voie intra-cérébro-ventriculaire ne diminue pas la formation osseuse chez ces souris, validant la nécessité d'une intégrité du système sympathique pour relayer les effets de la leptine sur l'os (Elefteriou et al., 2005).

Système nerveux	
Leptine	Contrôle la formation osseuse <i>via</i> la production de noradrénaline par l'hypothalamus qui entraîne la synthèse de RANKL par les ostéoblastes
Hormones calciotropes	
PTH	Mode d'action complexe selon le mode d'administration : - Augmente la survie et l'activité des ostéoblastes (administration intermittente) - Augmente RANKL et diminue OPG (administration continue)
Calcitonine	Inhibe l'activité des ostéoclastes et provoque leur apoptose (liaison directe)
Vitamine D	Stimule l'expression de l'ostéopontine, de l'ostéocalcine et du collagène de type I par les ostéoblastes Favorise la différenciation des ostéoclastes <i>via</i> la production de RANKL par les ostéoblastes
Hormones sexuelles	
Œstrogènes	Inhibent la résorption osseuse en bloquant l'ostéoclastogénèse et en induisant l'apoptose des ostéoclastes Favorisent la prolifération des ostéoblastes
Androgènes	Favorisent la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques

Tableau 2 : Principaux facteurs systémiques impliqués dans la régulation du remodelage osseux.

3.3.2- Facteurs locaux

Les cytokines (interleukines, interférons) et facteurs de croissance (TGF β , IGF) présents dans le microenvironnement osseux participent également au remodelage en régulant la différenciation et l'activité des cellules osseuses. Ils peuvent être relargués par la matrice au cours du remodelage ou être produits directement par les ostéoclastes, les ostéoblastes, ou bien encore par les cellules immunitaires présentes dans l'environnement. Les effets de ces différents facteurs sont résumés dans le Tableau 3 (page 44).

Lors de la formation osseuse, un certain nombre de facteurs de croissance sont emprisonnés dans la matrice osseuse. Ces facteurs vont être libérés lors de la résorption osseuse et vont jouer un rôle majeur dans le remodelage osseux. Parmi ces facteurs, les BMP sont des protéines capables de réguler l'expression de facteurs de transcription spécifiques des ostéoblastes. BMP2 et BMP4 notamment en se fixant à leur récepteur activent les facteurs de transcription RUNX2 et OSX qui vont à leur tour activer des gènes codant des protéines de la matrice osseuse comme l'ostéonectine, l'ostéopontine, le collagène de type I, la sialoprotéine osseuse et la phosphatase alcaline (Chen et al., 2012). D'autres facteurs de croissance tels que les IGFs, le FGF et le PDGF stimulent également la différenciation et la prolifération des ostéoblastes.

Le rôle du TGF β est quelque peu plus ambigu. S'il est connu pour stimuler la formation osseuse lors du développement du squelette, son action au niveau du remodelage osseux est plus controversée. *In vitro*, il a été montré comme stimulant la production d'OPG et inhibant celle de

RANKL mais *in vivo*, que ce soit dans des souris génétiquement modifiées ou chez des souris traitées avec des inhibiteurs du TGF β , son action se situe plutôt en faveur de l'ostéoclastogenèse et d'une stimulation de la résorption osseuse (Juárez and Guise, 2011).

L'ensemble de ces facteurs de croissance libérés lors de la résorption osseuse vont induire l'expression de cytokines. Ces cytokines, comme l'IL1, l'IL6 et le TNF α augmentent la destruction osseuse en stimulant la synthèse de M-CSF et de RANKL par les précurseurs ostéoblastiques, favorisant ainsi l'activation des ostéoclastes. A l'inverse, l'IL11 stimule la différenciation ostéoblastique et la formation osseuse par une augmentation de l'action de BMP2 (Kwan Tat et al., 2004).

Les cellules immunitaires existantes dans la moelle osseuse, interagissent avec les cellules de l'os. L'activation anormale du système immunitaire dans certaines maladies auto-immunes mène à une destruction osseuse accrue due à l'activation des ostéoclastes par les lymphocytes T. En effet, les lymphocytes T auxiliaires Th17 exercent des effets stimulants sur la différenciation des ostéoclastes tandis que les lymphocytes Th1 et Th2 présentent des effets inhibiteurs sur l'ostéoclastogenèse *via* l'IFN γ et l'IL4, respectivement. L'IL17 non seulement induit la production de RANKL par les ostéoblastes mais active également l'inflammation locale, conduisant à sécrétion de cytokines inflammatoires (IL1, IL6, TNF α). Ces cytokines augmentent la production de RANKL par les ostéoblastes et agissent également directement sur la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures (Figure 15) (Takayanagi, 2010).

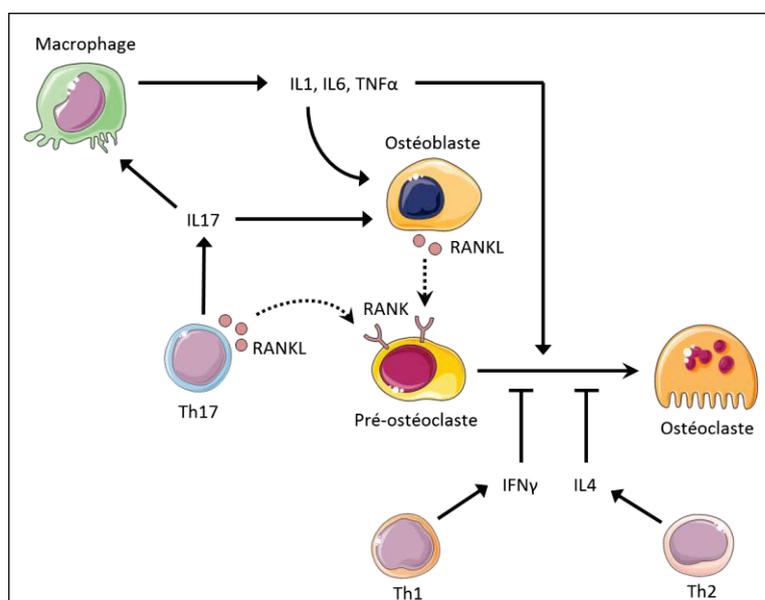


Figure 15 : Régulation de la différenciation ostéoclastique par le système immunitaire

Les lymphocytes T auxiliaires Th17 exercent un effet direct sur l'ostéoclastogenèse en favorisant la production de RANKL par les ostéoblastes et indirect en stimulant la sécrétion de cytokines inflammatoires comme l'IL1, l'IL6 et le TNF α , tandis que les lymphocytes Th1 et Th2 présentent des effets inhibiteurs sur l'ostéoclastogenèse *via* l'IFN γ et l'IL4. Modifié d'après (Takayanagi, 2010).

Facteurs emprisonnés dans la matrice	
TGFβ	Mode d'action complexe selon le type d'étude : - Stimule la production d'OPG et inhibe la production de RANKL (<i>in vitro</i>) - Stimule l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse (<i>in vivo</i>)
IGF-1 IGF-2	Stimulent la différenciation et la survie des ostéoblastes Augmentent la production de collagène de type I et d'ostéocalcine
FGF	Stimule l'ostéoblastogenèse Augmente la synthèse de phosphatase alcaline et d'ostéocalcine
BMP	Stimulent l'ostéoblastogenèse et activent l'expression des marqueurs ostéoblastiques
Facteurs sécrétés par les cellules de l'environnement osseux	
RANKL	Produit par les ostéoblastes, se lie aux récepteurs RANK des pré-ostéoclastes
OPG	Agit comme un récepteur leurre de RANK Bloque l'interaction RANKL/RANK
M-CSF	Induit la différenciation des ostéoclastes
IL1	Stimule l'ostéoclastogenèse en synergie avec RANKL Stimule la production de RANKL par les ostéoblastes
IL4	Inhibe l'ostéoclastogenèse
IL6	Stimule indirectement l'ostéoclastogenèse en augmentant la production RANKL par les ostéoblastes et inhibe la différenciation ostéoblastique
TNFα	Stimule directement et indirectement l'ostéoclastogenèse par la production de M-CSF et de RANKL par les ostéoblastes Inhibe la différenciation ostéoblastique (via RUNX2)
IFNβ	Inhibe l'ostéoclastogenèse
IFNγ	Inhibe l'ostéoclastogenèse
PGE2	Mode d'action complexe selon le mode d'administration : - Augmente la différenciation des ostéoblastes (administration intermittente) - Stimule l'ostéoclastogenèse <i>via</i> l'augmentation de RANKL et la diminution d'OPG par les ostéoblastes (administration continue)

Tableau 3 : Principaux facteurs locaux impliqués dans le contrôle du remodelage osseux.

3.3.3- Le système RANK/RANKL/OPG

L'une des principales voies de régulation du remodelage osseux est la voie RANKL/OPG. RANKL est produit à la surface des ostéoblastes et interagit avec son récepteur membranaire RANK présent à la surface des ostéoclastes et de leurs précurseurs. L'OPG, qui est également sécrétée par les ostéoblastes, fonctionne comme un récepteur leurre qui, en venant se fixer à RANKL, bloque l'interaction de RANKL avec RANK. Au cours du remodelage osseux, RANKL va donc stimuler (par le biais de RANK) la différenciation et l'activité des ostéoclastes ; la résorption osseuse qui résulte de l'activation des ostéoclastes va être en retour régulée négativement par l'OPG (Clézardin, 2011b)(Walsh and Choi, 2014). L'importance du rôle joué par la triade OPG/RANKL/RANK dans le remodelage osseux est illustrée par le phénotype des souris

transgéniques surexprimant l'*Opg* qui présentent une ostéopétrose car l'OPG produite en excès séquestre RANKL l'empêchant d'interagir avec RANK. À l'inverse, des souris déficientes en OPG développent une ostéoporose sévère avec des fractures multiples du fait de l'hyper-résorption osseuse (Bucay et al., 1998). L'inactivation de *RankL* ou de *Rank* chez des souris conduit également à une ostéopétrose car l'interaction entre RANK et RANKL n'existe plus et, par voie de conséquence, la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures, capables de résorber l'os, est inhibée.

3.3.4- Les molécules de guidage axonal

Le remodelage osseux est placé sous le contrôle de diverses molécules regroupant des facteurs de croissance, des facteurs hormonaux et des cytokines. Cependant, il semble de plus en plus probable que des composants du système nerveux jouent également un rôle important dans ce processus. En effet, les molécules de guidage axonal (sémaphorines, nétrines, éphrines, slits) ont initialement été identifiées dans le développement du système nerveux mais de nombreuses études ont également démontré leur implication dans d'autres processus tels l'organogenèse, l'angiogenèse, l'oncogenèse mais également la régulation du remodelage osseux. Le couple éphrine/EPH a notamment été mis en évidence dans l'interaction ostéoclaste/ostéoblaste. Quant aux sémaphorines (et en particulier SEMA3A) elles semblent avoir un effet protecteur contre l'ostéoporose (Hayashi et al., 2012).

3.3.4.1- Éphrines/EPH

Les membres de la famille des éphrines et de leurs récepteurs EPH à tyrosine kinase, ont été dans un premier temps mis en évidence dans le système nerveux et caractérisés pour leur rôle dans le guidage des neurones (Murai and Pasquale, 2003), mais ce sont aussi des facteurs intervenant dans le remodelage osseux (Matsuo and Otaki, 2012). Deux couples s'opposent : l'éphrine-B2 produite par les ostéoclastes et l'EPHB4 produite par les ostéoblastes agissent comme un couple activateur. Ils exercent une signalisation bidirectionnelle qui stimule la différenciation ostéoblastique et inhibe l'ostéoclastogenèse (Mao et al., 2011). Inversement l'éphrine-A2 et l'EPHA2 forment un couple inhibiteur : l'ostéoclastogenèse est activée alors que la différenciation ostéoblastique et la minéralisation sont inhibées (Figure 16) (Irie et al., 2009).

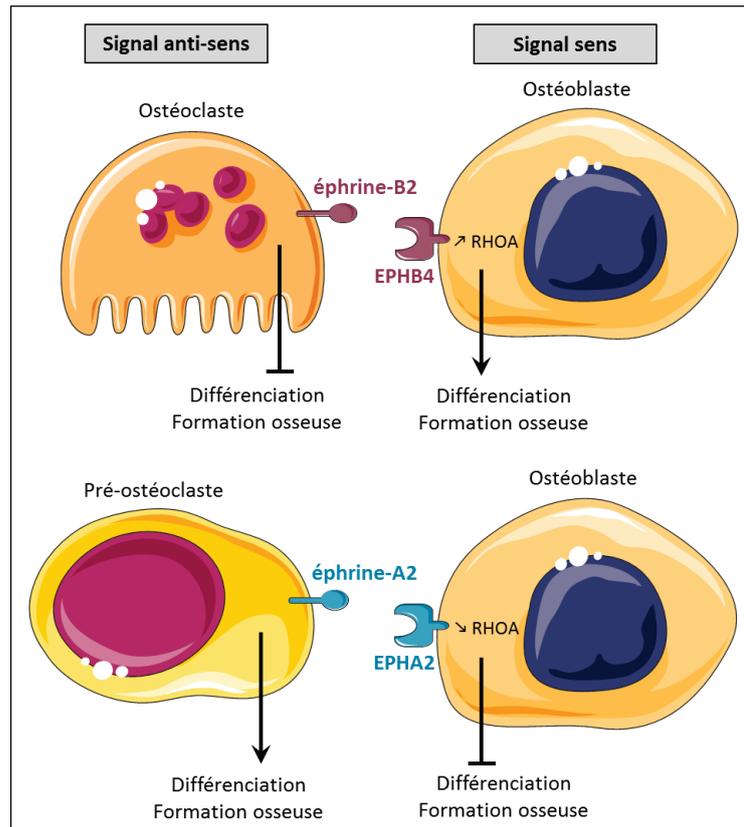


Figure 16 : Interaction ostéoclaste/ostéoblaste via la voie de signalisation éphrine/EPH

Dans le remodelage osseux, l'éphrine-B2 est considérée comme un acteur stimulateur. Dans ce cas, le signal bidirectionnel entre l'éphrine-B2 portée par l'ostéoclaste mature et son récepteur ostéoblastique EPHB4 supprime la résorption osseuse et augmente la formation osseuse, ce qui facilite la transition entre ces deux états lors du remodelage. A l'inverse, l'éphrine-A2 est considérée comme un acteur inhibiteur, puisque le signal «antisens» de l'éphrine-A2 dans les précurseurs ostéoclastiques augmente l'ostéoclastogénèse et donc la résorption osseuse, tandis que le signal «sens» du récepteur EPHA2 supprime la formation osseuse et la minéralisation. Modifié d'après (Matsuo and Otaki, 2012).

3.3.4.2- Sémaforines/plexines, neuropilines

Les molécules de guidage axonal de la famille des sémaforines ont également été décrites pour leur rôle dans l'homéostasie osseuse (Kang and Kumanogoh, 2013). Les voies de signalisation activées par les interactions SEMA6D/plexine A1, SEMA4D/plexine B1 et SEMA3A/neuropiline 1 sont cruciales dans la régulation de la différenciation des ostéoclastes et des ostéoblastes. SEMA3A exerce un effet ostéoprotecteur en supprimant l'activité de résorption des ostéoclastes et en augmentant la formation osseuse par les ostéoblastes (Hayashi et al., 2012). SEMA4D, exclusivement produite par les ostéoclastes, via la plexine B1 non seulement inhibe la minéralisation par les ostéoblastes, mais induit également la formation des ostéoclastes (Negishi-Koga et al., 2011). Quant au couple SEMA6D/plexine A1, il favorise la différenciation des ostéoclastes (Takegahara et al., 2006). Ces observations montrent que la famille des sémaforines est donc essentielle pour maintenir l'homéostasie osseuse. Ces résultats fournissent

ainsi de nouvelles pistes pour le développement d'agents thérapeutiques novateurs pour le traitement des maladies osseuses (Figure 17).

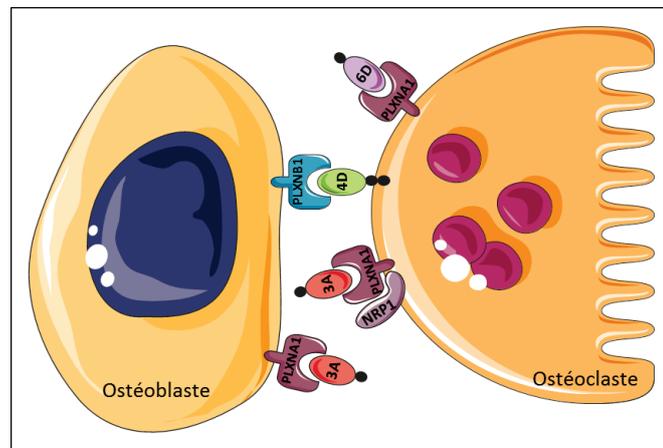


Figure 17 : Interaction ostéoclaste/ostéoblaste via la voie de signalisation sémaphorines/plexines, neuropilines

Modifié d'après (Kang and Kumanogoh, 2013).

B- Les métastases osseuses des carcinomes mammaires

1- Cancers du sein

Depuis 2004, le cancer a pris la place des maladies cardio-vasculaires au premier rang des causes de mortalité dans les pays économiquement développés. On estime à 355 000 le nombre de nouveaux cas de cancers en 2012 en France. Le cancer du sein est le plus largement représenté dans la population féminine avec près de 49 000 nouveaux cas chaque année soit un tiers des nouveaux cas de cancers (Figure 18). Il est aussi le plus mortel avec 12 000 décès en 2012. Différents facteurs de risque sont associés à cette maladie : l'âge, les facteurs environnementaux (habitude alimentaires, alcool, tabac), l'âge de la première grossesse ou encore la composante héréditaire (7 à 10% des cas).

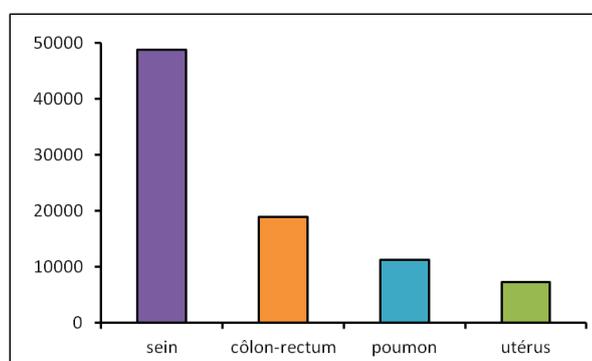


Figure 18 : Cancers les plus fréquents chez la femme

Nombre de nouveaux cas en 2012 en France. Source : INCa 2013.

Il existe plusieurs types de classification des tumeurs mammaires, basés sur différents critères histologiques ou moléculaires. Le but est d'attribuer une signature à chaque cas de cancer du sein afin de proposer le traitement le mieux adapté à la patiente.

1.1- Grades du cancer du sein

La détermination du grade se fait par l'évaluation de trois critères par observation microscopique des cellules tumorales (gradation d'Elston et Ellis) (Elston and Ellis, 1991) :

- la formation de tubules (pourcentage de la tumeur formant des structures canalaire normales)
- le pléomorphisme nucléaire (noyaux uniformes ou plus grands et irréguliers)
- le comptage mitotique (nombre de mitoses dans 10 champs microscopiques)

Un, deux ou trois points sont donnés pour chaque critère, l'addition de ces points donne un score final et les grades correspondants : grade I (3-5 points), grade II (6-7 points) et grade III (8-

9 points). Les cancers de "bas grades" ont tendance à être moins agressifs que les cancers de "hauts grades".

1.2- Stades du cancer du sein

La classification TNM (Tumor Node Metastasis de l'American Joint Committee on Cancer) est un système de classification par stades, couramment utilisé par les cliniciens, qui est basé sur trois caractéristiques (Howlader et al., 2014) :

- la taille de la tumeur (T) de T₀ à T₄
- l'atteinte ganglionnaire (N) de N₀ à N₄
- la présence de métastases (M) de M₀ à M₄

1.3- Classification moléculaire

Mais en plus des paramètres cliniques classiques (âge, statut ganglionnaire, taille de la tumeur, grade histologique), l'hétérogénéité des cancers du sein est reflétée par la présence de marqueurs pathologiques tels que le récepteur aux œstrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur aux facteurs de croissance épidermiques humains (HER2). Les études génomiques ont permis d'établir quatre sous-types majeurs de cancers du sein (Tableau 4).

Caractéristiques de la tumeur	Luminal A (%)	Luminal B (%)	HER2 (%)	Triple négatif (%)
HER2 positivité	12	20	100	10
Présence de récepteurs aux œstrogènes	96	97	46	12
Grade III	19	53	74	84
Tumeur > 2 cm	53	69	74	75
Présence de ganglions N+	52	65	66	40

Tableau 4 : Présentation des grandes caractéristiques des sous-types majeurs de cancers du sein

Source : InfoCancer 2013.

- luminal A (ER⁺/PR⁺, HER2⁻) : ces tumeurs sont caractérisées par une expression des récepteurs hormonaux œstrogènes (ER⁺) et/ou à la progestérone (PR⁺), l'absence de surexpression du gène *HER2* et un taux de mutations p53 faible ; elles sont souvent de bas grade histologique.

- luminal B (ER⁺/PR⁺, HER2⁺) : ces tumeurs possèdent les mêmes caractéristiques en ce qui concerne les récepteurs hormonaux (ER⁺ et/ou PR⁺) mais il y a, plus souvent, une surexpression du gène *HER2* ; elles sont habituellement de haut grade histologique.

- HER2 (ER⁻, PR⁻, HER2⁺) : ces tumeurs surexpriment l'oncoprotéine HER2 mais elles peuvent également exprimer les récepteurs aux estrogènes et à la progestérone.
- basal (ER⁻, PR⁻, HER2⁻) : les cancers du sein de phénotype basal n'expriment ni les récepteurs hormonaux, ni l'oncoprotéine HER2 et sont souvent désignés par le terme « triple négatif ».

Les progrès réalisés dans le dépistage et le traitement du cancer du sein permettent de faire reculer la mortalité chez les patientes, causée essentiellement par l'apparition de métastases se développant à distance de la tumeur primitive. C'est le cas des métastases osseuses qui surviennent dans 60% des formes avancées de cancers du sein (Tableau 5). A ce stade d'évolution, il est très rare de pouvoir proposer un traitement curatif des métastases osseuses. De plus, l'apparition de lésions osseuses est également observée même lors d'une prise en charge précoce des patientes. C'est pourquoi il est primordial de connaître et de comprendre les étapes précoces de formation des métastases osseuses dans le but de développer des thérapies ciblées contre les micrométastases afin de ralentir leur développement et d'améliorer le pronostic vital de ces patientes.

Sous-type	Métastases			
	cérébrales	osseuses	pulmonaires	hépatiques
Luminal A	8%	67%	14%	29%
Luminal B	11%	71%	30%	32%
HER2	23%	62%	42%	45%
Triple négatif	25%	43%	42%	27%

Tableau 5 : Fréquence des sites métastatiques chez les patientes avec un cancer du sein invasif

Source : (Kennecke et al., 2010).

2- Processus métastatique

La métastase (du grec metastasis signifiant : déplacement) correspond à un foyer tumoral secondaire, formé à la suite de la dissémination de cellules cancéreuses par voie sanguine ou lymphatique, à distance du premier foyer (tumeur primaire ou primitive). La distance qui sépare la tumeur primitive de ses métastases implique le franchissement de plusieurs étapes par les cellules tumorales. L'apparition de métastases traduit en général l'entrée de la maladie cancéreuse dans sa phase terminale. En effet, la majorité des décès consécutifs à un cancer est due aux métastases car ces dernières sont le plus souvent résistantes aux thérapies conventionnelles (Tableau 6).

Stade au moment du diagnostic	Cancer du sein	Cancer de la prostate	Cancer du poumon
Localisé (confiné au site primaire)	98,5 %	100%	54,0 %
Régional (envahissement des ganglions lymphatiques loco-régionaux)	84,6 %	100%	26,5 %
Disséminé (métastases)	25,0 %	28,0 %	4,0 %

Tableau 6 : Survie à 5 ans selon le stade au moment du diagnostic

Source : National Cancer Institute 2004-2010.

2.1- Invasion locale et transition épithélio-mésenchymateuse

L'invasion locale fait intervenir principalement deux phénomènes en parallèle : la dégradation du stroma péri-tumoral par des protéases, notamment les métalloprotéases (MMP), et la migration cellulaire. Les cellules cancéreuses ne sont pas la seule source de MMP. Bien que certaines MMP soient synthétisées par les cellules tumorales elles-mêmes (MMP3 et MMP7), d'autres sont principalement produites par les cellules stromales (MMP2 et MMP9) comme les fibroblastes, myofibroblastes, cellules du système immunitaire et cellules endothéliales (Egeblad and Werb, 2002). Les cellules cancéreuses stimulent la production de MMP de manière paracrine *via* la sécrétion d'interleukines, d'interférons et de facteurs de croissance. Le clivage protéolytique de la matrice extracellulaire va conduire à la libération de nombreuses cytokines et de facteurs de croissance (TGF β , FGF, VEGF, etc ...) qui ont un rôle trophique et chimioattractant pour les cellules tumorales. Tous ces facteurs concourent au développement tumoral initial et à la transition épithélio-mésenchymateuse (Radisky and Radisky, 2010).

L'EMT est un processus hautement conservé qui se produit lors de l'embryogenèse et de l'inflammation chronique mais également pendant la progression maligne de nombreux carcinomes agressifs (cancer du sein, de la prostate, du poumon, du pancréas, ...) (Vincent-Salomon and Thiery, 2003)(Giannoni et al., 2010). Moléculairement, l'EMT est définie par la perte des caractéristiques épithéliales et la mise en place concomitante d'un programme d'expression génique mésenchymateux (van Zijl et al., 2011). L'une des caractéristiques majeures de l'EMT est la perte d'expression de l'E-cadhérine et de la β -caténine membranaire, composantes essentielles des jonctions d'adhérence. La régulation négative de la E-cadhérine par les facteurs de transcription SNAIL, ZEB1 (Zinc finger E-Box-binding homeobox 1) et TWIST conduit à l'altération des jonctions d'adhérence et à la translocation de la β -caténine au noyau où elle module la transcription de gènes comme c-myc et la cycline D1. L'expression de marqueurs mésenchymateux telles que la vimentine et la N-cadhérine entraîne un réarrangement du cytosquelette et la formation de fibres de stress et de lamellopodes *via* l'activation de RAC1 et

CDC42. Ce changement d'expression de l'E-cadhérine à la N-cadhérine (ou cadhérine-switch) conduit à un phénotype motile. Ainsi les cellules qui ont subi l'EMT perdent leur organisation épithéliale (perte de polarité apico-basale et des jonctions serrées) au profit d'un phénotype mésenchymateux.

2.2- Circulation dans le sang

L'angiogenèse tumorale, c'est-à-dire la formation de vaisseaux par les cellules endothéliales, est indispensable à la progression tumorale, à la fois pour apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires à la tumeur mais aussi pour permettre l'échappement des cellules tumorales et la formation des métastases. Elle est directement liée au microenvironnement et, en particulier, à la diminution du taux d'oxygène (hypoxie intratumorale) qui induit l'expression de nombreux gènes (*HIF*, *VEGF*, *HO-1*, *NOS*). Les cellules tumorales activent les cellules endothéliales qui recrutent des progéniteurs endothéliaux circulants dans le sang pour former de nouveaux vaisseaux. Cette angiogenèse pathologique est cependant anormale et peu efficace. L'ensemble du microenvironnement tumoral ainsi établi conduit au recrutement de cellules stromales et immunitaires qui participent à la tolérance immunitaire de la tumeur.

Les MMP produites, en dégradant la matrice extra-cellulaire, permettent aux cellules endothéliales d'envahir le stroma tumoral. En effet, le clivage du collagène de type I est requis pour la diffusion des cellules endothéliales dans la MEC et la formation de vaisseaux sanguins. Par ailleurs, la surexpression du facteur de transcription SNAIL dans les cellules de cancer du sein MCF7 favorise l'intravasation des cellules par l'activation de métalloprotéases membranaires MT1-MMP et MT2-MMP et non de métalloprotéases sécrétées ce qui suggère qu'un contact direct entre les cellules tumorales et l'endothélium est requis pour cette étape (Ota et al., 2009). L'entrée des cellules dans les vaisseaux sanguins nécessite également des propriétés de résistance mécanique aux pressions élevées, ainsi qu'une résistance à l'apoptose induite par la perte d'un substrat d'adhésion (appelé anoikis) (Gupta and Massagué, 2006).

2.3- Extravasation

L'arrêt des cellules tumorales circulantes (CTC) correspond à deux phénomènes potentiellement complémentaires : arrêt passif par filtrage et arrêt actif sur une structure endothéliale cible (Bockhorn et al., 2007). D'une part, l'arrêt des CTC peut avoir lieu de manière passive lors du passage dans un vaisseau capillaire de petit calibre. Cet arrêt mécanique repose sur la différence importante de taille entre les éléments figurés du sang et les cellules carcinomateuses, généralement plus volumineuses, et a été observé par vidéomicroscopie *in vivo* (Ito et al., 2001). Cet arrêt mécanique peut être particulièrement favorisé par la formation d'embols néoplasiques due à la modulation des propriétés adhésives des cellules tumorales pour

former des agrégats plaquettaires et augmenter leur chance de survie dans la circulation sanguine (Gay and Felding-Habermann, 2011). La constitution de ces agrégats plaquettaires à la surface des cellules tumorales permet également aux cellules tumorales d'échapper à une reconnaissance par le système immunitaire. D'autre part, les mécanismes d'arrêt cellulaire se rapprocheraient de ceux mis en place par les leucocytes pour gagner les sites inflammatoires : (1) la phase initiale de roulement sur la paroi endothéliale médiée par les E-sélectines ; (2) l'arrêt proprement dit grâce aux intégrines membranaires tumorales capables d'adhérer à un endothélium activé. (3) la phase finale de diapédèse transendothéliale *via* l'activation des petites GTPases de la famille Rho (Ley et al., 2007).

Également par analogie avec les mécanismes de chimiotactisme leucocytaire, le rôle des cytokines et de leurs récepteurs est primordial dans le choix des sites secondaires. Il a été démontré que les cellules tumorales mammaires présentent à leur surface des récepteurs (en l'occurrence CXCR4 et CCR7) pour des chimiokines (CXCL12 et CCL21 respectivement) produites par les organes cibles correspondant au profil métastatique des tumeurs mammaires (foie, poumons, moelle osseuse, ganglions lymphatiques) (Müller et al., 2001). Ces protéines jouent un rôle probablement important dans l'existence de sites métastatiques préférentiels pour chaque type de cancer appelés niches pré-métastatiques.

2.4- Colonisation et transition mésenchymo-épithéliale

La migration à travers l'endothélium est suivie d'une nouvelle interaction avec le microenvironnement de l'organe hôte, qui peut être très différent de celui du site primitif. Il peut survenir alors une étape de dormance cellulaire, pendant laquelle les cellules tumorales disséminées (DTC) ou micrométastases persistent sans proliférer pendant un temps indéterminé, avant de reprendre - ou non - une nouvelle croissance aboutissant à l'apparition de macrométastases. Les mécanismes qui régulent l'entrée et la sortie de la phase de dormance restent obscurs, du fait de la difficulté de modéliser cette étape dans des modèles précliniques murins. Actuellement, trois principaux mécanismes sont proposés pour expliquer l'existence d'une « pause » au cours de la prolifération tumorale : (1) une immunosurveillance par le système immunitaire (Aguirre-Ghiso, 2007)(Romero et al., 2014) ; (2) une modification de l'environnement angiogénique (switch angiogénique) (Naumov et al., 2006)(Baeriswyl and Christofori, 2009) ; (3) un effet inhibiteur du nouveau microenvironnement tumoral (Bragado et al., 2012).

Les carcinomes mammaires et les cellules tumorales circulantes montrent une signature cellulaire et moléculaire caractéristique de la transition épithélio-mésenchymateuse. En revanche les macrométastases sont très largement épithéliales, ce qui suggère que l'EMT durant la formation des métastases est un processus dynamique. En effet, l'injection orthotopique de

cellules mésenchymateuses MDA-MB-231 entraîne la ré-expression de la E-cadhérine suite à la déméthylation de son promoteur au niveau des sites métastatiques (Chao et al., 2010). De plus, les tumeurs primaires de carcinomes mammaires MDA-MB-468 et les métastases pulmonaires associées chez la souris montrent des niveaux d'expression hétérogènes de vimentine (marqueur mésenchymateux) tandis que les CTC présentent des niveaux élevés de vimentine : les CTC auraient subi la transition mésenchymo-épithéliale qui leur permettrait de coloniser un organe secondaire (Bonnomet et al., 2012). Deux études récentes ont fourni des données expérimentales concrètes pour soutenir une telle plasticité épithéliale-mésenchymateuse au cours de la formation des métastases tumorales. Tout d'abord, l'utilisation d'un système inductible pour TWIST1 dans des modèles murins de carcinomes épidermoïdes a démontré que l'activation de l'EMT favorise les étapes précoces de formation des métastases, c'est-à-dire l'invasion locale, l'intravasation et l'extravasation. Cependant, la perte du signal induisant l'EMT au niveau du site distant semble essentielle pour la prolifération cellulaire et la formation de macrométastases (Tsai et al., 2012). D'autre part, la régulation négative d'un nouvel inducteur de l'EMT, PRRX1, dans des cellules de cancer du sein humain BT549 est nécessaire pour la colonisation pulmonaire lors de l'injection dans l'artère caudale. Plus précisément, PRRX1 coopère avec TWIST1 pour favoriser un phénotype invasif, mais la perte de PRRX1 est requise pour revenir à un phénotype épithélial (Ocaña et al., 2012). Ensemble, ces études supportent l'hypothèse d'une réversion de l'EMT nécessaire à la colonisation métastatique.

Les étapes citées ci-dessus font intervenir un nombre important d'effecteurs moléculaires différents (Figure 19), et, pour une cellule tumorale donnée, la probabilité de pouvoir franchir avec succès toutes ces étapes est extrêmement faible.

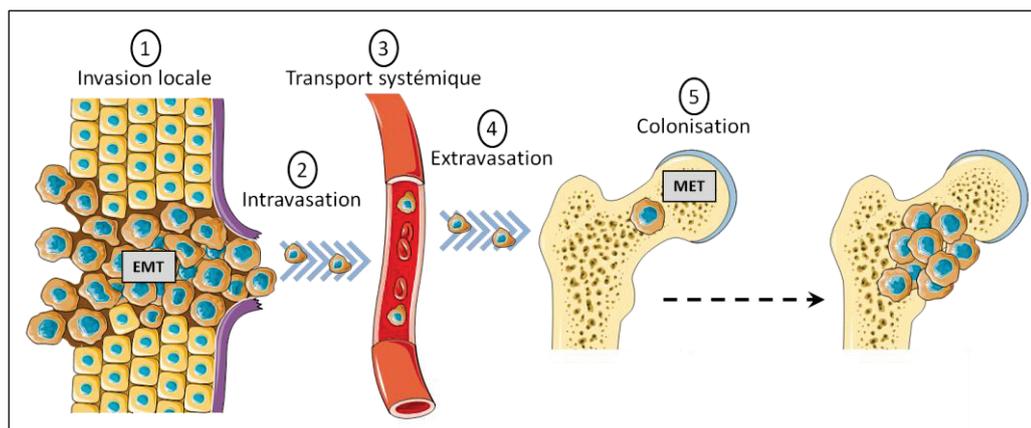


Figure 19 : Représentation schématique des différentes étapes de la cascade métastatique

Des cellules cancéreuses de la tumeur primaire perdent leur capacité d'adhésion et acquièrent un phénotype mobile (1) ce qui leur permet d'intégrer le système vasculaire (2). Ces cellules tumorales circulantes (CTC) peuvent alors disséminer à un autre organe grâce à la circulation sanguine ou lymphatique (3). Au niveau de l'organe cible, les cellules métastatiques interagissent avec les plaquettes, facilitant leur adhésion à la paroi endothéliale et donc l'extravasation (4). Ces cellules tumorales disséminées (DTC) colonisent alors le nouvel environnement pour former des micrométastases puis des macrométastases (5).

3- Ostéotropisme

L'enchaînement complexe d'événements qui conduit à l'apparition de métastases osseuses implique des étapes communes à tous les mécanismes métastatiques (intravasation dans la circulation sanguine depuis la tumeur primaire, établissement d'une niche pré-métastatique dans le tissu hôte, chimiotactisme, extravasation) mais également des processus plus spécifiques au tissu osseux (colonisation de la moelle osseuse, ostéomimétisme, dérégulation de l'activité des ostéoblastes/ostéoclastes). Les métastases osseuses peuvent se manifester dans n'importe quel os du corps. Il arrive parfois qu'une seule région osseuse soit atteinte, mais chez certaines personnes, plusieurs métastases osseuses se développeront et souvent dans différents os du corps. Elles surviennent le plus fréquemment dans les régions suivantes : vertèbres, bassin, côtes, fémur, humérus et crâne.

La notion de localisation préférentielle des métastases remonte aux observations de Stephen Paget en 1889 qui concluait, après avoir revu les autopsies de centaines de patients, que la répartition des métastases n'était pas liée au hasard. Il émit l'hypothèse « de la graine et du sol fertile » (seed and soil hypothesis) : les cellules métastatiques sont prédisposées à se développer dans les organes qui fourniront un milieu favorable à leur croissance. À l'inverse, James Ewing, 40 ans plus tard, défendait l'hypothèse selon laquelle la répartition particulière de certaines métastases était uniquement liée au trajet emprunté par les cellules cancéreuses ; les premiers organes rencontrés étaient ceux où les cellules métastatiques se développaient. Aujourd'hui, ces deux courants se rencontrent : les métastases régionales peuvent s'expliquer par le drainage lymphatique dans les nodules environnant la tumeur, mais la formation de métastases dans des organes éloignés s'explique par la permissivité de ce milieu pour la croissance des cellules métastatiques (Fidler, 2003).

3.1- Niche pré-métastatique

Depuis quelques années le concept de niche pré-métastatique a émergé dans l'étude de la dissémination métastatique. Des facteurs sécrétés par la tumeur primaire (TDSF : Tumor-Derived Secreted Factors) prépareraient à distance les futurs foyers métastatiques à la venue des cellules tumorales. Les TDSF d'origine tumorale favorisent la mobilisation et le recrutement des cellules dérivées de la moelle osseuse qui interagissent avec le stroma local et la matrice extra-cellulaire dans les organes secondaires pour créer un micro-environnement approprié pour la colonisation par les cellules métastatiques. Ainsi, des cellules issues d'un carcinome pulmonaire, introduites dans une souris à laquelle un surnageant produit par des cellules de mélanome a été administré, forment des métastases dans des organes généralement ciblés par les cellules de mélanome, mais rarement par celles de cancers du poumon (Kaplan et al., 2005).

En réponse à des facteurs solubles tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et le PlGF (Placental Growth Factor) sécrétés par la tumeur primaire, des cellules hématopoïétiques progénitrices VEGFR1⁺ et des macrophages se regroupent au niveau du site secondaire créant ainsi un terreau favorable à l'invasion, l'adhésion, la survie et la prolifération des cellules tumorales (Kaplan et al., 2005). Le rôle des facteurs sécrétés par les tumeurs primaires est double. D'une part, les cellules hématopoïétiques recrutées *via* leur récepteur à la fibronectine interagissaient avec les fibroblastes résidents pour stimuler la production de fibronectine formant ainsi un site d'ancrage efficace pour les cellules tumorales migrantes. D'autre part, les fibroblastes activés (ou myofibroblastes) sécrètent à leur tour des facteurs comme des MMP9 et du CXCL12 qui attireront les cellules tumorales dans cette niche.

D'autres facteurs sécrétés par les cellules tumorales comme la lysyl oxydase (LOX) augmentent la rigidité de la matrice extracellulaire en la réticulant ce qui permet aux cellules tumorales de s'ancrer plus facilement à cette matrice rigidifiée (Erler et al., 2009). Cette matrice un peu particulière sert de point d'ancrage aux cellules tumorales et est donc un élément essentiel de la niche pré-métastatique. L'activité de la LOX favorise également le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse CD11b⁺ dont les propriétés immunosuppressives conduisent à un environnement permissif supportant la colonisation par les cellules tumorales (Joo et al., 2014).

Bien que l'existence des niches pré-métastatiques soit à présent largement acceptée par la communauté scientifique comme un processus biologique à part entière dans la croissance métastatique la question à présent est de savoir si cela est nécessaire et requis pour la formation des métastases. Il est probable que les niches pré-métastatiques ne soient pas essentielles à la formation des métastases mais diverses études suggèrent qu'elles augmentent considérablement la probabilité de progression métastatique.

3.2- Chimiotactisme

Les mécanismes mis en place par les cellules cancéreuses sont les mêmes que ceux utilisés par les cellules souches hématopoïétiques lorsqu'elles infiltrent l'os. Un grand nombre d'études ont montré le rôle pivot des chimiokines et de leurs récepteurs dans la migration des cellules cancéreuses vers un organe tel que l'os (Gladson and Welch, 2008)(Mukherjee and Zhao, 2013). Parmi ces cytokines, CXCL12 est abondamment sécrétée au niveau des ganglions lymphatiques, des poumons et de la moelle osseuse qui constituent les sites privilégiés des métastases du cancer du sein. La fixation de CXCL12 sur son récepteur CXCR4, présent en grande quantité à la surface des cellules cancéreuses, entraîne la polymérisation de l'actine et la formation de pseudopodes dans les cellules de cancer du sein, et induit une réponse chimiotactique et invasive. Des extraits protéiques de poumon et de moelle osseuse provoquent une réponse migratrice des cellules MDA-MB-231 contrairement aux extraits de muscles, ce qui indique que ces organes contiennent des

facteurs chimiotactiques : l'utilisation d'anticorps dirigés contre CXCL12 ou CXCR4 neutralise d'ailleurs ces effets (Müller et al., 2001). Différentes molécules de signalisation ont été impliquées dans la migration cellulaire médiée par CXCR4 mais l'activation prolongée d'Akt via CXCR4 dans les cellules de cancer du sein semble être l'une des voies de signalisation importante pour le chimiotaxisme de ces cellules (Zhao et al., 2008). L'axe de signalisation CXCR4/CXCL12 peut induire l'angiogenèse et la progression des tumeurs en augmentant l'expression de VEGF par l'activation de la voie PI3K/Akt (Liang et al., 2007). Récemment une isoforme particulière de CXCL12, CXCL12 γ a été décrite pour son implication spécifique dans la formation des métastases osseuses en raison de son activation préférentielle du récepteur CXCR4 par rapports aux autres isoformes CXCL12 α et CXCL12 β (Ray et al., 2014). Chez l'animal, CXCR4 contrôle la croissance et la dissémination métastatique des carcinomes mammaires (Smith et al., 2004). Récemment, il a été montré que l'inhibition pharmacologique de CXCR4 par le CTCE-9908 inhibe la dissémination métastatique des cellules MDA-MB-231 au poumon et à l'os, démontrant ainsi le potentiel thérapeutique du ciblage de CXCR4 (Richert et al., 2009). D'autres travaux ont démontré que CXCL12 se lie également à un autre récepteur à sept domaines transmembranaires appelé CXCR7 (Chemokine CXC Receptor 7). Ce récepteur pourrait fonctionner comme un récepteur leurre en piègant CXCL12 α ou comme un co-récepteur de CXCR4 en favorisant la voie de signalisation activée par CXCL12 (Sun et al., 2010).

Hormis l'axe CXCL12/CXCR4, La voie RANK/RANKL joue également un rôle très important dans le tropisme osseux. De nombreuses lignées cellulaires de cancer du sein et de la prostate expriment le récepteur RANK et le traitement par RANKL induit dans ces cellules un remaniement du cytosquelette et une stimulation de la migration *in vitro* (Jones et al., 2006). D'autre part, RANKL peut être produit sous une forme soluble grâce à l'action de métalloprotéases matricielles (MMP-7, MMP-13) ou membranaires (MT-MMP-1) permettant alors à cette molécule d'être libérée de la surface membranaire des ostéoblastes et de stimuler la migration vers la moelle osseuse des cellules tumorales qui expriment le récepteur RANK (Lynch et al., 2005)(Sabbota et al., 2010).

Le calcium est un autre médiateur qui permet la migration des cellules souches hématopoïétiques dans l'os car ces cellules expriment le récepteur au calcium CASR (Calcium-Sensing Receptor). Or, les cellules de cancer du sein et de la prostate expriment le CASR et le calcium stimule *in vitro* la migration et la prolifération de ces cellules (Joeckel et al., 2014). Il est donc probable que le calcium, à l'instar de CXCL12 et RANKL, favorise la migration des cellules tumorales vers ces niches endostéales.

3.3- Nidation dans la moelle osseuse

Les cellules souches hématopoïétiques migrent dans la moelle osseuse par diapédèse et chimiotaxisme comme les cellules tumorales. Suite à cette observation, un nouveau mécanisme d'ancrage des cellules cancéreuses dans la niche osseuse a été proposé : les cellules tumorales entreraient en concurrence directe avec les CSH résidentes dans la niche endostéale. En effet, la co-injection de cellules de cancer de la prostate et de CSH diminue l'ancrage des CSH dans la moelle osseuse. Il a d'ailleurs été observé un nombre réduit de CSH chez les souris porteuses de micrométastases médullaires. Et par imagerie photonique, les cellules tumorales sont localisées dans la même région osseuse. Ces récentes observations soulèvent à leur tour deux remarques. Tout d'abord, en raison des signaux provenant de la niche endostéale des CSH qui contribuent à leur survie et à leur quiescence (*voir section A-2.2.2*), il est possible que les cellules cancéreuses qui prennent leur place acquièrent, elles aussi, ces caractéristiques, facilitant ainsi leur dormance. D'autre part, l'utilisation d'agents mobilisant les CSH hors de la niche pourrait également avoir un effet sur les cellules cancéreuses. En effet, le traitement des souris avec un antagoniste de CXCR4 (AMD3100) ou du G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor), deux agents mobilisateurs puissants pour les CSH, conduit à la sortie des cellules tumorales hors de la moelle osseuse.

3.4- Ostéomimétisme

Les cellules tumorales qui disséminent dans la moelle osseuse doivent s'adapter à l'environnement osseux pour ultérieurement y proliférer. C'est probablement pour cette raison que les DTC qui sont présentes dans la moelle osseuse restent pendant plusieurs années dans un état de quiescence avant d'être réactivées et de se mettre à proliférer. Cette adaptation nécessite que les cellules tumorales expriment des gènes qui sont normalement exprimés par les cellules osseuses. Ce processus est appelé ostéomimétisme.

L'analyse immunohistochimique de tumeur primaire et ses métastases associées (foie, poumon, os) de patientes atteintes d'un cancer du sein a montré que seules les cellules métastatiques exprimaient des protéines d'origine osseuse (cathépsine K, intégrine β_3 , ostéonectine, cadhérine 11, connexine 43 et RUNX2) (Bellahcène et al., 2007)(Le Gall et al., 2007). L'importance de l'ostéomimétisme dans le développement de métastases osseuses n'est pas clairement définie. Néanmoins, son rôle semble être important car la transfection de lignées de carcinome mammaire humain avec un dominant négatif de RUNX2 diminue de manière significative la capacité de ces cellules à former *in vivo* des métastases ostéolytiques et à favoriser les cytokines ostéoclastogéniques (Javed et al., 2005) et sa modulation dans des cellules de cancer de la prostate PC3 est associée à la progression des lésions ostéolytiques (Akech et al., 2010). Il est donc probable que l'acquisition d'un phénotype ostéoblastique par les cellules tumorales favorise leur intégration, leur survie et leur prolifération dans l'environnement osseux.

4- Métastases ostéolytiques

Les métastases osseuses peuvent être divisées en deux grandes catégories : les métastases ostéolytiques qui sont associées à une destruction osseuse et les métastases ostéocondensantes qui sont caractérisées par un excès de formation osseuse. Elles peuvent également être ostéolytiques et ostéocondensantes, elles sont alors qualifiées de mixtes. Le cancer du sein et le myélome multiple sont plus fréquemment associés à des lésions ostéolytiques par rapport au cancer de la prostate qui induit principalement la formation de métastases ostéocondensantes ou mixtes (Figure 20).

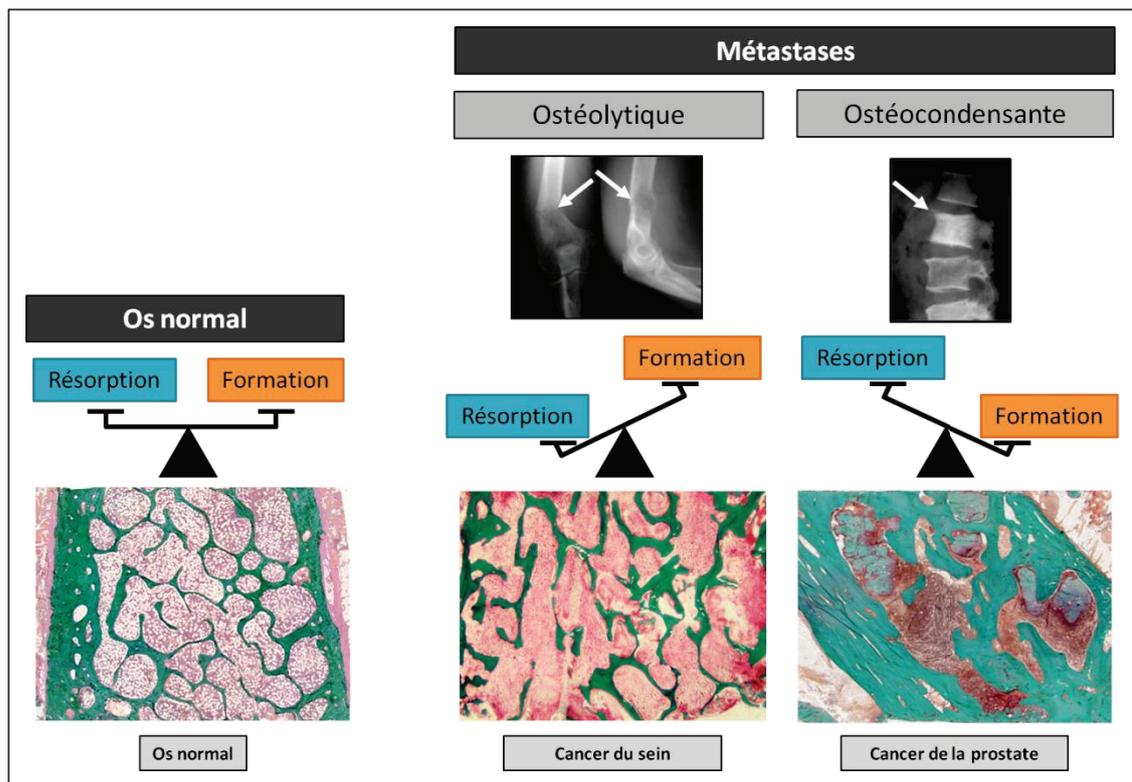


Figure 20 : Visualisation de métastases ostéolytiques et ostéocondensantes en radiographie et en histologie

Sur les radiographies, les flèches blanches désignent les plages d'ostéolyse ou les zones d'ostéoformation. Une coloration au trichrome de Goldner permet de visualiser la matrice minéralisée en vert, les cellules de la moelle en rouge et celles de la tumeur en rose.

L'arrivée de cellules de cancer du sein dans le microenvironnement osseux perturbe les réseaux de régulation normale qui existent entre les ostéoblastes et les ostéoclastes et fait pencher la balance homéostatique vers une activité accrue des ostéoclastes, entraînant une résorption osseuse excessive. L'augmentation de la résorption va alors permettre la libération de facteurs de croissance emprisonnés dans la matrice osseuse qui vont à leur tour être capables de stimuler la prolifération et la survie des cellules tumorales constituant ainsi un cercle vicieux.

4.1- Stimulateurs de la résorption osseuse

Les cellules tumorales sécrètent différents facteurs qui stimulent l'activité des ostéoclastes et donc la résorption osseuse. La PTHRP (Parathyroid Hormone-Related Protein) est un peptide qui possède 70% d'identité dans sa partie N-terminale avec la PTH, capable de se fixer au récepteur de la PTH (PTH1R) présent à la surface des ostéoblastes et de stimuler l'expression de RANKL, ce qui conduit indirectement à la formation de nouveaux ostéoclastes et donc à une stimulation de la résorption osseuse. Chez les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique, les niveaux de PTHRP sont augmentés dans les métastases osseuses par rapport à la tumeur primaire (Henderson et al., 2006). Un traitement avec un anticorps humanisé dirigé contre la PTHRP inhibe les métastases osseuses induites par les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 (Saito et al., 2005). A l'inverse, l'expression ectopique de la PTHRP dans les cellules MDA-MB-231 entraîne une augmentation des lésions lytiques associée à une hypercalcémie après injection chez la souris (Guise et al., 2002).

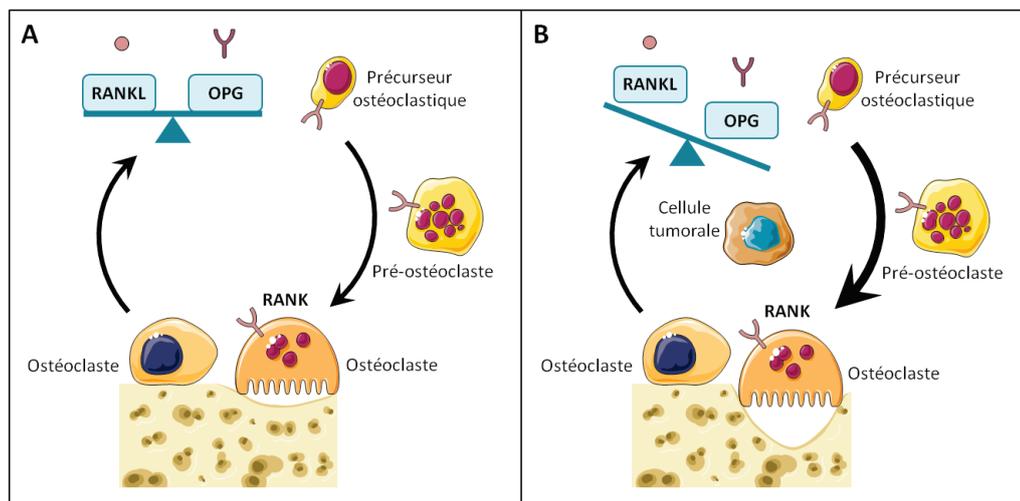


Figure 21 : Rôle la triade RANK/RANKL/OPG dans la formation des métastases osseuses

A. Au cours du remodelage osseux, la cytokine RANKL, qui est exprimée à la surface des ostéoblastes, interagit avec son récepteur membranaire RANK, qui est présent à la surface des ostéoclastes et de ses précurseurs. Il en résulte une stimulation de la différenciation et de l'activité des ostéoclastes qui conduit à la résorption osseuse. Cette résorption osseuse est régulée négativement par l'ostéoprotégérine (OPG) qui, en venant se fixer à RANKL, bloque l'interaction RANK/RANKL. **B.** Au cours de la formation des métastases osseuses, la balance RANKL/OPG est déséquilibrée. Les cellules tumorales stimulent la production de RANKL par les ostéoblastes et inhibent celle de l'OPG. Il en résulte une augmentation de la résorption osseuse. Modifié d'après (Clézardin, 2011b).

Plusieurs autres facteurs, tels que les interleukines (IL6, IL8, IL11) et le macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), peuvent être aussi sécrétés par les cellules tumorales présentes dans l'environnement osseux. Ces interleukines stimulent la résorption osseuse de la même façon que la PTHRP : elles agissent sur les ostéoblastes en stimulant l'expression de RANKL et en inhibant

celle de l'ostéoprotégérine (OPG). La répression de l'expression de l'OPG favorisera donc l'action pro-ostéoclastique de RANKL. L'importance du rôle joué par la triade RANK/RANKL/OPG dans la formation des lésions osseuses a fait de celle-ci une cible thérapeutique de choix (Figure 21) (Clézardin, 2011b).

Les MMP sont impliquées dans toute la cascade métastatique, et plus spécifiquement dans l'invasion de l'os et la formation des métastases osseuses en favorisant localement la production de RANKL actif. Elles peuvent avoir un effet direct comme les MMP-7 qui clivent le RANKL présent à la surface des ostéoblastes et des cellules tumorales (Lynch et al., 2005) ; ou indirect comme les MMP-1 et ADAMTS1 qui libèrent de la surface des cellules tumorales des ligands de l'EGF qui vont se fixer sur leurs récepteurs présents sur les ostéoblastes et diminuer la production d'OPG. MMP-1 et ADAMTS1 augmentent également l'expression de RANKL par un mécanisme inconnu. La modification du ratio RANKL/OPG dans le microenvironnement osseux en faveur du RANKL favorise la différenciation des ostéoclastes et la destruction osseuse (Lu et al., 2009). Les MMP-13 peuvent également augmenter l'expression locale de RANKL dans les cancers du sein en activant le TGF β *via* MMP-9 (Nannuru et al., 2010).

D'autres mécanismes autocrine/paracrine sont décrits pour favoriser l'ostéolyse tumorale, c'est le cas de la voie de signalisation jagged 1/notch. Jagged 1, présenté par les cellules de cancer du sein, se lie à notch, présent à la surface des cellules osseuses. Ainsi jagged 1 favorise à la fois la croissance tumorale en stimulant la libération d'IL6 par les ostéoblastes et active directement la différenciation des ostéoclastes (Figure 22) (Sethi et al., 2011).

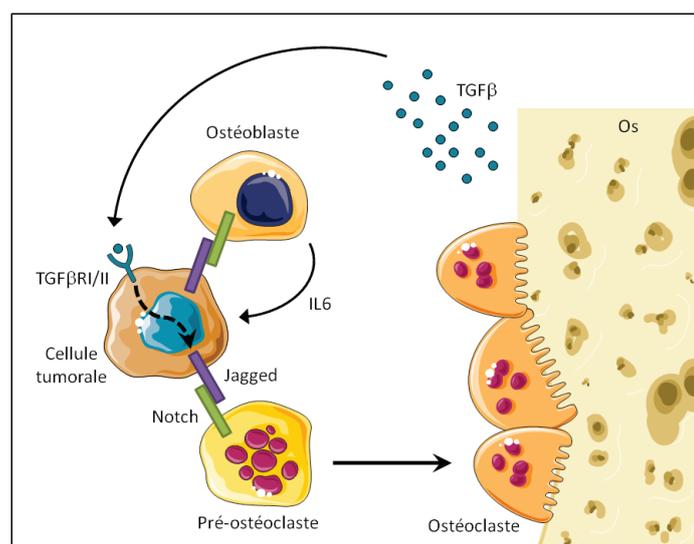


Figure 22 : Voie jagged/notch

Jagged 1 est surexprimé dans les cellules tumorales et est activé par le TGF β libéré par la matrice osseuse résorbée. Les cellules métastatiques osseuses produisant jagged 1 interagissent avec le récepteur notch présent à la surface des cellules osseuses, ce qui stimule la sécrétion d'IL6 par les ostéoblastes et favorise la différenciation des ostéoclastes. Modifié d'après (Sethi et al., 2011).

4.2- Inhibiteurs de la formation osseuse

Les cellules tumorales non seulement stimulent l'activité des ostéoclastes, mais 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 d'une protéine soluble, Dickkopf- 1 (DKK-1). DKK-1 inhibe directement la différenciation ostéoblastique en bloquant l'action des protéines de la famille WNT et active la différenciation ostéoclastique en inhibant la synthèse de l'OPG par les ostéoblastes (Bu et al., 2008). Un autre inhibiteur de la voie WNT, la sclérostine (SOST) inhibe fortement la différenciation ostéoblastique et la minéralisation *in vitro*. En revanche, l'ostéoblastogenèse n'est plus altérée lorsque que le milieu conditionné est déplété en SOST après immunoprécipitation avec un anticorps anti-SOST (Mendoza-Villanueva et al., 2011).

Les cellules tumorales (sein, prostate) capables d'induire des lésions ostéolytiques chez les animaux produisent également un facteur soluble noggin (Schwaninger et al., 2007). Noggin est une protéine antagoniste des BMP qui bloque l'interaction entre les BMP et leurs récepteurs présents à la surface des ostéoblastes (Groppe et al., 2002), ce qui conduit à l'inhibition de la translocation nucléaire des protéines intracellulaires SMAD1 et SMAD5 connues pour stimuler l'expression des gènes codant pour les facteurs de transcription RUNX2 et OSX. Ainsi, en bloquant la fixation des BMP à leur récepteur, noggin inhibe la transcription des gènes proostéoblastiques. En effet, la croissance des métastases osseuses formées par les cellules PC3 déplétées en noggin est limitée, très probablement en raison de la persistance de l'activité des ostéoblastes (Secondini et al., 2011). Très récemment, noggin a été décrit comme essentiel dans les stades précoces de mise en place des métastases osseuses du cancer du sein, son expression permettant la colonisation spécifique du site osseux et l'activation des ostéoclastes (Tarragona et al., 2012).

4.3- Contribution du tissu osseux

Le tissu osseux est un réservoir important de facteurs de croissance, dont le TGF β et l'IGF (Insulin-like Growth Factor). Le TGF β , lorsqu'il est libéré de la matrice osseuse, agit sur les cellules tumorales, par le biais des voies de signalisation dépendantes des protéines SMAD, pour stimuler la production de facteurs pro-ostéoclastiques comme la PTHRP, l'IL6, l'IL8 et l'IL11. Ces facteurs favorisent l'augmentation du taux d'expression de RANKL dans les ostéoblastes, ce qui entraîne alors l'ostéoclastogenèse (Bendre et al., 2005). Le TGF β actif libéré stimule également l'expression de jagged 1 dans les cellules cancéreuses, ce qui active la signalisation notch dans les ostéoclastes et les ostéoblastes et favorise la croissance tumorale (Figure 22) (Sethi et al., 2011). De surcroît, le TGF β lui-même exerce des effets directs sur les cellules osseuses en stimulant l'activité des ostéoclastes et en inhibant la différenciation des ostéoblastes (Balooch et al., 2005).

Dans leur ensemble, les effets de TGF β alimentent le cercle vicieux en stimulant la croissance des cellules cancéreuses et la résorption osseuse.

D'autres facteurs de croissance comme les IGF-1 et -2 stimulent la migration et la prolifération des cellules tumorales en inhibant l'apoptose dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 (Hiraga et al., 2012). Et le traitement d'animaux avec un anticorps anti-IGF-2 bloque la croissance au site osseux des cellules de la lignée humaine de carcinome prostatique MDA-PCa-2b (Kimura et al., 2010).

Le calcium libéré de la matrice osseuse minéralisée contribue au cercle vicieux. Le calcium est le principal minéral composant la matrice osseuse et, dans le microenvironnement osseux, son niveau est constant et étroitement régulé (entre 1,1 et 1,3 mM). Or la résorption osseuse par les ostéoclastes activés provoque la libération d'ions calcium Ca²⁺ dans la moelle osseuse (jusqu'à 40 mM) (Kingsley et al., 2007). Le récepteur sensible au calcium extracellulaire (CASR) est exprimé dans les tissus normaux et surexprimé dans plusieurs types de cancer, notamment ceux du sein et de la prostate (Mihai et al., 2006)(Liao et al., 2006). Le CASR régule la sécrétion de PTHRP, dont le rôle dans les métastases osseuses ostéolytiques a été décrit précédemment (*voir section B-4.1*). L'expression d'une forme dominante négative du CASR dans les cellules cancéreuses de la prostate inhibe la libération de PTHRP stimulée par le calcium, alors qu'un pré-traitement avec du TGF β augmente la sécrétion de PTHRP (Sanders et al., 2001). Ainsi le TGF β et le Ca²⁺ libérés coopèrent lors de l'ostéolyse pour augmenter le niveau de PTHRP produit par les cellules cancéreuses, alimentant ainsi le cercle vicieux.

Les microenvironnements hypoxiques, tels que l'os (1 à 7% d'O₂), favorisent la croissance tumorale ainsi que le développement des métastases. Le facteur de transcription inductible par l'hypoxie HIF1 est le régulateur majeur de l'adaptation à l'hypoxie (Liao et al., 2007). Ainsi, une surexpression d'HIF1 α diminue fortement la différenciation des ostéoblastes, tandis qu'il induit une augmentation la formation ostéoclastique (Hiraga et al., 2007). Dans un modèle murin, un traitement combiné avec des inhibiteurs pharmaceutiques des voies de signalisation de l'hypoxie et du TGF β réduit la résorption ostéoclastique et la croissance tumorale. Ces données indiquent que l'hypoxie et le TGF β agissent en parallèle sur l'activité ostéoclastique et sur la régulation d'un ensemble de gènes tumoraux (Dunn et al., 2009). De plus, l'expression de facteurs pro-métastatiques (VEGF et CXCR4) est augmentée *in vitro* et *in vivo* lorsque les deux voies interagissent.

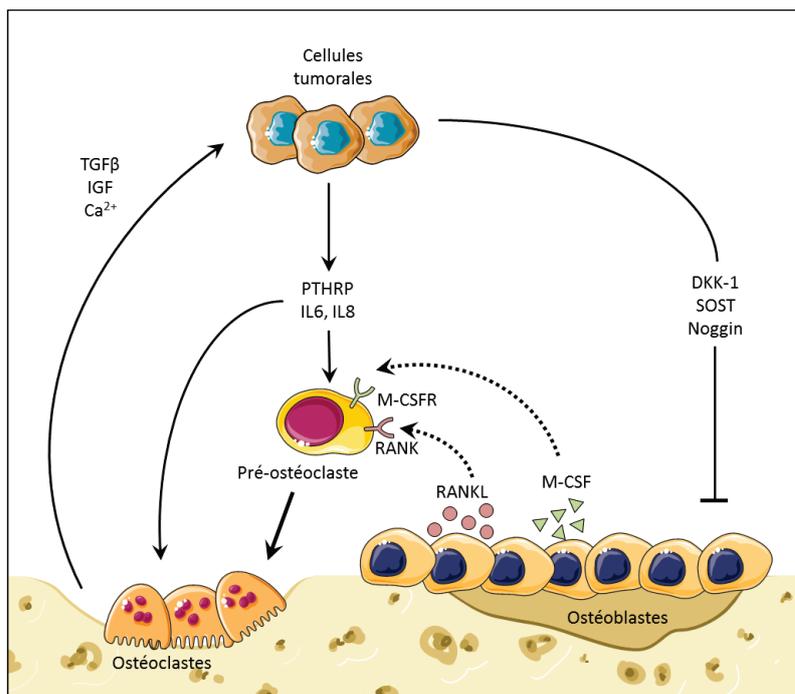


Figure 23 : Représentation des interactions moléculaires entre les cellules tumorales et l'environnement osseux dans le développement de métastases ostéolytiques

A l'arrivée des cellules tumorales dans l'environnement osseux un cercle vicieux se met en place dans lequel les cellules tumorales sécrètent des facteurs de stimulation des ostéoclastes et des inhibiteurs des ostéoblastes alors que la résorption osseuse libère de la matrice des facteurs de croissance favorables aux cellules tumorales.

Protéines	Rôle	Conséquence
PTHRP	Stimule la synthèse de RANKL par les ostéoblastes	++ résorption osseuse
RANKL	Se fixe sur son récepteur RANK à la surface des pré-ostéoclastes	++ résorption osseuse
OPG	Se fixe sur RANKL en tant que récepteur leurre	++ résorption osseuse
IGF-1	Stimule la migration et la prolifération des cellules tumorales	++ croissance tumorale
TGFβ	Stimule la production de PTHRP, d'IL8 et d'IL11 et la prolifération des cellules tumorales	++ résorption osseuse ++ croissance tumorale
c-SRC	Stimule la synthèse d'IL6	++ résorption osseuse
PGE2	Stimule la synthèse de RANKL par les ostéoblastes	++ résorption osseuse
ATX	Stimule la synthèse de LPA	++ résorption osseuse
IL6, IL8	Stimule l'ostéoclastogénèse	++ résorption osseuse
Activine A	Stimule l'ostéoclastogénèse et la différenciation des ostéoclastes Inhibe l'activité ostéoblastique et l'ostéoblastogénèse	++ résorption osseuse -- formation osseuse
DKK-1, SOST	Inhibent la voie WNT	-- formation osseuse
Noggin	Inhibe la voie des BMP	-- formation osseuse

Tableau 7 : Récapitulatif des principales molécules impliquées dans la mise en place des métastases ostéolytiques.

En l'état actuel des connaissances, ce n'est donc pas la cellule tumorale elle-même qui résorbe directement l'os mais elle détourne à son profit l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes présents dans le tissu. Il se crée alors localement entre la cellule tumorale et les cellules osseuses une synergie que l'on appelle « cercle vicieux ». Les cellules tumorales produisent des facteurs qui stimulent la résorption osseuse et freinent la formation de la matrice. La résorption accrue libère des facteurs de croissance piégés dans la matrice osseuse qui stimulent à leur tour la croissance des cellules tumorales générant un cercle vicieux dans lequel les phénomènes de destruction osseuse et de prolifération tumorale s'entretiennent mutuellement. L'ensemble des molécules décrites précédemment et leurs interactions sont résumés dans la Figure 23 et le Tableau 7.

La prise en charge des patients présentant des métastases osseuses implique donc à la fois un traitement global mais également une prise en charge spécifique osseuse locale et systémique.

5- Stratégies thérapeutiques médicamenteuses

Le squelette est le deuxième site le plus fréquent pour l'apparition de métastases. Cependant, un nombre limité de tumeurs solides, dont les tumeurs du sein et de la prostate, sont responsables de la majorité des métastases osseuses. Celles-ci sont la cause majeure de la morbidité chez les patients. Les métastases osseuses sont caractérisées par de fortes et intenses douleurs dues à des complications squelettiques et hématopoïétiques (fractures, compression nerveuse, aplasie) nécessitant une prise en charge hospitalière. Malgré la fréquence des métastases osseuses, les options de traitements actuellement disponibles restent insatisfaisantes.

La mise en évidence qu'il existe une interaction entre les cellules osseuses et les cellules tumorales a conduit à l'utilisation d'inhibiteurs de la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes tels que les bisphosphonates ou le denosumab dans le traitement des lésions osseuses. Ces traitements bloquant l'activité ostéoclastique permettent de retarder l'apparition des métastases osseuses et de réduire le risque de complications osseuses chez les patients atteints de métastases osseuses. Cependant, les progrès dans la compréhension de la biologie des métastases osseuses montrent clairement que non seulement une destruction de l'os a lieu, mais également une inhibition de la formation osseuse, ce qui suggère que les agents qui neutralisent l'inhibition de l'activité des ostéoblastes peuvent présenter un intérêt dans le traitement des métastases osseuses (Figure 24 et Tableau 8). D'autres types de cellules dans le microenvironnement de la moelle osseuse telles que les cellules endothéliales, les cellules myéloïdes, les cellules immunitaires, les plaquettes et les fibres nerveuses sensorielles sont également susceptibles de contribuer à la progression des métastases osseuses et peuvent être des cibles thérapeutiques prometteuses (Weilbaecher et al., 2011).

5.1- Thérapies ciblant les ostéoclastes

Les facteurs qui favorisent la différenciation (système RANKL/RANK) ou l'activité résoptrice (SRC, cathépsine K) des ostéoclastes représentent des cibles thérapeutiques prometteuses pour l'inhibition de la résorption osseuse pathologique.

Les amino-bisphosphonates (comme le zolédronate) du fait de leur capacité à se fixer au minéral osseux et à inhiber la résorption osseuse sont les agents pharmacologiques les plus utilisés en clinique pour le traitement et la prévention des complications associées à la présence de métastases osseuses chez les patients ayant un cancer du sein, de la prostate, du poumon ou un myélome multiple. Ces amino-bisphosphonates inhibent spécifiquement la farnésyl pyrophosphate synthase, une enzyme clé de la voie du mévalonate, ce qui conduit au blocage de la prénylation des petites GTPases et à l'inactivation des fonctions ostéoclastiques (van Beek et al., 1999). Les données cliniques montrent que l'utilisation en situation néoadjuvante du zolédronate dans le traitement de patientes avec un cancer du sein réduit de 40% la survenue de métastases osseuses mais également viscérales (Coleman et al., 2012). En plus de l'effet exercé sur l'activité résoptrice des ostéoclastes, les bisphosphonates peuvent cibler d'autres types cellulaires qui favorisent les métastases osseuses tels que les lymphocytes $T\gamma\delta$ (Benzaïd et al., 2012) voire les cellules tumorales elles-mêmes (Senaratne et al., 2000). Récemment, la microscopie biphotonique intravitale en temps réel a permis d'observer que l'effet anti-tumoral des bisphosphonates était médié par les macrophages associés aux tumeurs (TAM) (Junankar et al., 2015).

Le ciblage thérapeutique de RANKL avec un anticorps monoclonal (dénosumab) suscite actuellement un vif intérêt en clinique. L'Agence Européenne du Médicament (EMA) a en effet émis un avis positif le 19 mai 2011 pour l'octroi d'une autorisation de mise sur le marché pour le denosumab dans l'indication « prévention des complications osseuses (fractures pathologiques, compression médullaire, irradiation ou chirurgie osseuse) chez les patients adultes présentant des tumeurs solides avec métastases osseuses » (Kopper, 2012). Le dénsumab inhibe la résorption osseuse en bloquant l'interaction RANKL/RANK et donc la maturation des ostéoclastes (Stopeck et al., 2010). De plus, cet anticorps peut être efficace en ciblant directement les cellules de cancers du sein et de la prostate qui expriment RANKL.

D'autres thérapies ciblant les ostéoclastes sont en cours d'évaluation clinique pour le traitement des métastases osseuses, notamment des inhibiteurs de la cathépsine K (Duong et al., 2014) et de la tyrosine kinase SRC (Rucci et al., 2008). La cathépsine K est une protéase lysosomale, produite en grande quantité par les ostéoclastes, qui joue un rôle important dans la résorption osseuse (Novinec and Lenarčič, 2013). L'odanacatib, un inhibiteur de la cathépsine K, diminue la résorption osseuse et maintient la formation osseuse. Quant à la tyrosine kinase SRC,

son inhibition conduit au blocage de la résorption osseuse par les ostéoclastes (Boyce and Xing, 2011). En outre, SRC est essentielle pour la survie et la croissance des cellules de cancer du sein dans la moelle osseuse (Zhang et al., 2009b). D'ailleurs des études pré-cliniques ont montré que des inhibiteurs de SRC (CGP76030, PA 23451, dasatinib) inhibent avec succès l'invasion des cellules du cancer du sein, la croissance et la formation des métastases osseuses chez les animaux. Ainsi, SRC dans les ostéoclastes et les cellules cancéreuses pourrait être une cible thérapeutique. Actuellement, deux anticorps anti-SRC (dasatinib, saracatinib) sont en cours d'études cliniques chez des patients atteints de tumeurs solides et de métastases osseuses.

5.2- Thérapies ciblant les ostéoblastes

La prise de conscience que les lésions ostéolytiques entraînaient non seulement un renforcement de la résorption osseuse par les ostéoclastes, mais également une inhibition de la formation osseuse a conduit au développement de stratégies thérapeutiques visant à rétablir la fonction des ostéoblastes.

La voie de signalisation WNT joue un rôle clé dans l'ostéoblastogenèse. Les protéines WNT se lient aux récepteurs frizzled et aux protéines LRP 5/6 (Low-density lipoprotein Receptor-related Protein) pour activer, *via* la β -caténine, différents facteurs de transcription associés à la différenciation ostéoblastique. Or DKK-1 et SOST, deux inhibiteurs de la voie WNT, sont produits par les cellules du cancer du sein qui induisent *in vivo* des lésions ostéolytiques chez les animaux (Suvannasankha and Chirgwin, 2014). Deux anticorps neutralisants sont actuellement à l'étude, l'un ciblant DKK-1 (BHQ880) dans les myélomes multiples (Fulciniti et al., 2009), l'autre dirigé contre SOST (Romosozumab) chez des patientes atteintes d'ostéoporose (Becker, 2014). Cependant, il n'y a pas à l'heure actuelle d'étude clinique équivalente dans le cancer du sein avec métastases osseuses.

Dans un contexte de métastases osseuses, l'activine A produite par les cellules tumorales stimule la différenciation et l'activité des ostéoclastes alors qu'elle inhibe celle des ostéoblastes (Leto, 2010). L'utilisation d'un récepteur leurre pour l'activine A constitué de la partie extracellulaire du récepteur fusionné à la partie Fc d'immunoglobuline, molécule chimérique appelée Sotatercept, non seulement bloque la formation de lésions ostéolytiques mais aussi stimule la formation osseuse dans des modèles animaux de cancer du sein (Chantry et al., 2010).

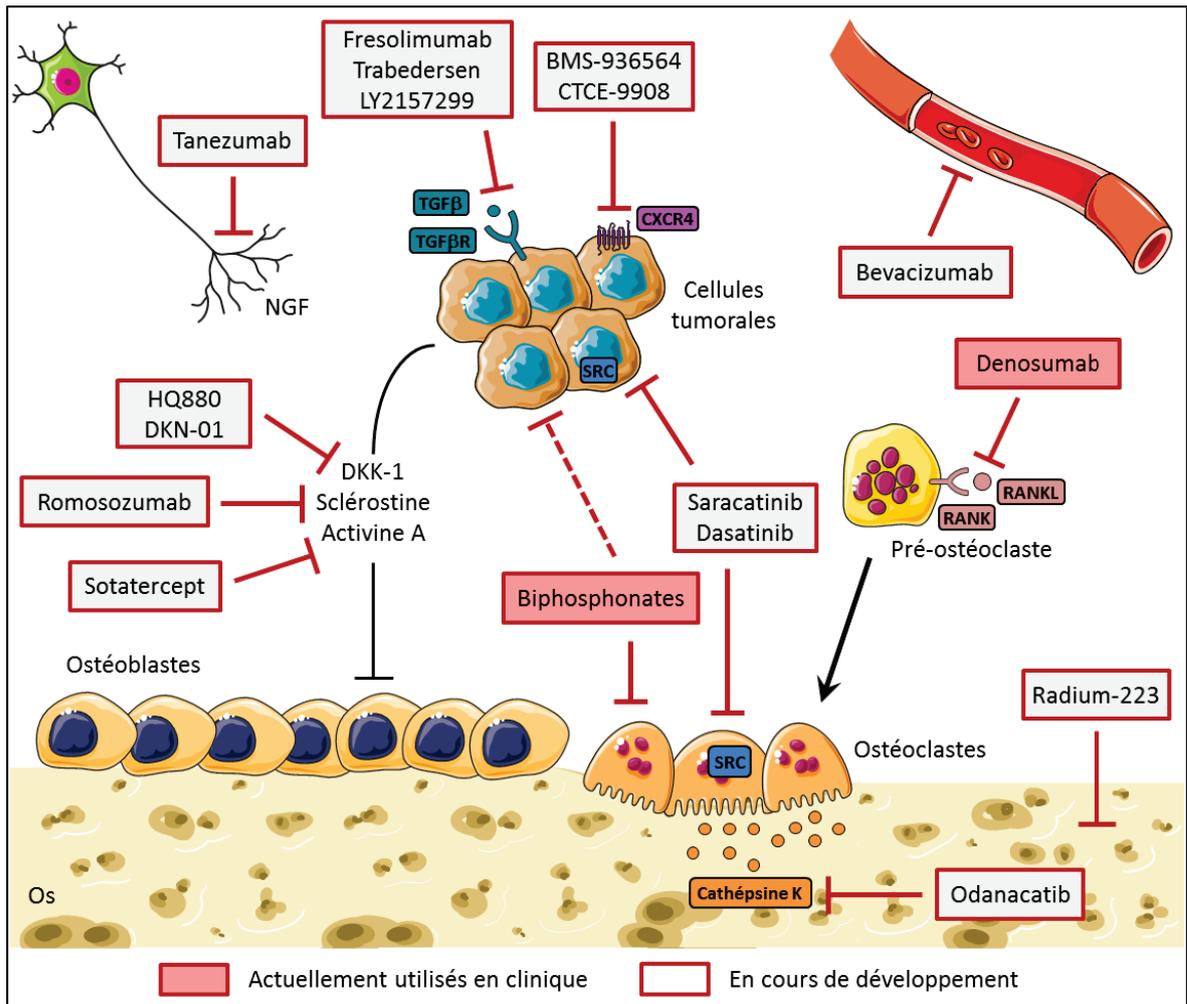


Figure 24 : Agents thérapeutiques dans le traitement des lésions ostéolytiques

Agents thérapeutiques ciblant des facteurs stimulant les cellules tumorales ou les ostéoclastes, ainsi que des facteurs inhibant l'activité des ostéoblastes.

5.3- Thérapies ciblant le microenvironnement osseux

Plusieurs thérapies sont actuellement à l'étude pour cibler les cellules tumorales mais également des composants de la matrice qui participent à la formation des métastases osseuses.

Le TGFβ est libéré dans la moelle osseuse sous forme active lors de la résorption osseuse. Il se lie alors au récepteur II (TβRII) qui conduit à la phosphorylation puis à l'activation du récepteur de type I (TβRI). L'activation de TβRI entraîne la phosphorylation des protéines cytoplasmiques SMAD2 et SMAD3 qui, après translocation nucléaire sous forme d'un complexe avec SMAD4, conduisent à l'activation de différents gènes cibles du TGFβ (Shi and Massagué, 2003). Les stratégies actuelles pour inhiber la signalisation du TGFβ comprennent un anticorps monoclonal dirigé contre le TGFβ (Fresolimumab), un inhibiteur des récepteurs au TGFβ (LY2157299) et un oligonucléotide anti-sens anti-TGFβ2 (Trabedersen) (Buijs et al., 2012). Les études pré-cliniques

dans des cas de cancers du sein ont montré une augmentation de la masse osseuse après inhibition du TGF β mais pour le moment aucun essai clinique n'est en cours pour valider ces observations.

La voie CXCL12/CXCR4 joue un rôle important dans le tropisme osseux et la localisation des cellules tumorales dans la niche endostéale (*voir section B-3.2*). Le traitement de souris avec un analogue peptidique de CXCL12, CTCE-9908 (qui agit comme un antagoniste compétitif de CXCR4) bloque la formation des métastases mais sans en diminuer la fréquence (Richert et al., 2009). L'utilisation d'un antagoniste de CXCR4, qui favorise la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques, en parallèle d'un traitement aux bisphosphonates serait susceptible d'exercer une action synergique car le zolédronate inhibe l'expression de CXCR4 par les cellules de cancer du sein (Denoyelle et al., 2003).

Les intégrines sont également des cibles thérapeutiques largement étudiées. En effet, ces récepteurs transmembranaires ont pour rôle principal d'ancrer les cellules à la matrice extracellulaire, permettant ainsi d'activer différentes voies de signalisation qui contrôlent les processus d'adhésion, de migration et de prolifération cellulaire (Desgrosellier and Cheresh, 2010). Chaque intégrine est constituée de deux sous-unités α et β qui s'associent à la membrane plasmique de façon non covalente pour former un hétérodimère. De nombreux inhibiteurs spécifiques ou non des deux sous-unités font l'objet d'essais cliniques pour le traitement des tumeurs solides (anticorps monoclonaux, antagonistes peptidiques ou non peptidiques) (Zhao et al., 2007).

Les cellules métastatiques nichées dans l'os dépendent de la présence de vaisseaux sanguins pour leur croissance. De multiples stratégies visent donc le blocage de la prolifération des vaisseaux sanguins, y compris en perturbant l'interaction du VEGF avec ses récepteurs. Cela peut être obtenu en diminuant la production de VEGF par les cellules tumorales et les cellules endothéliales du microenvironnement osseux (thalidomide), en utilisant des anticorps dirigés contre le VEGF (bevacizumab) ou contre les récepteurs au VEGF (ramucirumab, DC101) ou encore en bloquant l'activité tyrosine kinase de ces récepteurs (pazopanib, sorafenib, sunitinib) (Prager et al., 2011). Ces stratégies soulignent l'importance de cibler à la fois le compartiment tumoral et le tissu hôte pour bloquer efficacement le développement des métastases osseuses.

Le radium 223 est un isotope du radium à demi-vie courte émetteur de particules alpha. Il se comporte comme le calcium et cible sélectivement l'os, et plus spécifiquement les régions touchées par des métastases osseuses, en formant des complexes avec les cristaux d'hydroxyapatite de la matrice osseuse. Les radiations émises étant élevées, elles engendrent des cassures double-brin de l'ADN dans les cellules tumorales adjacentes, entraînant un effet cytotoxique puissant. Des effets additionnels sur les ostéoclastes ont également été observés dans un modèle murin de métastases osseuses du cancer du sein (Suominen et al., 2013). La portée des

particules alpha issues du radium-223 est inférieure à 100 micromètres ce qui minimise les dommages aux tissus sains environnants.

Par ailleurs, les cellules tumorales ainsi que les ostéoclastes peuvent engendrer des douleurs par la libération de substances algogènes comme des protons (acidose), des protéases, ou des activateurs des tyrosines kinases tels que le facteur de croissance des nerfs (NGF) (Mantyh, 2013). L'os est un organe densément innervé par des fibres sensibles qui expriment des nocicepteurs et des récepteurs au NGF nommés TrkA (Tropomyosin-related kinase A) (*voir section A-1.2.3*). La libération de ces facteurs par les cellules tumorales et les ostéoclastes peut donc induire une sensibilisation et une activation des fibres sensibles qui innervent l'os. Le traitement d'animaux porteurs de métastases osseuses avec un anticorps anti-NGF atténue les douleurs osseuses (Halvorson et al., 2005). Un essai de phase II est en cours pour évaluer l'efficacité du tanezumab (un anticorps anti-NGF) chez des patients cancéreux avec des douleurs dues aux métastases osseuses.

5.4- Thérapies ciblant les cellules dormantes

De nouvelles stratégies anti-tumorales ciblant les cellules dormantes sont actuellement développées. En effet, c'est leur réactivation dans le microenvironnement osseux qui va conduire à la formation de macrométastases. Ces cellules en dormance sont particulièrement sensibles à un inhibiteur de la respiration mitochondriale, VLX600. Une étude sur le cancer du côlon suggère que les cellules tumorales sont sensibles aux perturbations de la fonction mitochondriale, ce qui aboutit à une catastrophe bioénergétique pour les cellules dormantes et à leur mort (Zhang et al., 2014).

D'autre part, le traitement combiné de souris porteuses d'un carcinome mammaire avec des inhibiteurs de SRC (AZD0530) et de MEK1/2 (AZD6244) conduit à l'apoptose d'une grande partie des cellules dormantes et retarde l'apparition des métastases. Le ciblage de SRC inhibe la prolifération des cellules dormantes et l'inhibition de la voie MEK1/2 est nécessaire pour induire l'apoptose (El Touny et al., 2014).

Cible et agents	Essai clinique	Mécanisme d'action des agents
Minéral osseux Bisphosphonates : - Etidronate - Alendronate - Zolédronate	en clinique	Inhibent l'activité des ostéoclastes en induisant leur apoptose - BP 1 ^{ère} génération : interfèrent avec le potentiel membranaire des mitochondries entraînant leur dysfonctionnement - BP 2 ^{ème} et 3 ^{ème} générations : inhibent la voie du mévalonate en inhibant la farnesyl pyro-phosphatase
RANKL Dénosumab	en clinique	Anticorps dirigé contre RANKL qui bloque la liaison RANKL/RANK inhibant ainsi la formation, la maturation et l'activité des ostéoclastes
Activine A Sotatercept	NCT02230917 essai clinique de phase IIa <i>myélome multiple</i>	Stimule la formation osseuse et bloque la résorption osseuse
Minéral osseux Radium-223	essai clinique de phase IIa <i>cancer du sein</i>	Se lie à la matrice osseuse et émet des radiations consuisant à la mort des cellules
Cathépsine K Odanacatib	NCT00399802 essai clinique de phase II <i>cancer du sein</i>	Inhibe la dégradation du collagène de type I et donc diminue la destruction osseuse réalisée par les ostéoclastes
SRC Saracatinib Dasatinib	NCT00558272 NCT00566618 essais cliniques de phase II <i>cancer du sein</i>	Affectent l'intégrité morphologique des ostéoclastes et inhibent la prolifération, la mobilité et l'invasion des cellules tumorales
NGF Tanezumab	NCT00830180 essai clinique de phase II <i>cancer du sein</i>	Bloque le récepteur au NGF ce qui diminue l'intensité de la douleur
CXCR4 BMS-936564 CTCE-9908	NCT01359657 essai clinique de phase Ib <i>myélome multiple</i>	Bloquent l'axe de signalisation CXCL12/ CXCR4 ce qui inhibe la migration et l'invasion des cellules tumorales
DKK-1 BHQ880 DKN-01	NCT00741377 essai clinique de phase Ib <i>myélome multiple</i>	Inhibent la liaison DKK-1/LRP 5/6 ce qui favorise la formation osseuse
Intégrine $\alpha 5\beta 1$ Volociximab	NCT00915278 essai clinique de phase I <i>cancer du sein</i>	Bloque l'adhésion des cellules tumorales à la matrice osseuse et inhibe l'angiogénèse
VEGF Bevacizumab	NCT00949247 essai clinique de phase 0 <i>cancer du sein</i>	Bloque la production de VEGF par les cellules tumorales et les cellules endothéliales
TGFβ Fresolimumab Trabedersen LY2157299	//	Bloquent le cercle vicieux en inhibant l'activité des ostéoclastes ainsi que la migration et l'invasion des cellules tumorales et stimulant l'activité des ostéoblastes
SOST Romosozumab	//	Inhibe la liaison sclérostine/LRP5 ce qui favorise la formation osseuse

Tableau 8 : Agents thérapeutiques émergents pour le traitement des lésions ostéolytiques.

C- Les récepteurs de guidage axonal roundabout dans le développement tumoral

Pendant le développement embryonnaire, les neurones du système nerveux central (SNC) établissent des milliards de connexions en émettant de longs prolongements, les axones, qui vont croître rapidement dans le cerveau (Figure 25). Cette croissance n'est pas aléatoire, mais précisément orientée, guidée par des molécules situées dans l'environnement cellulaire que traverse l'axone. Chez la plupart des espèces animales, les moitiés droite et gauche du système nerveux sont presque parfaitement symétriques, organisées en miroir de part et d'autre d'un axe longitudinal appelé ligne médiane. Une des premières décisions que doit prendre un axone en croissance est de traverser ou de ne pas traverser la ligne médiane. Qui plus est, un axone qui traverse la ligne médiane (on parle aussi d'axone commissural) ne sera capable de le faire qu'une seule fois.

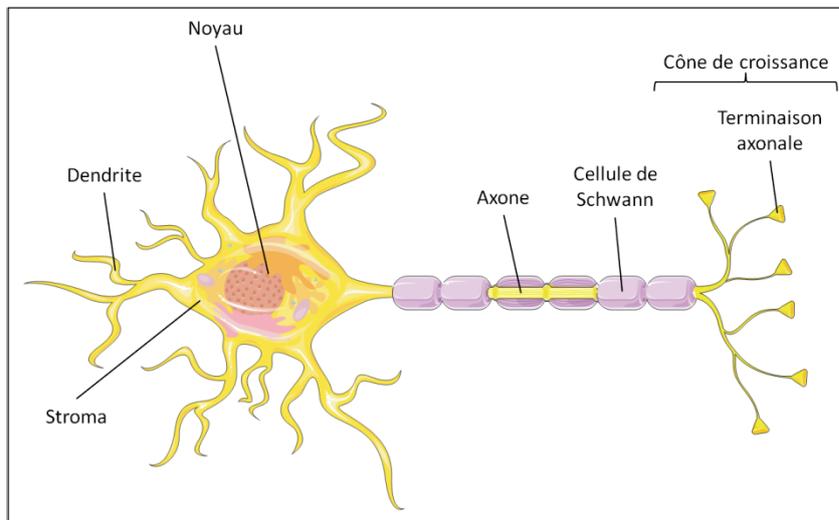


Figure 25 : Structure typique d'un neurone

Chaque neurone est composé d'un corps cellulaire comportant le noyau, de très nombreuses ramifications de type dendritiques (d'où proviennent les informations) et d'un axone (par où sont diffusées les informations) dont la longueur peut atteindre 1 mètre pour seulement 1 à 15 micromètres de diamètre. Il est entouré par des cellules de Schwann qui confèrent une gaine de myéline protectrice tout le long de l'axone.

Des approches génétiques, moléculaires et biochimiques ont permis d'identifier quatre familles de molécules participant aux signaux de guidage axonal contrôlant le comportement des axones vis-à-vis de la ligne médiane : les nétrines, les slits, les éphrines et les sémaphorines.

Les nétrines et les slits sont des molécules sécrétées de même qu'une partie des sémaphorines alors que l'autre partie des sémaphorines ainsi que les éphrines sont présentes à la surface cellulaire. Les nétrines peuvent agir comme des chimioattractants ou des chimiorepellants, tandis que les autres membres sont principalement des molécules répulsives. Pour chacune de ces

molécules, un ou plusieurs récepteurs transmembranaires ont été identifiés. Ainsi les nétrines se fixent sur les récepteurs UNC et DCC (Deleted in Colorectal Cancer), les SLIT sur les récepteurs roundabout (ROBO), les éphrines sur les récepteurs EPH et enfin les sémaphorines sur les neuropilines et les plexines. Ces axes de guidage sont très conservés et sont très bien décrits dans le développement cérébral (Figure 26).

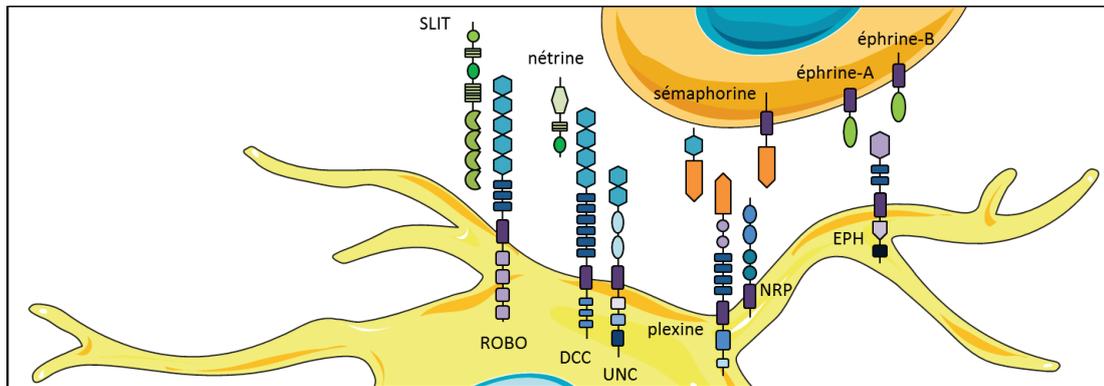


Figure 26 : Diversité des récepteurs de guidage axonal

Modifié d'après (Pasterkamp and Kolodkin, 2013).

Dans le contexte neuronal la voie SLIT/ROBO a un rôle très important : la sécrétion de SLIT au niveau des cellules de la ligne médiane empêche les neurones commissuraux de refranchir la ligne médiane. Chez les mutants embryonnaires *ROBO1*, les axones traversent et retraversent plusieurs fois la ligne médiane (Seeger et al., 1993). Cependant de nombreuses fonctions ont maintenant été décrites dans divers systèmes (angiogenèse, cancer, ...).

1- Les récepteurs ROBO et leurs ligands SLIT

1.1- Structure

Les SLIT sont des protéines sécrétées qui ont été décrites pour la première fois chez la drosophile. Chez les invertébrés une seule protéine SLIT existe alors que chez les vertébrés on trouve trois molécules : SLIT1, SLIT2 et SLIT3. Ce sont des glycoprotéines d'environ 200 kDa très conservées dans leur structure et dans leur fonction. Elles sont constituées d'un peptide signal en N-terminal, de quatre domaines riches en leucine (LRR) nommés D1 à D4 suivis de sept à neuf domaines EGF-like, d'un domaine laminine G et d'une cystéine en C-terminal (Figure 27). Les études structurales des protéines SLIT ont révélé que les domaines LRR contenaient chacun un motif qui confère une forme concave nécessaire à l'interaction SLIT/ROBO.

Comme leurs ligands SLIT, les récepteurs ROBO ont tout d'abord été découverts chez *Drosophila melanogaster*. Chez la plupart des vertébrés, trois récepteurs ROBO présents principalement dans le cerveau ont été identifiés. Mais chez le poisson zèbre et les mammifères,

un quatrième récepteur, ROBO4, présent en quantité importante dans les cellules endothéliales et assurant des fonctions dans l'angiogenèse, a été décrit. Les récepteurs ROBO sont des molécules d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines qui peuvent interagir de manière homophile et hétérophile (Hivert et al., 2002). ROBO1 à 3 possèdent une structure extracellulaire similaire avec cinq domaines immunoglobulines-like (Ig) et trois domaines fibronectine de type 3 (FN3). La partie intracellulaire de ces récepteurs comprend quatre motifs cytoplasmiques conservés (CC0, CC1, CC2 et CC3). Pour ROBO3 il manque cependant le domaine CC1 (Figure 27).

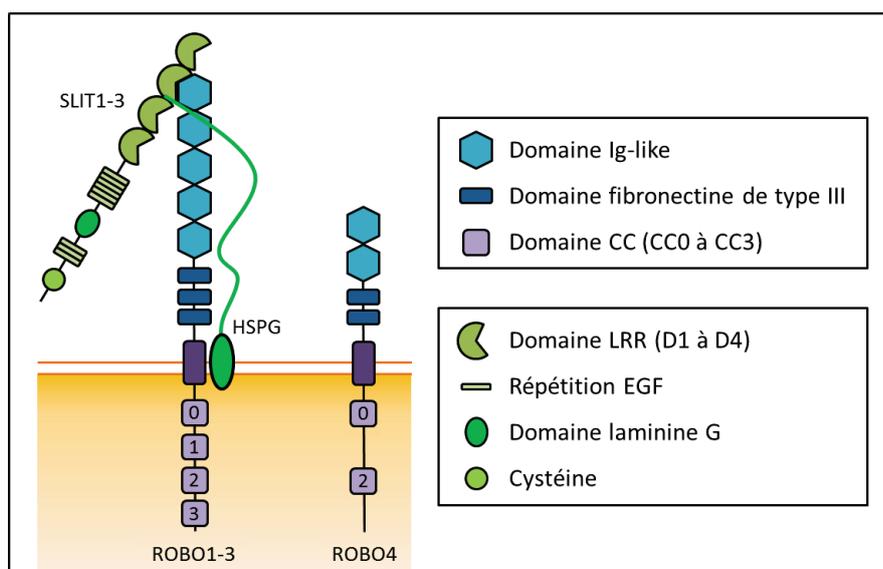


Figure 27 : Structure des protéines SLIT et ROBO

Le récepteur ROBO4, également nommé « Magic Roudabout », a été découvert plus tardivement et diverge des autres récepteurs tant au niveau structural que fonctionnel (Huminiacki et al., 2002). Il présente moins d'identité avec les autres récepteurs ROBO : seulement deux domaines Ig sont décrits, deux domaines FN3 et uniquement les motifs CC0 et CC2 (Figure 27). L'originalité structurale du récepteur ROBO4 comparé à ses pairs fait naître des doutes quant à son interaction avec le ligand SLIT, qui n'a d'ailleurs jamais été clairement démontrée. Récemment, une interaction du récepteur ROBO4 avec un autre récepteur de guidage axonal, UNC5B, a été mise en évidence, révélant la complexité des mécanismes liés à ce récepteur (Koch et al., 2011).

Bien que les structures des différents récepteurs soient similaires les phénotypes observés suite à l'inactivation de chacun des gènes *Robo1*, *Robo2* ou *Robo3* ne sont pas identiques : les erreurs de traversées se produisent chez les mutants *Robo2* et *Robo3* à une fréquence plus faible que chez les mutants *Robo1* (Spitzweck et al., 2010). De plus, ROBO3 apparaît également comme un membre particulier dans la famille ROBO avec des effets antagonistes de ROBO1 et ROBO2 (Sabatier et al., 2004). Une dimension spatiale et temporelle est à prendre en compte dans le

contexte du développement du système nerveux central avec une combinaison des récepteurs suivant un « code ROBO » (Rajagopalan et al., 2000)(Simpson et al., 2000).

1.2- Liaison SLIT/ROBO

1.2.1- Structure cristallographique

L'interaction SLIT/ROBO analysée par cristallographie a révélé que les domaines D2 de SLIT et Ig1 de ROBO étaient essentiels pour la liaison ligand/récepteur (Morlot et al., 2007). Le résultat de cette interaction est une réorganisation du cytosquelette dans les cellules cibles. La liaison de SLIT à ROBO est impliquée dans un grand nombre de fonctions cellulaires, dont la dynamique du cytosquelette et le cycle cellulaire.

La liaison de SLIT a été clairement démontrée biochimiquement pour tous les membres roundabout excepté ROBO4 pour lequel l'existence d'une liaison SLIT2/ROBO4 est discutée. Cette liaison est caractérisée par une constance de dissociation K_D (concentration du ligand pour laquelle la moitié des récepteurs sont occupés) de haute affinité ($K_D \approx 4-5$ nM) (Brose et al., 1999). Il s'agit d'un processus conservé puisque les liaisons SLIT2 humain/ROBO1 drosophile et SLIT2 drosophile/ROBO1 rat ont été observées (Brose et al., 1999). Les ligands SLIT interagissent par leur domaine D2 avec le domaine Ig1 des récepteurs ROBO, correspondant à une région minimale de 54 acides aminés (Liu et al., 2004)(Morlot et al., 2007). Le domaine Ig2 est également impliqué dans cette interaction en stabilisant cette liaison (Fukuhara et al., 2008).

1.2.2- Ménage à 3 ?

La majorité (> 90%) des molécules SLIT2 sont associées à la surface des cellules mais peuvent être facilement extraites soit à l'aide d'une forte concentration en sels (NaCl 1M) ou d'héparine ce qui suggère une association des protéines SLIT avec des molécules membranaires telles que les protéoglycanes à héparane-sulfate (HSPG) (Brose et al., 1999). Les syndécans et les glypicans qui sont des HSPG membranaires possèdent un double rôle : en tant que régulateurs de l'adhésion cellulaire en se liant à d'autres composants de la matrice extracellulaire et comme molécules de signalisation en agissant comme co-récepteurs.

Plusieurs éléments suggèrent que les HSPG sont impliqués dans la voie SLIT/ROBO : (i) SLIT se lie à l'héparine par chromatographie d'affinité (Wang et al., 1999), (ii) la fonction de SLIT2 est totalement supprimée par un traitement à l'héparinase III (Hu, 2001), (iii) la liaison de ROBO1 au syndécan a été déterminée par résonance des plasmons de surface (Zhang et al., 2013). A présent, la question, encore débattue, est de savoir si le syndécan agit comme un co-récepteur ou comme un simple ligand. Une étude a montré que SLIT et son récepteur ROBO se lient spécifiquement au

syndécan suggérant une fonction de co-récepteur pour celui-ci afin de stabiliser l'interaction SLIT/ROBO (Johnson et al., 2004). Toutefois, une autre étude a révélé que le domaine extracellulaire du syndécan était nécessaire et suffisant pour promouvoir la signalisation via SLIT (Chanana et al., 2009). De la même manière, une troisième étude a montré que le domaine cytoplasmique du syndécan n'était pas essentiel pour la transduction du signal (Schulz et al., 2011). Un autre niveau de complexité peut également s'ajouter à ce modèle : la structure des sucres spécifiques des héparanes-sulfates modulerait la réponse de la cellule cible suite à l'interaction SLIT/ROBO/HS (Conway et al., 2011).

1.2.3- Dimérisation

Les molécules d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines (IgCAM) peuvent former des associations homomériques ou hétéromériques avec d'autres protéines et interagir en *cis* ou en *trans* avec des récepteurs membranaires. Et les récepteurs ROBO ne font pas exception dans la famille. De manière surprenante, le fragment Ig1-Ig5 de ROBO1 est presque exclusivement sous sa forme monomérique en solution alors que pour ROBO2 c'est sous sa forme dimérique qu'on le retrouve le plus souvent par chromatographie d'exclusion stérique (Evans and Bashaw, 2010). *In vitro*, des molécules solubles de ROBO4 s'assemblent en multimères et ce même en l'absence de ligand (Yoshikawa et al., 2008).

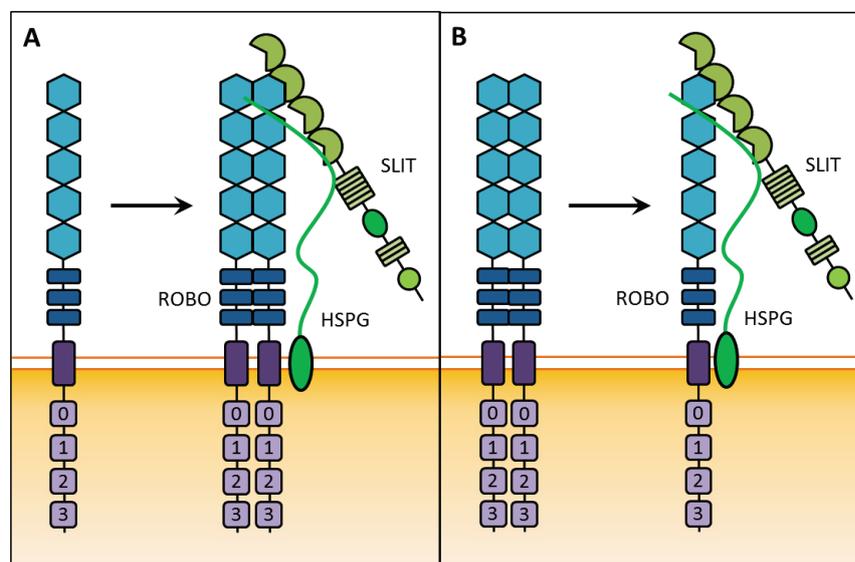


Figure 28 : Mécanismes possibles de signalisation SLIT/ROBO

Modifié d'après (Hohenester, 2008).

Les HSPG pourraient également intervenir dans cette dimérisation : deux mécanismes de signalisation sont envisagés pour la voie SLIT/ROBO. Dans le premier modèle la liaison de SLIT convertirait un monomère inactif de ROBO en dimère actif (Figure 28A). Dans ce scénario HSPG serait requis pour la formation d'un complexe SLIT/ROBO 2:2 (Hohenester, 2008). Dans le

modèle alternatif, la liaison de SLIT convertirait un dimère inactif de ROBO en monomère actif (Figure 28B). Ici, le rôle de HSPG serait de stabiliser le complexe SLIT/ROBO 1:1 (Hussain et al., 2006). Dans les deux cas la signalisation résulterait d'une modification du statut oligomérique de ROBO. Une étude récente vient même de proposer que la forme prédominante de ces récepteurs serait sous forme de dimère fonctionnel où la liaison avec SLIT2 ne perturberait pas la dimérisation (Zakrys et al., 2014).

Il existe également une interaction entre ROBO1 et DCC, médiée par les domaines intracytoplasmiques des deux protéines. Cette relation est asymétrique : l'activation de ROBO1 par SLIT2 entraîne sa liaison à DCC, mais l'activation de DCC n'entraîne pas sa liaison à ROBO1 (Stein and Tessier-Lavigne, 2001). Dans le contexte de récepteurs entiers l'association des domaines cytoplasmiques est réprimée, toutefois la fixation de SLIT2 sur ROBO1 lève cette répression probablement par modification conformationnelle du domaine cytoplasmique de ROBO1. Les régions requises spécifiquement pour l'interaction ROBO1/DCC sont le motif CC1 de ROBO1 et le domaine P3 de DCC. La fixation de la nétrine à DCC permet un signal d'attraction, celle de SLIT2 à ROBO1 un signal de répulsion et l'interaction ROBO1/DCC l'absence de signal (Figure 29). Récemment un co-récepteur pour ROBO1, FLRT3 (Fibronectin Leucin-Rich Transmembrane protein 3), a été impliqué dans la liaison ROBO1/DCC (Leyva-Díaz et al., 2014).

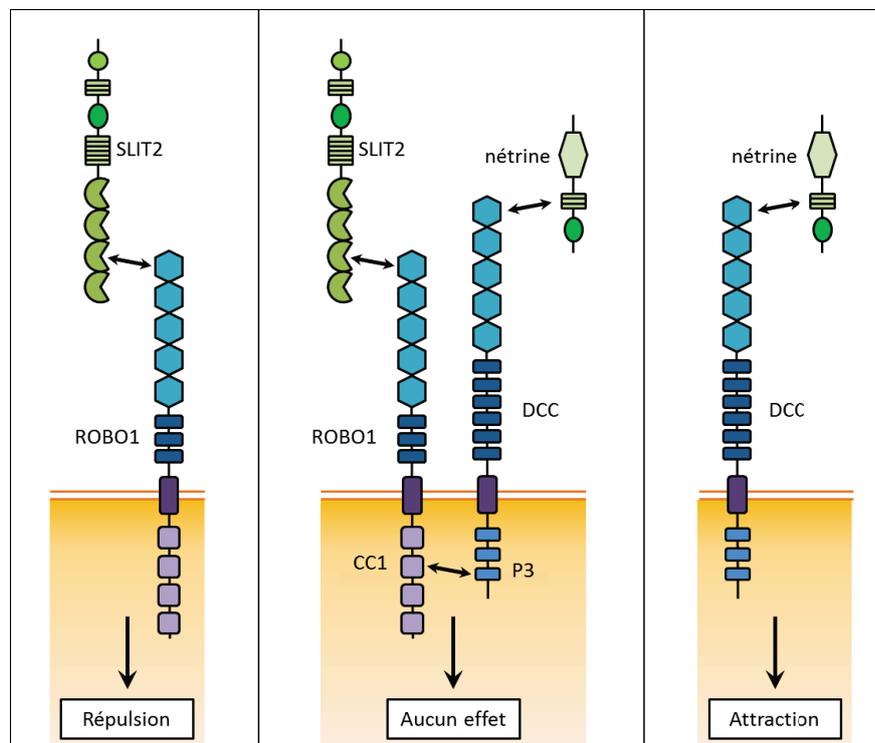


Figure 29 : Interaction ROBO/DCC

Dans les neurones, l'activation de ROBO1 par SLIT2 conduit à un signal répulsif alors que l'activation de DCC par la nétrine aboutit à un signal attractif. Par contre l'activation de ROBO1 par SLIT2 entraîne l'inactivation de la réponse attractive de la voie nétrine/DCC, par une interaction des domaines cytoplasmiques CC1 de ROBO1 et P3 de DCC. Modifié d'après (Stein and Tessier-Lavigne, 2001).

1.2.4- Quel ligand pour ROBO4 ?

Les protéines SLIT ne sont pas les seuls ligands de ROBO. Par exemple, la fixation de LRT, une protéine riche en répétitions leucine et spécifique du tendon favorise la migration vers le muscle par son interaction avec ROBO1 (Wayburn and Volk, 2009). Le domaine riche en leucine de LRT est similaire au domaine D2 de SLIT ce qui souligne l'importance de cette région dans l'interaction avec ROBO.

La structure des deux domaines Ig en N-terminal de ROBO1 est décrite : les résidus clés pour la liaison avec SLIT et l'héparane-sulfate ont été identifiés (Morlot et al., 2007)(Fukuhara et al., 2008). Bien que les domaines Ig de ROBO1 et ROBO4 soient identiques à 42% aucun des résidus identifiés pour la liaison de ROBO1 avec SLIT ou l'héparane-sulfate ne sont conservés chez ROBO4, ils sont remplacés par des résidus incompatibles pour cette liaison. En accord avec l'analyse structurale, des expériences de chromatographie d'affinité avec de l'héparine ont confirmé que ROBO4 ne se liait pas à l'héparine (Hussain et al., 2006). Par contre, la réponse à SLIT2 est perdue dans les cellules endothéliales déplétées pour ROBO4 (Jones et al., 2008) et un traitement par SLIT2 inhibe la voie du VEGF via ROBO4 et empêche une angiogenèse excessive (Park et al., 2003)(Marlow et al., 2010), indiquant que SLIT2 agit de manière dépendante de ROBO4 dans les cellules endothéliales. La co-immunoprécipitation SLIT2/ROBO4 est observée dans des cellules HEK-293 dans des conditions non-dénaturantes (NP-40 0,5%) (Park et al., 2003) alors que dans des conditions plus drastiques (Triton X-100 1% ; acide désoxycholique 0,5%) dans des cellules COS-7 cette interaction disparaît (Suchting et al., 2005). L'absence d'interaction forte entre SLIT2 et ROBO4 a également été mesurée par résonance des plasmons de surface (Biacore). ROBO4 peut être co-immunoprécipité avec ROBO1 dans des cultures de cellules endothéliales (Sheldon et al., 2009) ce qui suggère que l'hétérodimérisation ROBO1/ROBO4 pourrait permettre la réponse à SLIT observée dans différents travaux sur l'angiogenèse. Des travaux complémentaires seraient néanmoins nécessaires pour mieux comprendre les rôles de ROBO1 et des syndécans dans l'activation de la voie de signalisation induite par ROBO4. Par ailleurs, ROBO4 n'est pas le seul membre de la famille dont la liaison avec SLIT est débattue : c'est également le cas pour l'isoforme A de ROBO3 alors que l'isoforme B est capable de fixer SLIT (Camurri et al., 2005).

Une autre interaction est à noter : celle de ROBO4 avec un autre récepteur de guidage axonal, UNC5B. Le premier des deux domaines Ig de ROBO4 est suffisant pour se lier à UNC5B ($K_D \approx 12$ nM) (Koch et al., 2011). Ainsi UNC5B pourrait être le partenaire majeur de ROBO4 *in vivo*. Cependant, seulement une activation de la voie UNC5B a été observée lorsque ROBO4 interagit avec celui-ci. La stimulation de cellules endothéliales exprimant ROBO4 par UNC5B ne montre aucun signe d'une activation des voies de signalisation en aval de ROBO4. Néanmoins, des travaux complémentaires sont nécessaires pour trancher la question.

1.3- Régulation

1.3.1- Régulations épigénétiques par méthylation des promoteurs

La méthylation de l'ADN est un procédé enzymatique qui se produit souvent à proximité des îlots CpG (régions du génome riche en cytosine et guanine) au niveau des régions promotrices des gènes. L'hyperméthylation des promoteurs conduit à une diminution de l'expression des gènes. Ce phénomène est souvent observé pour des gènes dits « suppresseurs de tumeurs » dont l'inactivation diminue leur capacité à réduire l'apparition de tumeurs. Dans le contexte tumoral, l'hyperméthylation des promoteurs des gènes *SLIT* est fréquemment observée. Son expression est d'ailleurs restaurée dans des lignées tumorales fortement méthylées après traitement au 5-aza-2'-déoxycytidine tandis qu'aucun changement d'expression n'est constaté dans les lignées non méthylées (Dallol et al., 2002a)(Dickinson et al., 2004). Le promoteur du gène *ROBO1* est également décrit dans certains cancers comme hyperméthylé (Dallol et al., 2002b). Il faut toutefois noter que les niveaux de méthylation sont beaucoup moins élevés pour *ROBO1* (< 20% des cas) que pour les gènes *SLIT* (entre 30 et 80% des cas de cancers). Cette méthylation étant réversible, la réactivation de ces voies par des agents de déméthylation offre donc une potentielle cible thérapeutique dans le traitement de ces cancers.

1.3.2- Régulations transcriptionnelles de *ROBO4*

Seule la région promotrice de *ROBO4* (3 kb) a été clonée et bien caractérisée : deux séquences palindromiques de 12 pb (en position -2258 et -2941), deux séquences consensus SP1 (en position -42 et -153) et un site consensus ETS (-119) ont été mis en évidence. Par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), l'interaction du facteur de transcription SP1 sur les deux motifs SP1 et de la protéine de liaison GA (GABP) sur le site ETS (E26 Transformation-Specific) ont été confirmées (Figure 30). De plus, l'utilisation d'un ARN interférent dirigé contre SP1 et GABP conduit à une diminution de 50% du taux endogène d'ARNm de *ROBO4*. La région promotrice de *ROBO4* a également été clonée en amont du gène *LacZ* afin d'identifier les tissus où ce gène s'exprimait. L'activité du gène rapporteur a été observée principalement dans le système vasculaire (en particulier les micro-vaisseaux mais peu dans les larges artères et veines) et était co-localisée avec le marquage CD31 spécifique des cellules endothéliales confirmant l'hypothèse que la région promotrice de *ROBO4* contient des informations essentielles à son expression spécifique dans les tissus endothéliaux (Okada et al., 2007)(Okada et al., 2008).

Une étude transcriptomique comparative entre des cellules endothéliales de souris sauvages ou mutées sur *Sox18* a révélé une diminution importante du niveau d'ARN *Robo4* (et pas de *Robo1* et *Robo2*) dans les cellules mutées (Samant et al., 2011). Et en effet chez le poisson zèbre, deux facteurs de transcription SOX (Sry-related high mobility box) appelés SOX7 et SOX18, sont

particulièrement impliqués dans le développement vasculaire de l'embryon. Et par analyse confocale, une co-localisation de ces deux facteurs et de ROBO4 a été observée. De plus, des expériences de gain (injection du transcrit) ou de perte (utilisation de morpholinos) de fonction ont confirmé la régulation de la transcription de *robo4* par SOX7 et SOX18. Par contre, la mutation des sites de liaison SOX sur le promoteur *robo4* ne résulte pas en une perte complète de l'activité du promoteur dans les cellules endothéliales, ce qui confirme l'implication d'autres facteurs, en plus des protéines SOX, dans cette régulation.

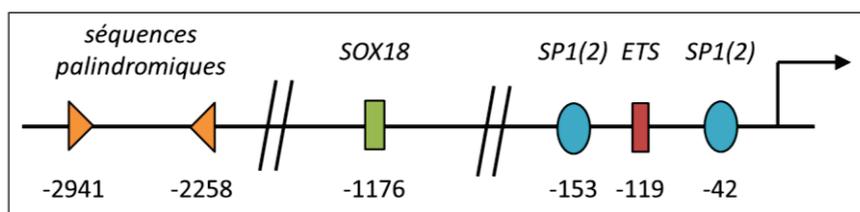


Figure 30 : Séquence promotrice du gène *ROBO4*

1.3.3- Variants

Chez la souris et chez l'homme, il existe deux isoformes différentes de ROBO1 qui présentent des profils d'expression différents : ROBO1b est largement présent durant le développement et dans les tissus adultes alors que ROBO1a est produit strictement dans le cerveau des embryons, les yeux et les tissus rénaux (Clark et al., 2002). La présence de ces deux isoformes est due à l'utilisation d'un promoteur alternatif (appelé *DUTT1*) (Nural et al., 2007). Comme pour *ROBO1*, les transcrits *ROBO2* diffèrent dans leur région 5'. Le codon start de l'isoforme a est localisé dans l'exon 2 alors qu'il se trouve dans l'exon 1 de l'isoforme b. Les exons 1 et 2 de *ROBO2* se situent au niveau d'une région d'ADN particulièrement instable qui est souvent associée à des réarrangements chromosomiques et à la perte d'hétérozygotie dans certains cancers (Yue et al., 2006). L'identification de quatre isoformes pour ROBO3 avec des propriétés biochimiques et de signalisation uniques ajoute à la complexité du puzzle. Un épissage alternatif dans la région 5' du transcrit primaire conduit à la production de ROBO3A et ROBO3B, qui diffèrent au niveau de leurs extrémités N-terminales, tandis que l'épissage alternatif dans la région 3' génère ROBO3.1 et ROBO3.2 dont les réponses à SLIT2 sont opposées (Camurri et al., 2005)(Chen et al., 2008).

1.3.4- Clivages

1.3.4.1- SLIT

SLIT2, et probablement SLIT1 et SLIT3, sont clivés en un fragment N-terminal (SLIT-N de 140 kDa) et un fragment C-terminal (SLIT-C de 55-60 kDa) à la fois *in vitro* et *in vivo* par un processus protéolytique peu décrit. Jusqu'à présent la quasi-totalité des diverses activités de

signalisation était attribuée à SLIT-N bien que certaines études ont également indiqué un rôle particulier de la forme entière de SLIT dû à une diffusion différente (Chen et al., 2001). Le site de clivage (motif TSPCDNFD) se situe au début de la sixième répétition EGF (Brose et al., 1999). La protéase responsable de ce clivage n'a toujours pas été découverte mais plusieurs candidats potentiels sont proposés : des métalloprotéases (exemple de notch) ou des furines (cas des sémaphorines). Il serait également intéressant de déterminer si cette protéase agit dans la cellule ou une fois SLIT sécrétée.

Le fragment SLIT-C, qui n'est pas capable de se lier aux récepteurs ROBO, a longtemps été considéré comme biologiquement inactif. Mais récemment, il a été démontré que le fragment SLIT-C possède en réalité une activité biologique : il exerce une fonction répulsive sur les axones commissuraux, médiée, non pas par un récepteur ROBO, mais par un autre récepteur de guidage axonal la plexine A1 (Delloye-Bourgeois et al., 2015). Outre la description d'un mécanisme inédit du guidage axonal, la découverte d'un nouveau couple ligand-récepteur et d'une fonction à part entière du fragment C-terminal des SLIT permet d'envisager des contributions nouvelles dans divers contextes physiologiques et pathologiques, notamment dans les processus tumoraux et immunitaires, où les slits et les plexines jouent des rôles majeurs.

1.3.4.2- ROBO

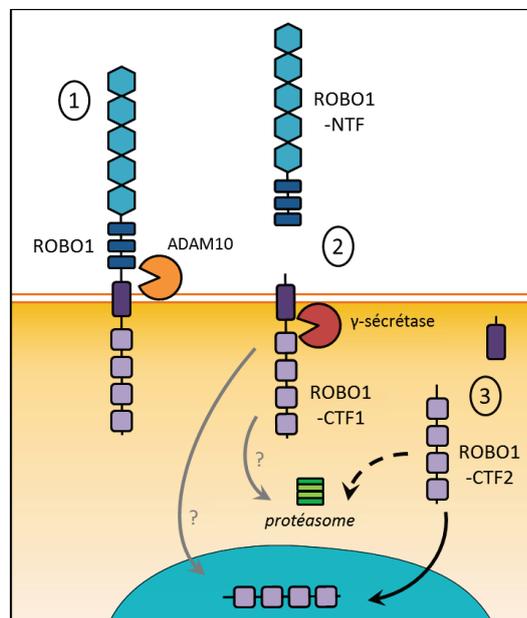


Figure 31 : Clivage de ROBO1

Premièrement, ROBO1 est clivé par la métalloprotéase ADAM10 dans le milieu extra-cellulaire ce qui conduit à la production des fragments ROBO1-NTF et ROBO1-CTF1. Des inhibiteurs de métalloprotéases tels que GM6001 et TAPI-1 bloquent cette protéolyse. Deuxièmement, le fragment ROBO1-CTF1 toujours lié à la membrane subit un second clivage par une γ -sécrétase ce qui produit ROBO1-CTF2. ROBO1-CTF2 est libéré de la membrane et est soit dégradé par le protéasome soit transloqué dans le noyau. Cette protéolyse secondaire peut être inhibée par un inhibiteur de γ -sécrétase L-685458. Modifié d'après (Seki et al., 2010).

ROBO1 est successivement clivé par une métalloprotéase nommée ADAM10 (ou Kuz chez la drosophile) puis une γ -sécrétase. Cette conclusion est le résultat de plusieurs observations. Tout d'abord, on peut observer deux fragments C-terminaux de ROBO1 (appelés CTF1 et CTF2) lorsque l'on traite des cellules de cancer du foie avec un inhibiteur du protéasome suggérant qu'il existe au moins deux étapes de clivage. De plus, cette production de CTF1 et CTF2 est inhibée lors de l'emploi d'un inhibiteur de métalloprotéase. Par contre elle est modifiée, accumulation de CTF1 mais pas de CTF2, avec un inhibiteur de l'activité des γ -sécrétases montrant que ADAM10 est nécessaire à la production des fragments C-terminaux et que la γ -sécrétase clive ROBO-CTF1 pour produire ROBO1-CTF2 (Figure 31) (Seki et al., 2010).

Par ailleurs, une forme non-clivable de ROBO1 (ROBO-U) a été créée afin de vérifier l'importance de ce processus pour la fonction répulsive du récepteur. L'expression *de novo* de la forme non clivable chez des mutants *Robo1*^{-/-} ne restaure pas le phénotype sauvage. Ce clivage par la protéase ADAM10/Kuz est même nécessaire pour le recrutement de la protéine SOS et d'autres facteurs requis pour induire les signaux de répulsion transmis par la voie de signalisation SLIT/ROBO à la ligne médiane (Coleman et al., 2010).

1.3.5- Répression par miR-218

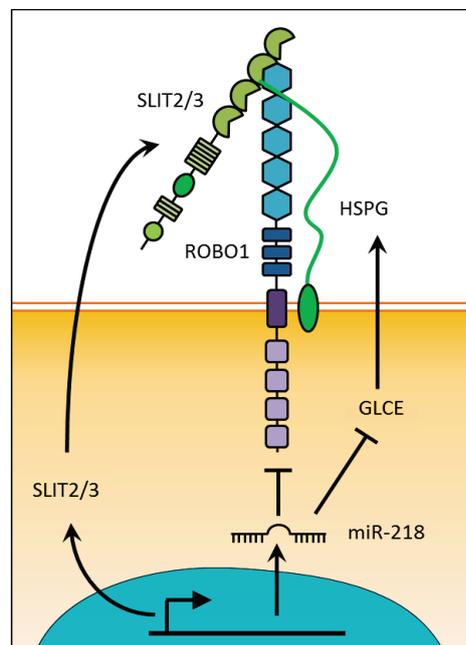


Figure 32 : Boucle de régulation SLIT/ROBO/miR-218

Les gènes *SLIT2* et *SLIT3* codent à la fois pour un ARNm *SLIT2* ou *3* et un microARN-218. Les protéines SLIT sécrétées interagissent avec leurs récepteurs ROBO. Le miR-218 inhibe la synthèse des récepteurs ROBO1 et 2 et de la protéine GLCE responsable de la biosynthèse du HSPG. L'interaction SLIT/ROBO est alors réprimée. Modifié d'après (Small et al., 2010)

Les microRNAs (miRNA) sont de petits ARN non codants qui entraînent la dégradation d'ARNm ou inhibent leur traduction en se liant généralement sur la région 3'UTR (3' UnTranslated Region) de l'ARNm cible, résultant en une fine régulation de l'expression des gènes. Pour la voie SLIT/ROBO un miRNA paraît particulièrement pertinent : miR-218. MiR-218-1 se trouve dans l'intron 15 du gène *SLIT2* et miR-218-2 dans l'intron 14 de *SLIT3*. Ce miRNA est particulièrement bien conservé durant l'évolution puisque le miR mature présente 100% d'identité entre l'homme, la souris, le poisson zèbre et le xénope. Les cibles de miR-218 sont ROBO1 et ROBO2 ainsi que des composants de la voie SLIT-ROBO comme srGAP2 et les molécules de biosynthèse des héparanes-sulfates. L'utilisation d'un mimique de miR-218 diminue le taux de GLCE (Heparan-Sulfate-Modifying Enzyme Glucuronyl C5-epimerase) alors qu'un inhibiteur de miR-218 fait augmenter le taux de ROBO1, ROBO2 et GLCE et réduire la densité et l'épaisseur des vaisseaux (Small et al., 2010). Le fait que la séquence codante de ce miR soit dans le gène *SLIT* et cible ROBO met en évidence une boucle de régulation (Figure 32) (Fish et al., 2011).

Cette régulation est d'ailleurs perturbée dans de nombreux cancers tels que le cancer du nasopharynx (Alajez et al., 2011), le cancer du sein (Yang et al., 2012), le cancer gastrique (Tie et al., 2010) et le cancer colorectal (Yu et al., 2013) où le taux de miR-218 a été trouvé anormalement bas. La raison de la diminution du niveau de miR-218 serait une hyperméthylation des promoteurs de *SLIT2/SLIT3* dans ces cancers. Un traitement au 5-aza-2'-déoxycytidine entraîne d'une part la ré-expression des transcrits *SLIT2* et *SLIT3* mais aussi une augmentation du niveau de miR-218 (Alajez et al., 2011).

1.3.6- Commissureless (COMM)

Le système nerveux est symétrique et composé de deux types de neurones : les neurones ipsilatéraux (soma et cible synaptique du même côté) et les neurones contralatéraux (axones traversant la ligne médiane pour atteindre une cible synaptique de l'autre côté). Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'attraction à la répulsion un criblé à large échelle a été réalisé chez la drosophile. Cette étude a permis d'identifier la protéine commissureless (COMM) comme interacteur du récepteur ROBO. En l'absence de COMM tous les neurones sont ipsilatéraux tandis que la surexpression de COMM est suffisante pour transformer un neurone ipsilatéral en contralatéral (Figure 33).

Actuellement, COMM est défini comme un récepteur endosomal "sortant" pour ROBO (endosomal sorting receptor for ROBO) (Keleman et al., 2005). Lorsque COMM est absent, ROBO est présent à la surface des cônes en croissance où il empêche la retransmigration de la ligne médiane. Et inversement, l'expression de COMM redirige ROBO dans des vésicules intracellulaires ne laissant qu'une faible quantité de la protéine à la surface de sorte que les axones puissent franchir

sans obstacle la ligne médiane. Cette internalisation est régulée par l'ubiquitinylation de COMM par DNEDD4 (Myat et al., 2002). Chez les vertébrés aucun orthologue de COMM n'est décrit mais RabGDI, une protéine impliquée dans la machinerie de fusion des vésicules, pourrait jouer ce rôle (Philipp et al., 2012). Un antagoniste de COMM, appelé canoe (CNO) chez la drosophile ou AF-6 chez les vertébrés a été également décrit (Slováková et al., 2012).

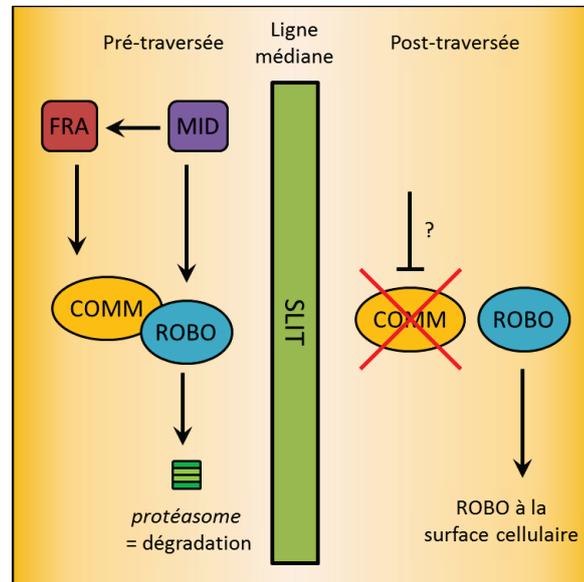


Figure 33 : Régulation de l'expression de ROBO dans la traversée de la ligne médiane

Avant la traversée de la ligne médiane, le facteur de transcription MID induit l'expression de frazzled (FRA) et ROBO. FRA se lie à la région promotrice de COMM et active sa transcription. La protéine COMM envoie ROBO au protéasome où le récepteur est dégradé. Après la traversée de la ligne médiane, une signalisation (encore inconnue) diminue l'expression de COMM. ROBO s'accumule alors à la surface des cônes de croissance et confère une réactivité à SLIT. Ceci empêche ainsi les axones commissuraux de re-franchir la ligne médiane. Modifié d'après (Nawabi and Castellani, 2011).

1.3.7- USP33

Par criblage double-hybride, un nouvel interacteur a été découvert pour sa liaison avec le domaine CC3 du récepteur ROBO1. Il s'agit de la protéase spécifique de l'ubiquitine 33 (USP33) requise par les neurones commissuraux en réponse à SLIT. USP33 est requis pour maintenir la stabilité de ROBO1 après stimulation par SLIT (Yuasa-Kawada et al., 2009a). Depuis sa découverte le rôle de cette enzyme de déubiquitinylation a été étudié dans le cancer du sein (Yuasa-Kawada et al., 2009b), du poumon (Wen et al., 2014) et du côlon (Huang et al., 2014). Ainsi, USP33 permet la redistribution de ROBO1 à la surface cellulaire en réponse à SLIT2 sans affecter le niveau total de protéine ROBO1. USP33 stabilise ROBO1 en prévenant sa dégradation par le protéasome (Figure 34). En effet dans des cellules déplétées en USP33 et traitées au MG132 (inhibiteur du protéasome) le taux de ROBO1 ubiquitinylé augmente (Wen et al., 2014).

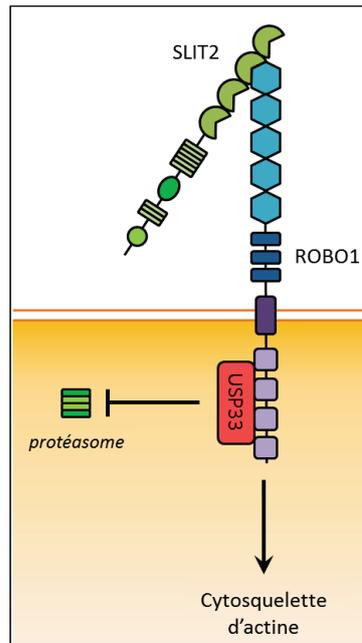


Figure 34 : Stabilisation de ROBO1 par USP33

L'enzyme de déubiquitinylation USP33 inhibe l'ubiquitinylation et la dégradation de ROBO1, stabilisant ainsi le récepteur à la membrane, ce qui permet la fixation de SLIT2 et l'activation des molécules en aval de ROBO1 qui modulent le cytosquelette d'actine et inhibent la migration cellulaire.

1.4- Voies de signalisation

Les récepteurs ROBO ne possèdent aucune activité catalytique : des protéines adaptatrices ou des protéines de signalisation sont requises.

1.4.1- Rho GTPases

Les petites GTPases de la famille Rho (RHO, RAC ET CDC42) jouent un rôle critique dans la signalisation entre les récepteurs de guidage et le cytosquelette (Luo, 2002). RHO stimule l'assemblage des filaments contractiles d'actine et de myosine (fibres de stress), RAC induit la formation des protrusions membranaires riches en actine (lamellipode) et CDC42 favorise la formation des fins prolongements rigides également riches en actine (filopode). Ces Rho GTPases sont actives lorsqu'elles sont liées au GTP et inactives lorsqu'elles sont liées au GDP. L'hydrolyse du GTP en GDP est favorisée par des protéines activatrices des GTPases (GAP) tandis que la substitution du GDP par du GTP est réalisée par des facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEF).

Par crible double-hybride une nouvelle famille de GAP, spécifique de la voie SLIT/ROBO, a été identifiée : les SRGAP (SLIT-ROBO Rho GTPase Activating Protein) nommés SRGAP1, SRGAP2 et SRGAP3 (Wong et al., 2001). Elles possèdent toutes un domaine RhoGAP et un domaine SH3 mais leur activité GAP semble être spécifique à certaines Rho GTPases. Par exemple, en présence

de SLIT, SRGAP1 se lie au domaine CC3 des récepteurs ROBO et inactive CDC42 (Wong et al., 2001). En revanche, SRGAP3 (également connu sous le nom MEGAP et WRP) contrôle l'activité de RAC1 et CDC42 en perturbant la dynamique du cytosquelette d'actine et des microtubules et la formation des complexes focaux (Yang et al., 2006). SRGAP2, quant à elle, promeut l'extension des axones durant le développement cortical de la souris, en générant des protusions au niveau de la membrane neuronale et en inhibant la migration des neurones (Guerrier et al., 2009). L'ensemble de ces données conduit à l'hypothèse que la voie de signalisation SLIT/ROBO empêche les axones de franchir la ligne médiane en diminuant l'activité de RAC1 et de CDC42 ce qui inhibe la polymérisation de l'actine. D'ailleurs, la présence de formes constitutionnellement actives de RAC1 et CDC42 permet aux axones d'ignorer les signaux répulsifs et de continuer à traverser la ligne médiane (Fritz and VanBerkum, 2002).

Une autre protéine de la famille RhoGAP, vilse, a été décrite comme pouvant interagir avec la voie SLIT/ROBO. Vilse se fixe au domaine CC2 de ROBO et régule le signal répulsif de SLIT/ROBO sur les axones voulant passer la ligne médiane en inactivant CDC42 et RAC1 de la même manière que les SRGAP (Lundström et al., 2004)(Hu et al., 2005).

Cependant, la présence de SLIT peut aussi induire l'activation de RAC1. Dans ce cas, la protéine adaptatrice NCK (ou DOCK chez la drosophile) se lie aux domaines CC2 et CC3 de ROBO, recrutant un deuxième adaptateur la protéine PAK (p21-activated protein kinase) ainsi que la protéine GEF SOS ; cette dernière active alors RAC1. Ces partenaires en aval de la voie de signalisation ROBO contrôlent la répulsion et la dynamique du cytosquelette (Yang and Bashaw, 2006).

1.4.2- Effecteurs cytoplasmiques

Plusieurs interacteurs cytoplasmiques sont impliqués dans la modulation du mécanisme de répulsion des récepteurs ROBO en agissant en aval de la voie de signalisation SLIT/ROBO en régulant la polymérisation de l'actine.

1.4.2.1- ABL et MENA

Il a été mis en évidence, chez la drosophile, que la tyrosine kinase Abelson (ABL) peut se lier au domaine CC3 du récepteur ROBO et ainsi inhiber cette voie de signalisation en phosphorylant directement le domaine CC1 de ROBO. Une mutation sur une tyrosine du CC1 phosphorylée par ABL donne une forme hyperactive du récepteur (Bashaw et al., 2000). A l'inverse, MENA (mammalian enabled), qui est le substrat de ABL, interagit directement avec ROBO pour promouvoir le signal de répulsion. La délétion des motifs CC1 ou CC2 diminue significativement

l'interaction avec ROBO, suggérant deux sites possibles de liaison entre MENA et ROBO (Bashaw et al., 2000).

1.4.2.2- Protéines WASP

La protéine WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) intervient également dans la polymérisation de l'actine et la réorganisation du cytosquelette. L'interaction entre WASP et ROBO4 a été mise en évidence par la technique de double-hybride dans les cellules endothéliales (HUVEC) où ces deux protéines sont présentes (Sheldon et al., 2009). Il existe un homologue de WASP : N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) qui contrairement à WASP, est exprimé dans la plupart des tissus. N-WASP a la capacité de se lier directement à CDC42 et d'induire la polymérisation de l'actine. Une surexpression de ROBO4 conduit à un réarrangement du cytosquelette et une augmentation du nombre de filopodes. Les résultats des expériences de GST-pulldown ont confirmé la liaison de WASP et N-WASP au domaine intracellulaire de ROBO4 et permis d'identifier le domaine riche en proline de N-WASP comme nécessaire à l'interaction avec ROBO4. Le traitement de cellules musculaires de rat avec du SLIT2 recombinant inhibe la migration des cellules en diminuant l'expression de WASP et inhibant le réarrangement de l'actine *in vitro* (Ning et al., 2011).

2- Fonctions de la voie SLIT/ROBO dans la progression tumorale

2.1- Altérations géniques

On connaît peu de choses sur SLIT et le développement tumoral, même si il est généralement admis que *SLIT2* et *SLIT3* sont des gènes suppresseurs de tumeurs car souvent inactivés dans divers cancers par hyperméthylation de leurs régions promotrices et perte allélique (Tableau 9) (Dallol et al., 2002a)(Dallol et al., 2003a)(Jin et al., 2009)(Alvarez et al., 2013). De plus, l'inactivation de *Slit2* et *Slit3* chez la souris est associée à la formation de lésions hyperplasiques désorganisées dans l'épithélium mammaire (Marlow et al., 2008). L'hyperméthylation des promoteurs des gènes *SLIT* entraîne également une régulation négative des miRNA-218-1 et miR-218-2, localisés dans l'intron 15 du gène *SLIT2* et dans l'intron 14 du gène *SLIT3* respectivement (voir section C-1.3.5). MiR-218 ciblant ROBO1, il est possible que la perte de cette boucle de régulation négative contribue à la progression tumorale. L'expression de ROBO1 à la surface des cellules cancéreuses peut leur permettre de migrer en réponse au SLIT produit par les cellules non tumorales environnantes par exemple (Tie et al., 2010). Par conséquent, l'hyperméthylation des gènes *SLIT* dans les tumeurs solides pourrait néanmoins contribuer à la progression tumorale en changeant une signalisation autocrine de SLIT/ROBO au profit d'une signalisation paracrine, favorisant ainsi la migration des cellules tumorales et la formation de métastases.

Contrairement à la sous-expression de *SLIT*, qui est très documentée dans la littérature, peu d'études identifiant une surexpression des gènes *SLIT* dans les cancers ont été rapportées. Une surexpression de *SLIT* est toutefois observée dans les cancers de la prostate (Latil et al., 2003). Cependant, les mécanismes par lesquels cette surexpression contribue au développement tumoral ne sont toujours pas élucidés.

L'altération de la voie de signalisation SLIT/ROBO peut aussi être induite *via* la délétion ou l'hyperméthylation du promoteur des gènes *ROBO*. *ROBO1* et *ROBO3*, par exemple, sont inactivés ou perdus dans différents cancers tels poumon, sein et rein (Tableau 9). Le gène *ROBO1* est localisé au locus 3p12.3 qui est fréquemment affecté par des délétions homozygotes ou des pertes d'hétérozygotie dans les cancers du poumon. Cependant, les variations des niveaux d'expression des gènes *ROBO* sont complexes : plusieurs études montrent une augmentation dans différents cancers. Un taux élevé de *ROBO1* peut d'ailleurs être en lien avec la sous-expression du miRNA-218 comme décrit précédemment. L'axe SLIT/ROBO régulant de nombreux processus (migration, adhésion, angiogenèse) des modifications dans cette voie de signalisation induisent donc des effets pléiotropes.

Gène	Type de régulation	Type de cancer	Références
<i>SLIT1</i>	Hyperméthylation du promoteur	Gliomes, cancers du sein et du poumon	(Dickinson et al., 2004)
	Surexpression	Cancers de la prostate	(Latil et al., 2003)
<i>SLIT2</i>	Perte d'hétérozygotie	Cancers de la tête et du cou, du poumon, de la vessie, colorectaux et cervicaux	(Narayan et al., 2006) (Dallol et al., 2003b)
	Hyperméthylation du promoteur	Gliomes, leucémies, cancers colorectaux, du sein et du poumon	(Dallol et al., 2002a) (Dunwell et al., 2009) (Dallol et al., 2003a)
	Surexpression	Cancers de la prostate	(Latil et al., 2003)
<i>SLIT3</i>	Hyperméthylation du promoteur	Gliomes, cancers du sein et du poumon	(Dickinson et al., 2004)
	Surexpression	Cancers de la prostate	(Latil et al., 2003)
<i>ROBO1</i>	Délétion homozygote	Cancers du sein et du poumon	(Sundaresan et al., 1998)
	Hyperméthylation du promoteur	Cancers de la prostate, du rein, du sein et du poumon	(Dallol et al., 2002b)
	Surexpression	Cancers de la prostate et colorectaux	(Latil et al., 2003) (Gröne et al., 2006)
<i>ROBO3</i>	Hyperméthylation du promoteur	Cancers cervicaux, du rein, du sein et du poumon	(Narayan et al., 2006)
	Surexpression	Cancers de la prostate	(Latil et al., 2003)

Tableau 9 : Modifications génétiques et épigénétiques des acteurs de la voie de signalisation SLIT/ROBO dans les cancers.

Source : (Mehlen et al., 2011).

2.2- Survie/prolifération

Le rôle exact de la voie SLIT/ROBO dans la mort ou la survie des cellules tumorales est peu connu mais demande à être étudié sachant que ROBO1 peut interagir avec DCC de manière SLIT-dépendante pour inhiber l'attraction des axones commissuraux par la nétrine (Stein and Tessier-Lavigne, 2001). Il serait intéressant de savoir si l'expression de SLIT/ROBO a un effet sur l'apoptose induite par DCC.

On peut tout de même noter que la perte d'expression de *SLIT2* dans les cellules de cancer du poumon est associée à l'activation d'AKT, un marqueur connu de la survie cellulaire (Tseng et al., 2010). Ce constat est également fait dans les cellules de cancer du sein MCF7 où la surexpression de *SLIT2* inhibe de manière significative la voie PI3K/AKT (Prasad et al., 2008). Les souris injectées avec des cellules MCF7/*SLIT2* ont montré une réduction de 60 à 70% de la taille de la tumeur par rapport aux souris contrôles. De plus, l'expression forcée de *SLIT2* dans des carcinomes épidermoïdes augmente l'apoptose des cellules cancéreuses à la fois *in vitro* mais également lorsque ces cellules sont greffées chez des souris nude (Kim et al., 2008).

Par ailleurs l'étude de cellules de rétine de poulet a mis en évidence le recrutement de la protéine cables à la tyrosine kinase ABL, liée à ROBO. Cables permet alors la liaison entre les complexes ROBO/ABL et N-cadhérine/ β -caténine. ABL peut alors phosphoryler la β -caténine sur sa tyrosine 489, induisant ainsi la dissociation du complexe N-cadhérine/ β -caténine. Ce détachement entraîne une perte d'adhésion cellulaire ainsi que la translocation nucléaire de la β -caténine phosphorylée qui active alors la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Rhee et al., 2007). SLIT joue donc également un rôle prolifératif, dans ce modèle cellulaire, en diminuant l'adhésion cellulaire et en augmentant la prolifération cellulaire par différentes voies de signalisation.

2.3- Mobilité

2.3.1- Migration

Le processus de progression tumorale requiert une augmentation de la mobilité cellulaire qui s'accompagne d'une hausse de la polymérisation de l'actine. La voie de signalisation SLIT/ROBO régule la mobilité cellulaire en contrôlant notamment l'activité de plusieurs protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine telle que la Rho GTPase CDC42 ou la tyrosine kinase ABL.

Plusieurs études ont démontré l'importance dans l'invasion tumorale de la régulation de la protéine CDC42 *via* la voie de signalisation SLIT/ROBO. En effet, un traitement par *SLIT2* de

cellules de médulloblastomes et de gliomes inhibe leur invasion sans affecter la direction de leur migration et leur prolifération (Werbowetski-Ogilvie et al., 2006). Ces effets sont dus à la réduction de l'activité de CDC42 et sont réversibles suite à l'utilisation d'un siRNA dirigé contre SLIT2 ou contre ROBO1 (Figure 35A) (Yiin et al., 2009). De plus, des expériences de xénogreffes montrent une diminution de l'infiltration des cellules de gliomes exprimant *SLIT2* dans le cerveau. Ces études mettent donc en évidence une régulation négative de la petite GTPases CDC42 par la voie de signalisation SLIT/ROBO dans les tumeurs neuronales. Une étude sur des cellules épithéliales tumorales et non transformées a montré que l'interaction SLIT2/ROBO1 inhibe la migration induite par le HGF (Hepatocyte Growth Factor) en inhibant directement CDC42, empêchant ainsi la formation de protusions d'actine (Stella et al., 2009).

Comme décrit précédemment, l'activité des protéines de la famille Rho est modulée par des protéines GAP et GEF. La SRGAP1 est un régulateur clé qui inhibe l'activité de CDC42 en réponse à l'interaction SLIT/ROBO. La SRGAP1 réduit l'activité de CDC42 et de RHO mais pas de RAC. De plus, un dominant négatif de la SRGAP1 bloque l'inactivation de CDC42 induite par SLIT et par conséquent induit la migration cellulaire (Wong et al., 2001). SRGAP1 joue également un rôle dans l'inflammation pulmonaire où SLIT2 empêche le recrutement des neutrophiles qui expriment ROBO1 et un taux élevé de SRGAP1. Au contraire, SLIT2 favorise le chimiotaxisme des éosinophiles qui expriment ROBO1 mais un faible niveau de SRGAP1 (Ye et al., 2010). L'ensemble de ces études montre donc que SLIT inhibe la mobilité des cellules tumorales en régulant négativement la Rho GTPase CDC42 ; par conséquent, une perte de l'expression de SLIT par les cellules durant la progression tumorale induit de façon inappropriée la migration.

La voie de signalisation SLIT/ROBO conduit également au recrutement d'ABL, une tyrosine kinase qui régule à la fois les réarrangements du cytosquelette d'actine et l'activité des récepteurs ROBO. ABL inhibe le signal répulsif induit par SLIT en phosphorylant ROBO1 sur sa partie intracellulaire (Figure 35B). En effet, la mutation d'une tyrosine présente au niveau du motif CC1 de ROBO1 et ciblée par ABL conduit à une hyper-activation du récepteur (Bashaw et al., 2000). Cependant, peu d'études décrivent les mécanismes précis par lesquels ABL contribue à la migration des cellules tumorales en réponse à SLIT. La transformation de cellules murines, *via* l'oncogène SRC, résulte d'une activation d'ABL, qui stabilise alors ROBO1 à la membrane plasmique, conduisant à l'activation de CDC42 et RAC1 ainsi qu'à une migration cellulaire indépendante de SLIT (Khusial et al., 2010). Par conséquent, ROBO1 peut réguler positivement, dans ce contexte tumoral, les Rho GTPases sous-jacentes et induire la migration, tandis que dans le système nerveux ainsi que dans d'autres cellules cancéreuses, ROBO1 présente un rôle inhibiteur.

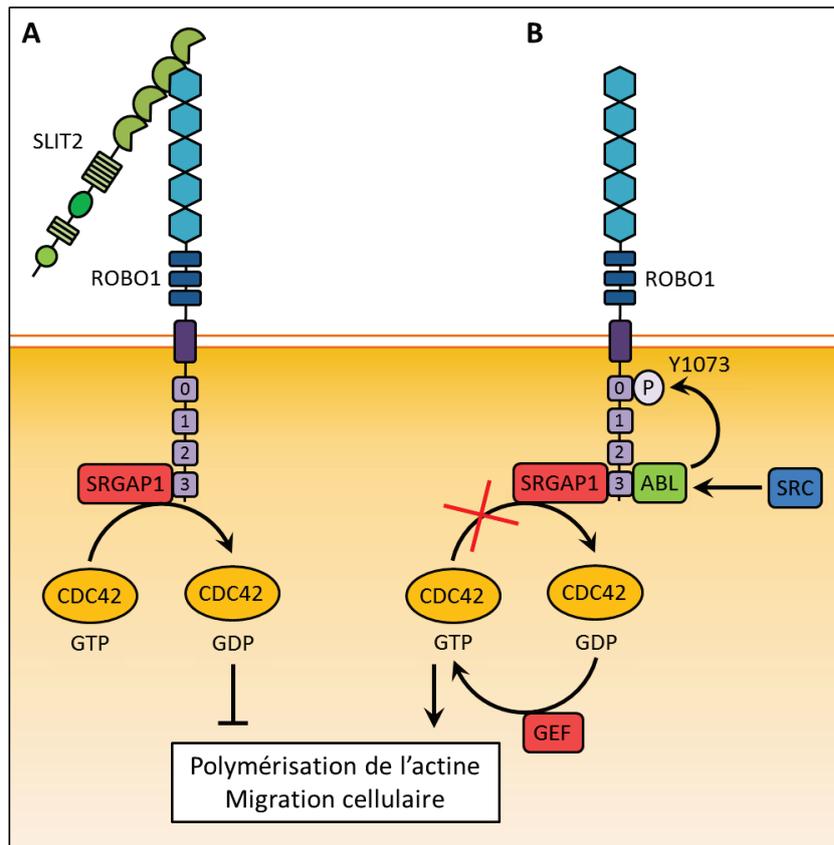


Figure 35 : Régulation de la migration cellulaire par la voie de signalisation SLIT/ROBO via l'activation de régulateurs du cytosquelette d'actine

A. La fonction anti-migratrice de la voie SLIT/ROBO est liée au niveau de CDC42-GTP actif : la fixation de SLIT2 à son récepteur entraîne le recrutement au niveau du domaine intracellulaire de ROBO1 de la SRGAP1 qui inactive CDC42 responsable de la polymérisation de l'actine. **B.** La fonction pro-migratrice de la voie SLIT/ROBO est régulée par la kinase ABL, qui inhibe le récepteur ROBO1 en phosphorylant la tyrosine 1073 suite à son activation par SRC. Ceci conduit à l'activation de CDC42-GTP ainsi qu'à une migration cellulaire indépendante de SLIT2.

Ces données contradictoires concernant l'activité pro-migratrice ou anti-migratrice soulignent le danger de généraliser les résultats obtenus avec un petit nombre de lignées cancéreuses (qui plus est à divers stades de progression tumorale). A partir des données actuellement disponibles, qui sont pour la plupart les résultats d'expériences réalisées *in vitro*, le modèle suivant a été proposé : au niveau du site primaire la migration des cellules tumorales en réponse à un chimioattractant n'est pas liée à la voie de signalisation SLIT/ROBO. Par contre, pour les cellules cancéreuses avec des propriétés métastatiques le système SLIT/ROBO pourrait contribuer à la mobilité des cellules (Mehlen et al., 2011).

2.3.2- Transition épithélio-mésenchymateuse

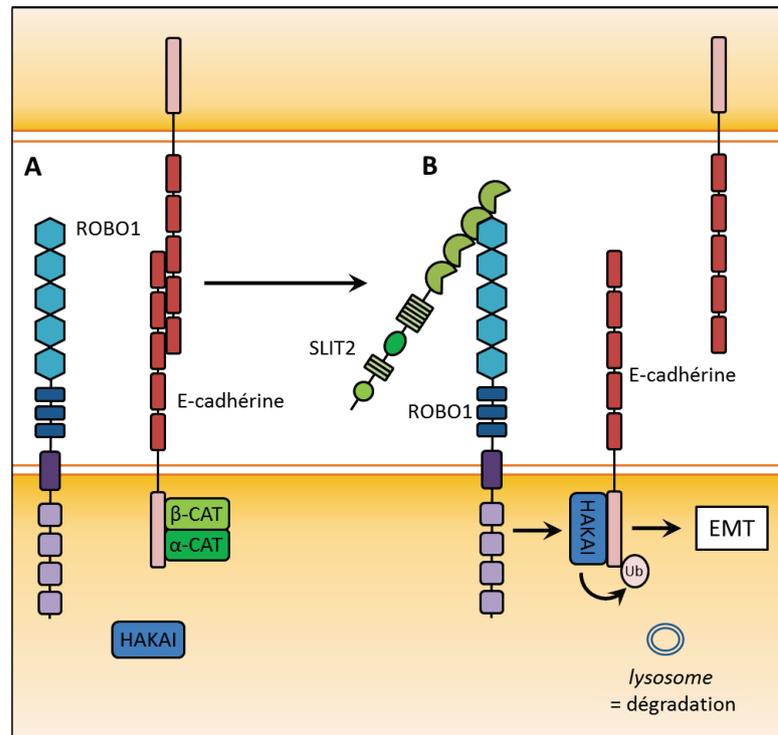


Figure 36 : Transition épithélio-mésenchymateuse et voie de signalisation SLIT2/ROBO1

A. Le domaine extracellulaire de la E-cadhérine forme des jonctions d'adhérence entre les cellules épithéliales alors que la région cytoplasmique interagit directement avec la β -caténine (β -CAT), qui à son tour interagit avec l' α -caténine (α -CAT) fixée aux filaments d'actine du cytosquelette. **B.** L'interaction SLIT2/ROBO1 permet la fixation de l'ubiquitine ligase HAKAI sur la E-cadhérine ce qui entraîne sa dégradation par le lysosome. La perte d'E-cadhérine entraîne la dissociation des interactions cellule/cellule et l'acquisition d'un phénotype migratoire. Modifié d'après (Zhou et al., 2011).

Les cellules tumorales d'origine épithéliale peuvent subir une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), ce qui les rend invasives et conduit à la formation de métastases. Une des caractéristiques majeures est la perte de l'adhésion cellule-cellule médiée par les E-cadhérine. L'interaction ROBO/cadhérine est indirecte et peut favoriser dans certains cas l'EMT. Cependant d'autres études ont montré que la présence de SLIT2 perturbait cette coopération et favorisait les jonctions d'adhérence. Comme pour la fonction pro ou anti-migratrice de la voie SLIT/ROBO discutée ci-dessus, la modulation de la transition épithélio-mésenchymateuse varie suivant le type de cancer mais aussi le contexte environnemental.

Tout d'abord, l'étude sur des cellules de cancer colorectal démontre que la fixation de SLIT2 à ROBO1 entraîne le recrutement de l'ubiquitine ligase HAKAI par l'E-cadhérine, aboutissant à l'ubiquitination de l'E-cadhérine et puis à sa dégradation lysosomale (Figure 36). L'expression ectopique de SLIT2 et ROBO1 ainsi que le traitement de cellules exprimant du SLIT2 recombinant induit un phénotype de type EMT (N-cadhérine⁺ vimentine⁺), alors que la déplétion de ROBO1 ou

l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-ROBO1 déclenche un phénotype de type MET (E-cadhérine⁺ α-caténine⁺) (Zhou et al., 2011).

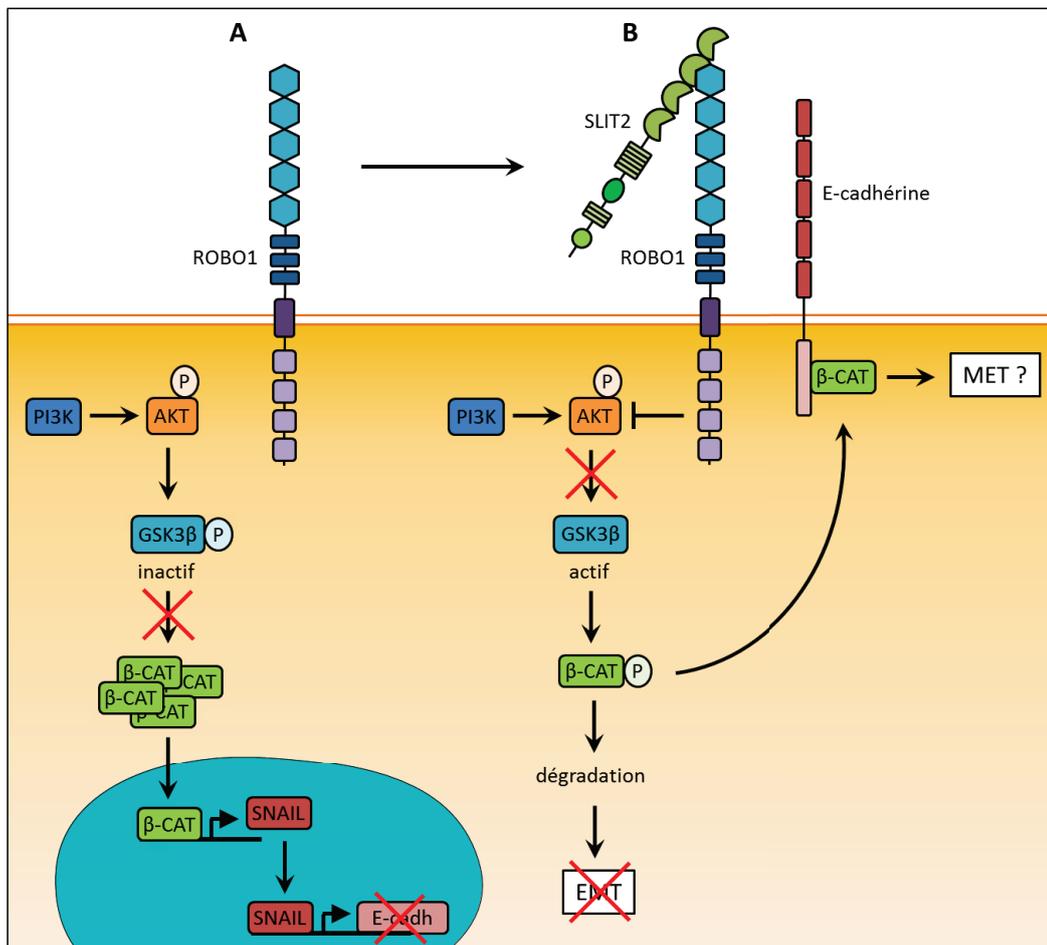


Figure 37 : Transition mésenchymo-épithéliale et voie de signalisation SLIT2/ROBO1

A. La protéine kinase AKT phosphorylée par PI3K inhibe GSK3 β ce qui conduit à une accumulation de β -caténine et à sa translocation dans le noyau. La β -caténine nucléaire va alors favoriser l'expression du facteur de transcription SNAIL qui en retour va inhiber l'expression du gène codant pour l'E-cadhérine. **B.** L'interaction SLIT2/ROBO1 inhibe la protéine kinase AKT et par conséquent laisse GSK3 β dans sa forme active non phosphorylée. La β -caténine est alors phosphorylée ce qui l'exclut du noyau et empêche ainsi son activité transcriptionnelle. La β -caténine cytoplasmique est transférée à la membrane où elle interagit avec la E-cadhérine, ce qui stabilise les interactions cellule/cellule et bloque la migration cellulaire.

D'autre part, un KO des gènes *SLIT* réalisé dans des cellules de cancer du poumon CL1-5, augmente leur potentiel métastatique en inhibant l'activité de la GSK-3 β , via la voie PI3K/AKT. La β -caténine n'étant plus dégradée, elle est transloquée dans le noyau où elle va induire l'augmentation de l'expression du gène *SNAIL*, un régulateur crucial de l'EMT ; il en résulte alors une diminution de production de la E-cadhérine, une réduction de l'adhésion ainsi qu'une augmentation de la mobilité cellulaire (Figure 37) (Tseng et al., 2010). Lors d'un traitement au 5-aza-2'-déoxycytidine, un inhibiteur des méthyltransférases de l'ADN, la production de E-cadhérine membranaire est restaurée et les cellules migrent moins. Des résultats comparables ont

également été obtenus dans les cellules MCF7 où la surexpression de *SLIT2* provoque une diminution du taux de β -caténine. La translocation à la membrane de la β -caténine résiduelle est alors favorisée avec une augmentation de l'association β -caténine/E-cadhérine (Prasad et al., 2008). L'hyperméthylation du promoteur des gènes *SLIT* fréquemment observée dans les tumeurs primaires de cancers du poumon et du sein (*voir section C-2.1*) pourrait donc promouvoir la transition épithélio-mésenchymateuse alors que dans les organes métastatiques secondaires comme l'os ou le cerveau, qui expriment fortement *SLIT2*, cela pourrait au contraire inhiber la transition épithélio-mésenchymateuse voire favoriser la transition mésenchymo-épithéliale qui est un processus connu dans la formation des métastases.

2.3.3- Chimiotaxisme

Les cellules normales ou métastatiques qui migrent ciblent des organes spécifiques. En effet, les cellules répondent à différents facteurs tels que des facteurs de croissance (PDGF, HGF) et des chimiokines (CXCL12). Dans ce contexte les protéines SLIT peuvent moduler la migration induite par ces différents facteurs, en particulier l'axe CXCL12/CXCR4.

Une étude sur des cellules épithéliales tumorales et non transformées a montré que l'interaction SLIT2/ROBO1 inhibe la migration induite par le HGF (Hepatocyte Growth Factor) en inhibant directement CDC42, empêchant ainsi la formation de protusions d'actine (Stella et al., 2009). Ces travaux confirment le rôle modulateur de l'axe SLIT/ROBO dans la migration.

Dans les leucocytes, SLIT2 inhibe de manière dose-dépendante la migration cellulaire induite par CXCL12 (Wu et al., 2001). En effet, le domaine intracytoplasmique CC3 du récepteur transmembranaire ROBO1 interagit avec le récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G, CXCR4. Ce domaine CC3 est primordial car en son absence l'inhibition par SLIT2 du chimiotaxisme induit par CXCL12 ne se produit pas. Un test de migration, en chambre de Boyden, a été utilisé pour évaluer l'effet de SLIT sur la migration des leucocytes en réponse au CXCL12 : SLIT, qu'il soit ajouté dans la chambre supérieure, inférieure ou les deux, inhibe la migration des leucocytes, ce qui suggère que SLIT diminue la mobilité globale des cellules, plutôt que d'agir en tant que facteur répulsif. L'étude du signal anti-chimiotactique de la voie SLIT/ROBO a montré que SLIT2 inhibait l'activité kinase de SRC induite par CXCL12. La kinase SRC est associée aux autres kinases des adhésions focales et joue un rôle crucial dans la transduction des signaux impliqués dans la migration et l'adhésion cellulaire.

De nombreuses études ont également mis en évidence la capacité de la voie SLIT/ROBO à inhiber l'effet pro-migratoire et pro-métastatique de l'axe chimioattractant CXCL12/CXCR4 ; cet axe étant particulièrement important dans la formation des métastases de cancer du sein (Müller et al., 2001)(Mukherjee and Zhao, 2013). Comme dans les leucocytes, SLIT2 inhibe le

chimiotactisme induit par CXCL12 des cellules de cancer du sein possédant les récepteurs CXCR4 et ROBO1, en inhibant la phosphorylation et l'activation de divers effecteurs sous-jacents tels que la FAK, la paxilline, PI3K, les MAPK ou bien les MMP2/9 (Prasad et al., 2004). L'étude de 24 lignées de cancer du sein et de 43 échantillons de patientes a confirmé que la présence de SLIT2 contrecarrait le chimiotaxisme induit par CXCL12 (Schmid et al., 2007). De plus, la dérégulation de l'expression de *SLIT2* dans les cancers du sein est souvent associée à une surexpression du couple CXCL12/CXCR4, ce qui contribue d'ailleurs au développement de lésions hyperplasiques de la glande mammaire chez des souris KO pour les gènes *Slit2* ou *Robo1* (Marlow et al., 2008).

2.4- Angiogenèse

L'angiogenèse est un processus cellulaire crucial pour la croissance tumorale et la formation de métastases (Carmeliet and Jain, 2000) qui exigent de nouveaux vaisseaux pour l'alimentation en oxygène et en nutriments. Une offre insuffisante de sang peut entraîner une nécrose de la tumeur. Dans ce contexte, *ROBO4* a été découvert pour son homologie avec *ROBO1* (75% d'identité) suite à l'analyse des gènes spécifiques des tissus endothéliaux (Huminiecki et al., 2002). Et chez la souris l'expression de *Robo4* a été montrée comme restreinte au système vasculaire lors du développement embryonnaire à l'aide d'un marquage immunohistochimique. Chez l'homme, l'activité du promoteur de *ROBO4* est plus importante dans des cellules endothéliales que dans d'autres lignées cellulaires (reins, foie, lymphocytes) (Okada et al., 2007). Cependant, comme *ROBO4* appartient à la famille des molécules de guidage axonal on peut supposer qu'il joue un rôle dans la migration des cellules endothéliales (attraction/répulsion) lors du développement vasculaire et de l'angiogenèse. Bien que la signalisation SLIT/ROBO soit connue pour réguler l'angiogenèse, la fonction de ces molécules comme facteurs angiogéniques ou angiostatiques reste controversée.

Durant l'angiogenèse la production de facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), active les cellules endothéliales par le biais des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Cette association permet l'activation d'une multitude de voies cellulaires incluant les petites GTPases et promeut la prolifération cellulaire et la formation de filopodes (Herbert and Stainier, 2011). Dans ce contexte, *ROBO4* serait un élément clé dans la mise en place et le maintien de la vascularisation car son inhibition comme sa surexpression entraînent des défauts de vascularisation.

Plusieurs études ont souligné le rôle pro-angiogénique de *ROBO4*, notamment par le contrôle de la migration des cellules endothéliales par l'intermédiaire des Rho GTPases comme CDC42 et RAC1 (Kaur et al., 2006)(Kaur et al., 2008). De plus, *ROBO4* peut interagir avec le récepteur *ROBO1* pour promouvoir la migration endothéliale dans des cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothéliale Cell). *SLIT2* se fixe, par l'intermédiaire de *ROBO1*, sur le complexe

hétérodimérisé et active CDC42 permettant le recrutement de la protéine WASP par ROBO4 initiant ainsi la polymérisation d'actine et la formation de filopodes nécessaires à la migration des cellules endothéliales (Sheldon et al., 2009). L'analyse transcriptomique de cancers du pancréas humain a d'ailleurs décrit *ROBO1* comme un gène pro-angiogénique gouvernant le switch angiogénique (Abdollahi et al., 2007). L'utilisation d'un anticorps anti-ROBO1 réduit la densité des micro-vaisseaux et la masse tumorale de cellules de mélanome humaines A375 (Wang et al., 2003).

A l'inverse, SLIT2 peut également inhiber la migration des cellules endothéliales (Jones et al., 2008)(Park et al., 2003)(Jones et al., 2009) et des cellules vasculaires des muscles lisses (Liu et al., 2006). Plus précisément, ROBO4 est particulièrement exprimé dans les "stalk-cell" qui correspondent à des cellules endothéliales matures et non dans les "tip-cell" qui sont les analogues endothéliaux des cônes de croissance. Cette observation a permis de mettre en évidence le rôle anti-angiogénique de ROBO4. La stimulation par SLIT2 des cellules exprimant ROBO4 entraîne l'inhibition de la voie du VEGF par son récepteur VEGFR2 et stabilise le réseau vasculaire (Jones et al., 2008). La même équipe a ensuite décortiqué le mécanisme intracellulaire menant à cette inhibition : la présence de SLIT2 entraîne la formation d'un complexe ROBO4/paxilline au niveau des adhésions focales qui bloque l'activation de RAC via la GTPase ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) (Jones et al., 2009) et donc inhibe la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse (Figure 38A). Comme discuté précédemment (*voir section C-1.2.4*), la formation d'un complexe hétérodimérique ROBO1/ROBO4 dans les cellules endothéliales pourrait expliquer la réponse à SLIT2 observée. En accord avec cette observation, la déplétion de ROBO1 ou ROBO4 bloque la capacité de SLIT à inhiber la migration des cellules endothéliales humaines (London et al., 2010). Cependant, l'implication de ROBO1 dans l'angiogenèse médiée par SLIT2/ROBO4 est controversée. En effet, dans la lympho-angiogenèse la déplétion de ROBO1 ne modifie pas l'action de SLIT2 alors que celle de ROBO4 bloque l'activité anti-angiogénique de Slit2 (Yu et al., 2014).

Un autre mécanisme impliquant ROBO4 et le récepteur à la nétrine, UNC5B, est également proposé comme mécanisme inhibiteur de l'angiogenèse. Mais contrairement à SLIT2, dans ce cas-là ROBO4 agit lui-même comme ligand pour UNC5B ; cette interaction peut avoir lieu entre deux cellules voisines (trans) ou sur une même cellule (cis). ROBO4 active UNC5B ce qui diminue l'association de la kinase SRC avec le récepteur 2 au VEGF (VEGFR-2) et neutralise l'activation de la voie de signalisation par la fixation du VEGF (Figure 38B) (Koch et al., 2011). Le traitement de souris avec un récepteur chimérique soluble ROBO4-Fc après implantation sous-cutanée d'éponge (modèle *in vivo* d'angiogenèse) montre une faible croissance cellulaire et une absence de larges vaisseaux comparé au traitement contrôle (Suchting et al., 2005). L'ensemble de ces travaux laisse à penser qu'un tel traitement pourrait être utilisé dans le cas de pathologies résultant d'une angiogenèse excessive.

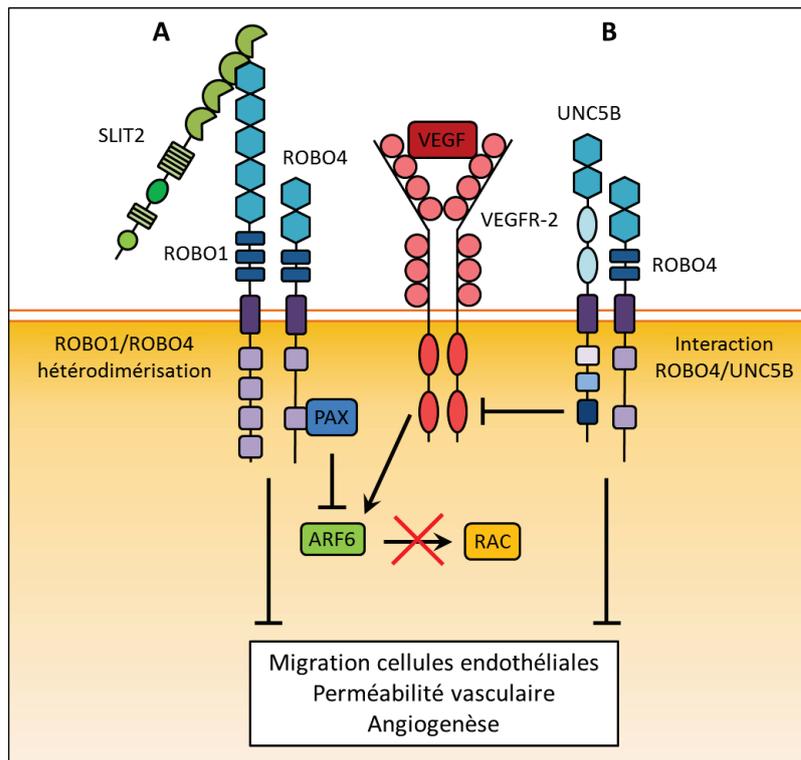


Figure 38 : Inhibition par ROBO4 de l'angiogenèse induite par la voie du VEGF

La voie de signalisation du VEGFR-2 induit l'activation séquentielle des protéines ARF6 et RAC, conduisant ainsi à la formation de protusions cellulaires. **A.** L'interaction SLIT2/ROBO4 stimule le recrutement de la paxilline au domaine CC2 de ROBO4 ce qui conduit à l'inactivation de la petite GTPase ARF6 et de RAC bloquant ainsi l'activité angiogénique. **B.** ROBO4 est capable de se lier à UNC5B et de bloquer le signal pro-angiogénique transduit par la voie de signalisation sous-jacente à l'axe VEGF/VEGFR2.

Un autre membre de la famille SLIT a également été étudié pour son rôle dans l'angiogenèse, il s'agit de SLIT3. Dans les cellules endothéliales, SLIT3 stimule la prolifération et la migration des cellules *via* ROBO4 (Zhang et al., 2009a)(Paul et al., 2013). Le traitement de cellules avec du SLIT3 accélère la formation de réseaux vasculaires *in vitro* de manière comparable au VEGF. Les souris KO pour *Slit3* présentent d'ailleurs de graves problèmes angiogéniques notamment dans le développement du diaphragme et des reins (Liu et al., 2003). Ces résultats montrent que le rôle de ROBO4 dans l'angiogenèse peut dépendre du ligand SLIT présent. Le « code ROBO » introduit précédemment (*voir section C-1.1*) pourrait expliquer les effets antagonistes observés dans les diverses études en raison des différences fonctionnelles des récepteurs ROBO et de la distribution variable des molécules SLIT dans les tissus (Rajagopalan et al., 2000)(Simpson et al., 2000). Par ailleurs, il a été observé qu'en présence d'éphrine-A1 les effets pro-angiogéniques de SLIT2 étaient annulés (Dunaway et al., 2011). Ces données suggèrent que SLIT2 régule de façon différentielle l'angiogenèse suivant l'expression ou non d'éphrine-A1, fournissant un mécanisme plausible pour les fonctions pro et anti-angiogéniques de SLIT2.

3- Ancrage des cellules souches hématopoïétiques

Comme décrit précédemment (*voir section A-2.2.1*), il a été démontré que ROBO4 coopère avec CXCR4 pour maintenir les cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la niche osseuse. En effet, l'absence de ROBO4 dans les CSH induit une perte de la localisation de ces cellules au sein de la niche (Goto-Koshino et al., 2012). De plus, SLIT2 est spécifiquement exprimé dans les ostéoblastes (Smith-Berdan et al., 2012)(Sun et al., 2009) ce qui suppose un rôle de la voie de signalisation SLIT/ROBO dans l'homéostasie des CSH au niveau de la niche endostéale par exemple en renforçant l'ancrage des CSH en plus du couple CXCL12/CXCR4.

Les CSH et les cellules métastatiques partagent de nombreux processus (chimiotaxisme, ancrage). A l'aide d'un modèle murin de cancer de la prostate métastatique, la compétition directe entre les CSH et les cellules tumorales pour l'occupation de la niche osseuse a été mise en évidence (Shiozawa et al., 2011). La co-injection de cellules tumorales et de CSH humaines diminue la prise de greffe des CSH dans la moelle osseuse. Et par imagerie multiphotonique la co-localisation de ces deux populations cellulaires est observée dans la niche endostéale. De plus l'utilisation d'un agent mobilisateur des CSH, l'antagoniste de CXCR4 ADM3100, conduit à la mobilisation des cellules tumorales hors de la moelle osseuse. De la même manière que pour le CSH, ROBO4 pourrait également coopérer avec CXCR4 pour favoriser l'ancrage des cellules tumorales dans la niche osseuse.

PARTIE III : Travail expérimental

A- Introduction : But du travail

La formation de métastases osseuses survient chez plus de 1,5 million de personnes atteintes d'un cancer et est le plus souvent associée aux cancers de la prostate, du poumon et du sein (Weilbaeher et al., 2011). Dans le cas des cancers du sein notamment, les cellules cancéreuses métastatiques qui ont disséminé dans la moelle osseuse altèrent les fonctions des cellules responsables de la résorption et de la formation osseuse, et détournent également les signaux provenant de la matrice osseuse. En perturbant l'équilibre physiologique entre la résorption osseuse et la formation osseuse, les cellules métastatiques favorisent la destruction osseuse et conduisent à des événements tels que des fractures, des compressions nerveuses et des douleurs osseuses. A ce stade d'évolution, il est très rare de pouvoir proposer un traitement curatif des métastases osseuses. De plus, l'apparition de lésions osseuses est également observée même lors d'une prise en charge précoce des patientes. C'est pourquoi il est primordial de connaître et de comprendre les étapes précoces de formation des métastases osseuses dans le but de développer des thérapies ciblées contre les micrométastases afin de ralentir leur développement et d'améliorer le pronostic vital de ces patientes.

L'échappement précoce des cellules tumorales est caractérisé par la présence de cellules cancéreuses circulantes (CTC) dans le sang et de cellules cancéreuses disséminées (DTC) dans la moelle osseuse, et ce, même chez des patientes présentant des tumeurs mammaires de petite taille. Les cellules tumorales présentant des caractéristiques génétiques ou épigénétiques particulières peuvent co-opter des signaux spécifiques permettant leur implantation et leur survie dans la moelle osseuse. Plusieurs mécanismes impliqués dans le tropisme des cellules métastatiques tels que les interactions entre les récepteurs CXCR4 ou RANK et leur ligand respectif CXCL12 ou RANKL ont déjà été identifiés (Papachristou et al., 2012). Cependant, les mécanismes moléculaires conduisant à l'ancrage et au développement des cellules tumorales à un site précis, appelé niche métastatique, sont encore mal connus. Par compétition, les cellules cancéreuses prendraient la place des cellules souches hématopoïétiques dans la niche osseuse et parasiteraient le microenvironnement osseux régulant ainsi leur dormance, leur survie à long terme et leur croissance métastatique ; ce qui conduirait à leur procurer une protection contre les traitements de chimiothérapie conventionnels (Shiozawa et al., 2011).

Les traitements actuellement proposés aux patientes présentant des métastases osseuses ostéolytiques visent à ralentir l'ostéolyse, ce sont principalement des inhibiteurs de la résorption osseuse : bisphosphonates et anti-RANKL (denosumab) (Clézardin, 2011a). Cependant, ces traitements ne sont pas curatifs, c'est pourquoi de nouvelles thérapies ciblées doivent être développées pour venir bloquer l'activité des ostéoclastes mais également interférer avec le tropisme et l'ancrage des cellules tumorales dans le microenvironnement osseux.

Il est clairement admis que les cellules cancéreuses possèdent une signature moléculaire identifiée comme un élément discriminant du potentiel métastatique des tumeurs solides. Dans ce cadre, notre équipe a analysé et comparé les transcriptomes d'un carcinome mammaire humain, la lignée MDA-MB-231 et d'une sous-population ostéotrope, la lignée Bo2. De manière intéressante, deux récepteurs impliqués initialement dans le guidage axonal, les gènes codant les récepteurs ROBO1 et ROBO4, sont surexprimés dans la sous-population ostéotrope Bo2, suggérant un potentiel rôle de ces récepteurs dans la cascade métastatique menant à l'os.

À ce jour, quatre récepteurs ROBO (ROBO1-4) et trois ligands SLIT (SLIT1-3) ont été caractérisés chez les mammifères (Ypsilanti et al., 2010). Tous les récepteurs ROBO, à l'exception de ROBO4, partagent une architecture similaire leur permettant d'interagir avec les molécules SLIT au cours du développement neuronal. Le récepteur ROBO4, découvert plus tardivement, diverge des autres récepteurs tant au niveau structural que fonctionnel (Humniecki et al., 2002). En effet, les parties N-terminales de ROBO1 et ROBO4 ne possèdent que 42% d'identité moléculaire et les résidus actuellement identifiés pour la liaison avec SLIT ne sont pas conservés dans ROBO4. D'autre part, *ROBO4* se différencie par son expression spécifique dans les cellules endothéliales bien qu'une récente étude démontre que ROBO4, comme les autres membres ROBO, est impliqué dans des mécanismes de migration neuronale (Zheng et al., 2012). Récemment, une interaction du récepteur ROBO4 avec un autre récepteur de guidage axonal, UNC5B, a été mise en évidence, révélant la complexité des mécanismes liés à ce récepteur (Koch et al., 2011). Dans les cancers humains, tels que le poumon, le sein, la prostate ou le rein, les gènes *ROBO1* et *SLIT2* sont souvent inactivés en raison de l'hyperméthylation de leur promoteur, leur conférant un rôle potentiel de gènes suppresseurs de tumeurs (Mehlen et al., 2011). Cependant, peu d'études s'intéressent, dans ce contexte, à l'implication de *ROBO4*.

Mes premiers travaux de thèse ont donc tout naturellement porté sur une analyse générale des taux de ROBO4 présents dans l'ensemble des lignées de cancers du sein du laboratoire mais également sur l'étude d'une cohorte de 254 tumeurs primaires de patientes atteintes d'un cancer du sein afin de mettre en évidence la corrélation entre le niveau de ROBO4 et le risque de rechute clinique.

Mon projet de thèse a également porté sur l'identification du rôle de ROBO4 dans les étapes précoces de formation des métastases osseuses à l'aide du modèle cellulaire Bo2. En effet, les premiers travaux réalisés au laboratoire avaient permis de mettre en évidence l'implication *in vivo* de ROBO4 dans la croissance tumorale primaire et dans la colonisation de l'os : les tumeurs obtenues après une injection par voie orthotopique de cellules Bo2 déplétées en ROBO4 étaient en moyenne trois fois plus petites que celles obtenues après injection des cellules contrôles. De plus, après une injection de ces mêmes cellules par voie intra-artérielle ou intra-tibiale, une diminution de plus de 75% de la colonisation et de l'ancrage dans l'os a été observée. Ces premiers

résultats montraient clairement l'implication de ROBO4 dans la croissance tumorale et l'ancrage osseux et donc dans la formation des métastases osseuses. Suite à ces observations, mon travail a porté plus précisément sur l'étude du microenvironnement osseux et sur la recherche des différents interacteurs potentiels du récepteur ROBO4 (SLIT2, SLIT3, UNC5B) dans la moelle osseuse. Ces travaux ont clairement montré que l'arrivée des cellules métastatiques dans l'os entraînait la surproduction de SLIT2 par les ostéoblastes et favorisait ainsi l'adhésion des cellules tumorales dans la niche endostéale.

L'un des enjeux cruciaux actuels dans l'étude des métastases osseuses est d'inhiber l'ancrage des cellules cancéreuses dans la moelle osseuse. En effet, l'apparition de métastases osseuses survient parfois des années (10 ans ou plus) après le diagnostic initial. La possibilité que le récepteur ROBO4 puisse intervenir dans la colonisation de la moelle osseuse par les cellules tumorales ouvre donc de nouvelles perspectives thérapeutiques. C'est pourquoi, au cours de mon doctorat, j'ai développé différents anticorps anti-ROBO4 et protéines de fusion Fc ainsi que les tests fonctionnels associés. Ces différents essais, d'une part dans le modèle endothélial (cellules HUVEC) connu pour son niveau élevé de ROBO4 et d'autre part avec les cellules métastatiques BO2, m'ont permis de tester *in vitro* l'efficacité de ces différents outils pour bloquer la migration et l'invasion. Par la suite, j'ai pu également mettre en évidence que l'utilisation d'un anticorps anti-ROBO4 inhibe l'ancrage des cellules métastatiques BO2 aux cellules ostéoblastiques. Ces résultats encourageants vont permettre de développer une stratégie thérapeutique bloquant le développement des métastases dans la moelle osseuse.

B- Matériels et méthodes

Biologie cellulaire

Lignées cellulaires. L'ensemble des cellules en culture ont été cultivées en milieu complet c'est-à-dire supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Lonza) et 1% (v/v) de pénicilline/streptomycine (Life technologies) à 37°C dans un incubateur à 5% de CO₂.

Cellule	Type cellulaire	Référence	Milieu de culture
BT-474	Lignée de carcinome canalaire humain	ATCC HTB-20	Hybri-care ATCC #46-X
Hs578T	Lignée de carcinome mammaire humain	ATCC HTB-126	DMEM Life technologies #31885-023
HUVEC	Cellules endothéliales de veine ombilicale humaine	PromoCell C-12203	Endothelial Cell Basal Medium 2 PromoCell #C-22111
MC3T3-E1	Lignée murine pré-ostéoblastique	ATCC CRL-2593	α-MEM Life technologies #22571-020
MIA-PaCa-2	Lignée de carcinome pancréatique humain	ATCC CRL-1420	DMEM Life technologies #31885-023
MDA-MB-231	Lignée d'adénocarcinome humain (effusion pleurale)	ATCC HTB-26	DMEM Life technologies #31885-023
MDA-MB-231/B02	Lignée ostéotrope dérivée de la lignée MDA-MB-231		DMEM Life technologies #31885-023
MCF7	Lignée d'adénocarcinome humain (effusion pleurale)	ATCC HTB-22	RPMI-1640 Life technologies #A10491-01
SK-BR-3	Lignée d'adénocarcinome humain (effusion pleurale)	ATCC HTB-30	McCoy's 5A Sigma-Aldrich #M9309
T-47D	Lignée de carcinome canalaire humain (effusion pleurale)	ATCC HTB-133	RPMI-1640 (ife technologies #A10491-01)
ZR-75-1	Lignée de carcinome canalaire mammaire humain (ascite)	ATCC CRL-1500	RPMI-1640 Life technologies #A10491-01

Transduction. Pour les premières étapes de la transduction, à J1, la lignée cellulaire transcomplémentante GP2-293 (Clontech) exprimant de façon stable les protéines Gag et Pol a été ensemencée à une densité de $4,5 \cdot 10^6$ cellules dans une boîte 10 cm (Corning) dans du DMEM complet à forte concentration en glucose (4,5 g/L ; Life technologies). À J2, les cellules GP2-293 ont été transfectées par l'utilisation du phosphate de calcium (Sigma-Aldrich) simultanément avec 8 µg du vecteur pV-SVG (Clontech) exprimant la protéine Env, et 8 µg du vecteur pLPCX (Clontech) avec ou sans la séquence codante du gène *ROBO4* humain. À J4, les lignées cancéreuses ont été ensemencées à raison de $7 \cdot 10^5$ cellules par boîtes 6 cm (Corning) dans du milieu complet. Parallèlement, le milieu des cellules GP2-293, transfectées la veille, a été renouvelé. À J5, les cellules tumorales ont été transduites par un mélange 1:1 de milieu des cellules GP2-293, contenant les particules virales, et de milieu complet additionné de polybrène à 4 µg/mL (Santa Cruz). À J8, les cellules ont été placées sous sélection antibiotique, puromycine à 2 µg/mL (GE Healthcare).

Cytométrie en flux. Les cellules ont été décollées par l'action de la trypsine puis centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes. Le culot a ensuite été rincé dans du PBS-BSA 1% et $2 \cdot 10^5$ cellules ont été incubées pendant 40 minutes à 4°C soit avec un anticorps monoclonal anti-Robo4 humain (R&D MAB265721 ; 1/200), soit avec un isotype contrôle IgG2b (BD Pharmingen 556654 ; 1/200). Après un rinçage au PBS-BSA 1% et une centrifugation à 1700 rpm pendant 10 minutes, les cellules ont été incubées 40 minutes à 4°C avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé au FITC (Life technologies F-11021; 1/400). A nouveau, les cellules ont été lavées avec du PBS-BSA 1% puis centrifugées à 1700 rpm pendant 10 minutes. Le culot a été repris dans 500 μ L de PBS et les cellules ont été analysées à l'aide du cytomètre FACS Canto II (BD Biosciences).

Co-culture. Les cellules ostéoblastiques de souris MC3T3-E1 ont étéensemencées à haute densité ($3 \cdot 10^5$ cellules/puits dans des plaques 6 puits) dans de l' α -MEM complet. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du milieu de différenciation (α -MEM complet supplémenté en acide ascorbique à 50 μ g/mL seul pendant 7 jours puis associé au β -glycérophosphate à 10 mM pendant 7 jours). Lorsque les cellules sont confluentes, $1 \cdot 10^4$ cellules B02 sont ajoutées sur les cellules MC3T3-E1. L'expérience a été stoppée au bout de 14 jours et les ARN totaux ont été extraits.

Formation de pseudo-capillaires. La surface d'une plaque 48 puits a été préalablement coatée avec 100 μ L de Matrigel réduit en facteurs de croissance à 10 μ g/ml (Corning) qui a polymérisé 30 min à 37°C. Les HUVEC ont ensuite été déposées sur le Matrigel à raison de $3 \cdot 10^4$ cellules dans 500 μ L de milieu complet. Après une incubation de 16h à 37°C dans un incubateur à 5% de CO₂, les puits ont été photographiés et la longueur totale du réseau formé a été mesurée en utilisant le logiciel ImageJ.

Test d'adhésion. Les cellules MC3T3-E1 différenciées ont étéensemencées à $1 \cdot 10^4$ cellules par puits de P96 dans des plaques FluoroNunc blanches traitées pour la culture cellulaire (Thermo Fisher Scientific) dans de l' α -MEM complet supplémenté en acide ascorbique à 50 μ g/mL (Sigma-Aldrich) et en β -glycérophosphate à 10 mM (Sigma-Aldrich). Trois jours plus tard, les lignées cancéreuses exprimant la luciférase (B02 F11 Luc N13, Hs578T Luc2) ont été traitées pendant 1h avec les anticorps. Parallèlement, les cellules MC3T3-E1 ont été rincées au PBS (Life technologies) et $2 \cdot 10^5$ cellules cancéreuses resuspendues dans 100 μ L de milieu basal ont été ajoutées dans chaque puits. Après 18h d'incubation, les puits ont été rincés de nouveau au PBS pour éliminer les cellules non-adhérentes et 20 μ L de tampon de lyse 1X (Promega) ont été ajoutés directement sur les cellules. Le niveau de luciférase émise a ensuite été quantifié au luminomètre suite à l'injection de 50 μ L de luciférine (Luciferase Assay System Promega).

Tests d'invasion et de migration. Les expériences en chambre de Boyden modifiée ont été réalisées à l'aide d'une plaque 24 puits de culture cellulaire contenant des inserts avec des pores de 8 μ m de diamètre (Corning). Pour les tests d'invasion cellulaire, les inserts ont été

préalablement coatés avec 100 μL de Matrigel réduit en facteurs de croissance à 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Corning) qui a polymérisé 90 min à 37°C. Les cellules tumorales ($1,6 \cdot 10^5$ cellules/mL) ont été remises en suspension dans un milieu de culture contenant 0,1% (p/v) d'albumine de sérum bovin et 300 μL de cette suspension cellulaire ont été chargés dans la partie supérieure tandis que 750 μL de chimioattractant (milieu de culture supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau foetal) ont été ajoutés dans la partie inférieure. Pour les expériences avec les anticorps, les cellules ont été pré-traitées 1h à 37°C avant d'être déposées sur le matrigel. Après 24 d'incubation à 37°C sous 5% de CO_2 , les cellules non migrantes ont été retirées et celles ayant migré ont été fixées et colorées au cristal violet. Afin de quantifier le nombre de cellules, les inserts ont été dissous dans 200 μL d'acide acétique 10% (v/v) et 150 μL de cette solution ont été utilisés pour une lecture à $\text{DO} = 570 \text{ nm}$. Pour les tests de migration un protocole similaire a été mis en place : $5 \cdot 10^5$ HUVEC ont été chargées dans la chambre supérieure contenant uniquement l'insert tandis que 750 μL de chimioattractant (milieu de culture supplémenté avec 2% (v/v) de SVF) ont été ajoutés dans la chambre inférieure. L'ensemble a été incubé 16h à 37°C sous 5% de CO_2 .

Biologie moléculaire

Cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein. Les patientes ont été sélectionnées selon les critères suivants : tumeur primaire du sein sans caractéristique inflammatoire ni de traitement antérieur. Les patientes ont été incluses dans la cohorte entre octobre 1994 et octobre 2001 et proviennent de trois centres médicaux (Centre Hospitalier Annecy Genevois, Centre Hospitalier Lyon Sud, Clinique Mutualiste Saint-Etienne). Deux groupes de patientes ont été définis selon l'envahissement ganglionnaire : ganglion lymphatique sain pNo ($n = 117$) ou atteinte ganglionnaire pN+ ($n = 137$). Les biopsies de tissu, obtenues par chirurgie, ont été immédiatement stockées dans l'azote liquide. L'extraction des ARN totaux a été réalisée en utilisant le réactif Trizol (Sigma). Afin de supprimer toute contamination par de l'ADN génomique les ARN totaux ont été traités à la DNase I et purifiés sur micro-colonnes RNeasy (Qiagen). Les probabilités de survie ont été estimées selon la méthode de Kaplan-Meier et comparées par le test de log-rank. L'analyse univariée a été réalisée en utilisant la régression de Cox.

RT-PCR semi-quantitative. Les ARN totaux ont été extraits à partir de cellules en culture à l'aide du kit NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant. La transcription inverse a été réalisée à partir d'un μg d'ARN totaux en utilisant le kit de synthèse d'ADNc iScript (Biorad). La PCR en temps réel semi-quantitative a été effectuée sur un système Mastercycler Realplex2 (Eppendorf) en utilisant du SYBR Green (Life technologies) ainsi que les amorces adéquates humaines ou murines à 0,5 μM dans des plaques 96 puits (Eppendorf) selon le programme suivant : 2 minutes à 95°C suivie de 40 cycles de 15 secondes à 95°C, 15 secondes à T_m (voir tableau) et 20 secondes à 72°C. L'expression des différents gènes étudiés a été

normalisée avec l'expression du gène codant pour la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP). L'analyse a ensuite été faite par la méthode des $\Delta\Delta Ct$ (quantification relative normalisée par un rapport à un gène de ménage).

Amorces humaines

Gène	Référence NCBI	Séquences amorce	Taille de l'amplicon	Tm
<i>hROBO1</i>	NM_002941.3	F- TCATTgTggTTgTTGCCAgT	312 pb	63°C
	NM_133631.3	R- ACCTgTgTCACCTgAggAC	339 pb	
	NM_001145845.1			
<i>hROBO2</i>	NM_001128929.2	F- CAgACTTgCCAAGAggAAgg	204 pb	61°C
	NM_002942.4	R- CTgTTCgACCTTgAgCAACA		
<i>hROBO3</i>	NM_022370.3	F- ACATCTCCAACCTCAgCgAg	133 pb	61°C
		R- TAgCgTCCTCCggTCCTAC		
<i>hROBO4</i>	NM_019055.5	F- TTCCAgCTCAgACAgCCTCT	123 pb	67°C
		R- AgTggggAACTgTTggCAT		
<i>hSLIT2</i>	NM_004787.1	R- CCTgCCTATCAAATCCgTgT	313 pb	61°C
		F- gggCAAaggCATgTgTAgTT		
<i>hTBP</i>	NM_003194.4	F- ATACCgTgCTgCTATCTgg	254 pb	61°C
	NM_001172085.1	R- TgTgTCTggCACAgAAATAAC		

Amorces murines

Gène	Référence NCBI	Séquences amorce	Taille de l'amplicon	Tm
<i>mCol1a1</i>	NM_007742.3	F- CACCCCAgCCgCAAAGAgT R- CgggCAgAAAgCACAgCACT	301 pb	58°C
<i>mOcn</i>	NM_007541.3	F- TgACAAAgCCTTCATgTCCA R- gAgAggACAgggAggATCAA	277 pb	64°C
	NM_001037939.2			
	NM_001032298.2			
	NM_031368.4			
<i>mSlit2</i>	NM_178804.3	F- CTTgCCTAgAgCgTCAAACC	203 pb	64°C
		R- gCACTCCACACCCATTCT		
<i>mSlit3</i>	NM_011412.3	F- AggCgTCACAggCgTgAAgAA	182 pb	61°C
		R- TggAgTgTAgACGCAGAgTCC		
<i>mTbp</i>	NM_013684.3	F- CCTTgTACCCCTCACCAATgAC	119 pb	61°C à 64°C
		R- ACAgCCAagATTACggTAgA		
<i>mUnc5b</i>	NM_029770.2	F- CACAgACACACAgCCATgTC R- ATACCCCTTgAgggACAgg	167 pb	65°C

Western-blot. Les cellules en culture ont été lysées dans un tampon RIPA (Sigma) additionné d'inhibiteurs de protéases (1 mM de sodium orthovanadate, 50 mM de fluorure de sodium, 1 mM de PMSF et 1 μ g/mL d'aprotinine et de leupeptine). Les lysats ont été incubés 15 minutes sur glace avant d'être centrifugés à 18 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a été récolté et les protéines dosées à l'aide du kit DC protein Assay (Biorad). Les extraits protéiques (20 μ g) ont été dénaturés à 95°C pendant 5 minutes avant d'être séparés sur un gel SDS-PAGE de concentration en polyacrylamide de 8,5% puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (Millipore) via un système de transfert liquide pendant 1h à 200V. Les membranes ont été saturées 1h à température ambiante dans du TBS-T 0,02% + 5% de lait écrémé puis incubées 1h avec les anticorps primaires dirigés contre ROBO1 (Abcam ab7279 ; 1/500), ROBO4 glycosylé (R&D MAB24541 ; 1/500), ROBO4 non glycosylé (Abcam ab103674 ou Thermo Fisher PA5-

25023 ; 1/500), α -tubuline (Sigma-Aldrich T5168 ; 1/5000). Après 30 minutes de rinçage dans du TBS-T 0,02% les membranes ont été incubées 1h avec les anticorps secondaires anti-souris (GE Healthcare ; NA931) ou anti-lapin (GE Healthcare ; NA934) couplés au peroxyde de raifort (HRP). La révélation est effectuée grâce à un kit de détection de chimioluminescence (ECL) (Biorad).

Construction de protéines de fusion Fc. Les ADNc ont été synthétisés par reverse transcription à l'aide de la M-MLV RT (Promega) à partir d'ARN totaux de cellules MDA-MB-231 (pour la forme humaine) et de 4T1 (pour la forme murine). Puis les ADNc codant pour la partie extra-cellulaire des récepteurs ROBO4 et UNC5B ont été amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques : [(NM_019055.5 aa Q28-A477): *hROBO4* sens TGT CAC GAA TTC GAT TCA GGA CTC CCC GCC CCA G; *hROBO4* anti-sens GCT TAC AAC CAG ATC GTG CAA CAC CGC AGG TGG C ; [(NM_NM_029770.2 aa G27-Y377): *mUnc5b* sens TGT CAC GAA TTC GAT AGG CGT TGA CTC TGC TGG C; *mUnc5b* anti-sens GCT TAC AAC CAG ATC CGT ACA GTG CCA CAT CTC C] et clonées par recombinaison homologue dans le plasmide pFUSE-mIgG1-Fc2 (InvivoGen) à l'aide du kit In-Fusion HD Cloning (Clontech). La purification des protéines recombinantes par chromatographie d'affinité sur protéine A a été confiée à l'entreprise Biotem.

Expérimentation animale

Test de micrométastases dans la moelle osseuse *ex vivo*. Toutes les expériences menées sur les souris ont été effectuées suite à un avis favorable émis par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale de l'Université Claude Bernard Lyon1. Les injections intra-tibiales (IT) ont été réalisées chez des souris femelles BALB/c nude âgées de 4 semaines. Après anesthésie fixe, un trou a été percé dans le tibia des animaux en utilisant une aiguille de 26G, puis à l'aide d'une seringue Hamilton 15 μ L d'une suspension de 10^5 cellules Bo2 pré-traitées 1h avec un anticorps anti-ROBO4 (Abcam ab103674) ou un istotype contrôle (R&D AB-105-C) ont été injectées directement dans la cavité médullaire du tibia. Les souris ont été mises à mort 2 semaines après l'injection et les fémurs et tibias ont été prélevés et découpés à l'aide d'un scalpel. Afin de digérer la matrice osseuse, les broyats d'os ont été incubés dans 1,5 mL de collagénase/hyaluronidase 1X (StemCell) pendant 2h à 37°C sous agitation (110 rpm) puis filtrés sur tamis cellulaire 100 μ m. Les cellules de la moelle osseuse ainsi recueillies ont été mises en culture dans du milieu complet supplémenté de 2 μ g/mL de blasticidine (Life technologies) et 800 μ g/mL de G418 (Life technologies). Après 2 semaines de culture, les colonies de cellules tumorales ont été fixées et colorées au cristal violet puis comptées. Les injections intra-artérielles (IA) ont également été réalisées chez des souris femelles BALB/c nude âgées de 4 semaines. Les cellules ($5 \cdot 10^5$ cellules dans 100 μ L de PBS) ont été injectées dans l'artère caudale de souris anesthésiées. Les souris ont été mises à mort 1 semaine après l'injection et le même protocole décrit précédemment a été mis en place.

Analyse statistique. La différence statistique entre les groupes a été évaluée par le test t de Student non apparié, ou par le test de Mann-Whitney en utilisant le logiciel Excel ou Graphpad PRISM4. Les données ont été présentées sous forme de moyenne \pm écart-type (SD). Des valeurs p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives (*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001).

C- Résultats

1- Implication du récepteur ROBO4 dans la formation des métastases osseuses

L'expression de ROBO4 est associée à la rechute clinique du cancer du sein.

Lors de précédents travaux du laboratoire, une sous-population de la lignée cellulaire de cancer mammaire humain MDA-MB-231, dénommée MDA-MB-231/Bo2 et qui métastase spécifiquement à l'os a été sélectionnée. A l'aide de puces GeneChips Affymetrix A et B U133, nous avons comparé les profils d'expression génique des cellules MDA-MB-231 et Bo2 et avons constaté que les cellules Bo2 expriment une signature génétique spécifique qui comprend les gènes des familles *ROBO/SLIT*. Plus précisément, les cellules ostéotropiques Bo2 présentent une surexpression des récepteurs ROBO1 et ROBO4, par rapport aux cellules de la lignée cellulaire parentale MDA-MB-231 (Thèse Vincent Gonin).

		n	<i>ROBO1/TBP</i>			<i>ROBO4/TBP</i>		
			faible	élevé	p	faible	élevé	p
Statut ménopausal	Pré	147	77	70	0,45	82	65	0,08
	Post	107	50	57		47	60	
Type histologique	ductal	208	104	104	0,782	111	97	0,013
	lobulaire	37	17	20		11	26	
Taille de la tumeur	< 20 mm	103	60	43	0,05	52	51	0,99
	> 20 mm	143	64	79		73	70	
Grade histologique	GI	27	15	12	0,740	15	12	0,121
	GII	110	52	58		52	58	
	GIII	58	28	30		37	21	
Envahissement ganglionnaire	négatif	117	66	51	0,133	74	43	< 0,001
	1-3	83	35	48		39	44	
	> 3	54	26	28		16	38	
Statut RE	négatif	42	15	27	0,063	22	20	0,954
	positif	212	112	110		107	105	
Statut RPg	négatif	55	26	29	0,761	30	25	0,633
	positif	199	101	98		99	100	

Tableau 10 : Cohorte des Hospices Civils de Lyon (n=254)

Association de l'expression de *ROBO1* ou *ROBO4* avec des caractéristiques cliniques et biologiques chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. Les valeurs de p permettent la comparaison des groupes de faible (< 50% quartile) et forte (> 50% quartile) expression en utilisant le test de Chi2.

Pour étudier l'association de l'expression de ROBO1 et ROBO4 avec l'issue du cancer du sein, nous avons examiné le niveau d'expression de ROBO1 et ROBO4 au niveau de la tumeur primaire dans une cohorte de 254 patientes atteintes d'un cancer du sein qui ne présentaient aucun signe de métastases au moment du diagnostic et pour lesquelles aucun traitement n'était encore initié. Nous n'avons pas observé de corrélation entre le statut de ROBO1 et les diverses caractéristiques cliniques et biologiques des tumeurs primaires (Tableau 10). A l'inverse, nous avons identifié une corrélation statistiquement significative entre l'expression de ROBO4 et le statut ganglionnaire ($p < 0,001$) : de forts niveaux d'expression de ROBO4 dans les tumeurs primaires étant plus fréquemment observés chez les patientes présentant plus de trois ganglions lymphatiques positifs (Tableau 10).

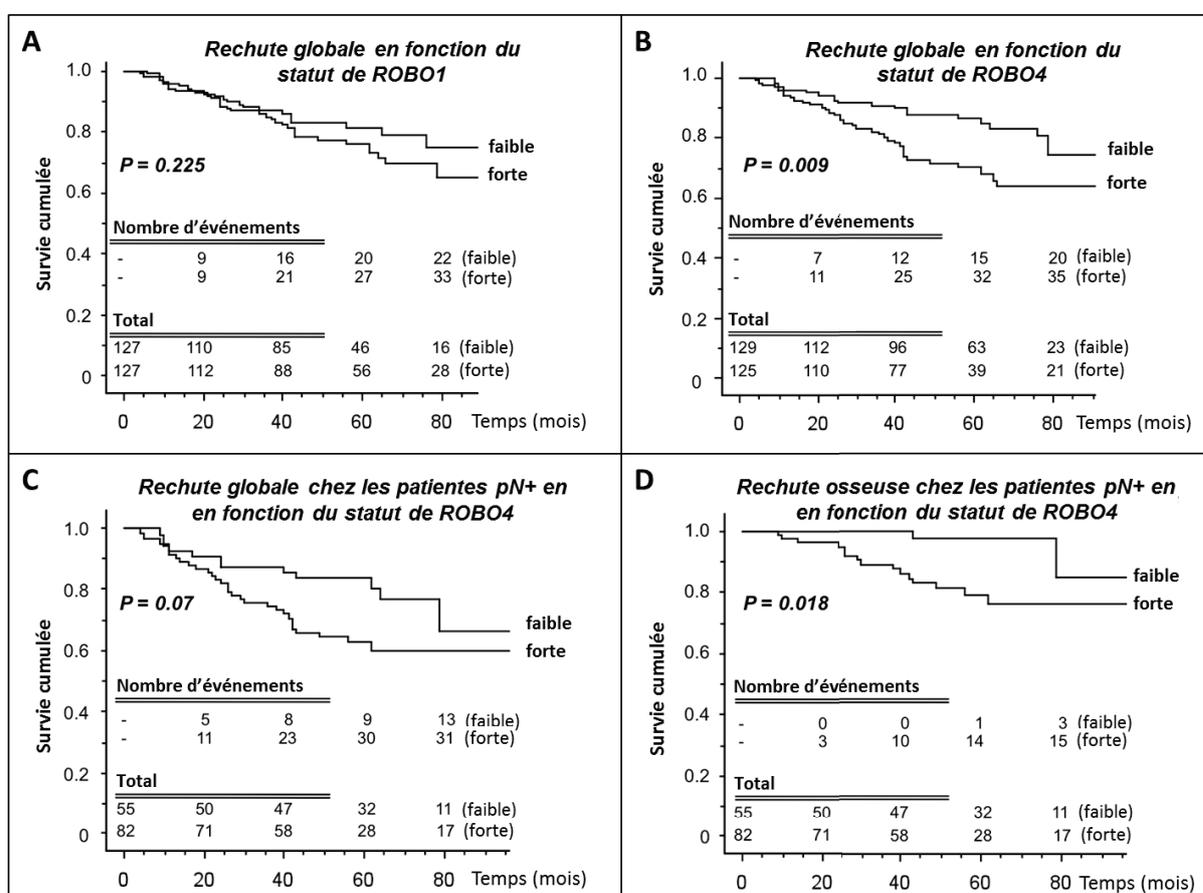


Figure 39 : Association de l'expression de ROBO1 ou ROBO4 avec la rechute clinique du cancer du sein

Estimations des taux de survie sans rechute, par la méthode de Kaplan-Meier, chez 254 patientes atteintes de cancer du sein, selon le statut de ROBO1 (A) ou ROBO4 (B). Taux de survie sans récurrence globale (C) ou osseuse (D) chez 137 patientes atteintes de cancer du sein avec invasion des ganglions lymphatiques (pN+), selon le statut de ROBO4.

Pour définir les valeurs pronostiques de l'expression de ROBO1 et ROBO4 dans le cancer du sein, les courbes de survie ont été estimées en utilisant la méthode de Kaplan-Meier. Les taux de survie sans récurrence ne diffèrent pas significativement entre les groupes exprimant des niveaux

élevés ou faibles de ROBO1 (Figure 39A). A l'inverse, le nombre de rechutes, à un suivi médian de 54 mois, dans le groupe avec un fort taux d'expression de ROBO4 est deux fois plus élevé que dans le groupe à faible niveau de ROBO4 (32 rechutes contre 15, respectivement, $p = 0,009$ par le test de log-rang) (Figure 39B). Le fait qu'il existe une corrélation significative entre l'expression de ROBO4 et le statut ganglionnaire (Tableau 10), nous a amenés à vérifier si le statut des ganglions pouvait être un facteur confondant. Chez les patientes avec des ganglions non envahis (pNo), l'expression de ROBO4 n'est pas liée au risque de métastases (données non montrées). A l'inverse, lorsque l'analyse est limitée aux patientes présentant des ganglions lymphatiques positifs (pN+), les niveaux élevés de ROBO4 sont liés à la rechute métastatique en général (Figure 39C ; $p = 0,07$ par test de log-rank) et corrélent avec la rechute métastatique à l'os (Figure 39D, $P = 0,018$ par test de log-rank). Par conséquent, une forte expression de ROBO4 corrèle avec un pronostic défavorable.

L'inhibition de Robo4 réduit la croissance tumorale primaire mais ne diminue pas la formation de métastases osseuse à long terme.

Deux protocoles *in vivo* ont été réalisés au laboratoire pour mieux évaluer le rôle du récepteur Robo4 dans la formation des métastases osseuses du cancer du sein (Thèse Bénédicte Eckel). Tout d'abord, pour déterminer l'existence d'un lien entre l'expression de ROBO4 et la croissance tumorale dans la glande mammaire de la souris, les taux endogènes de ROBO4 dans les cellules cancéreuses humaines du sein Bo2, ont été diminués de façon stable, en utilisant la stratégie de l'interférence ARN (Figure 40A). Un pool de cellules Bo2 déplétées pour ROBO4 (clones Sh2.6 et Sh4.5) ainsi qu'un pool de clones contrôles (Sc1.2 et Sc2.2) ont ensuite été implantés orthotopiquement dans la glande mammaire de souris immunodéficientes. L'analyse des tumeurs ShROBO4 montre alors que la taille tumorale primaire moyenne est diminuée de 3 fois rapport à celle des tumeurs ScROBO4 (Figure 40A). De plus, les mêmes cellules ont été utilisées pour caractériser le rôle de ROBO4 dans la formation des métastases osseuses. Les cellules déplétées ou non en ROBO4 ont été injectées dans l'artère caudale de souris immunodéficientes. En utilisant ce modèle animal, l'analyse radiographique, 28 jours après l'injection des cellules tumorales, révèle que l'étendue des lésions ostéolytiques dans les membres postérieurs des animaux porteurs de tumeurs ShROBO4 est faiblement mais significativement augmentée par rapport aux souris portant les tumeurs contrôles ScROBO4 (Figure 40B). Cependant, l'analyse histomorphométrique des membres postérieurs présentant des métastases montre que les rapports BV/TV, indiquant la destruction osseuse, et TB/STV, mesurant la charge tumorale osseuse, ne diffèrent pas de façon statistiquement significative entre les deux groupes d'animaux (Figure 40B). Ces observations soulignent le rôle spécifique de ROBO4, exprimé par les cellules cancéreuses, dans la croissance tumorale primaire mais ne permettent pas d'impliquer ROBO4 dans la formation des métastases osseuses à long terme. En effet, de manière surprenante alors que le volume des tumeurs primaires est beaucoup plus faible pour les clones ShROBO4 nous ne

retrouvons pas cette différence au niveau de la formation des métastases osseuses après 1 mois de suivi des animaux.

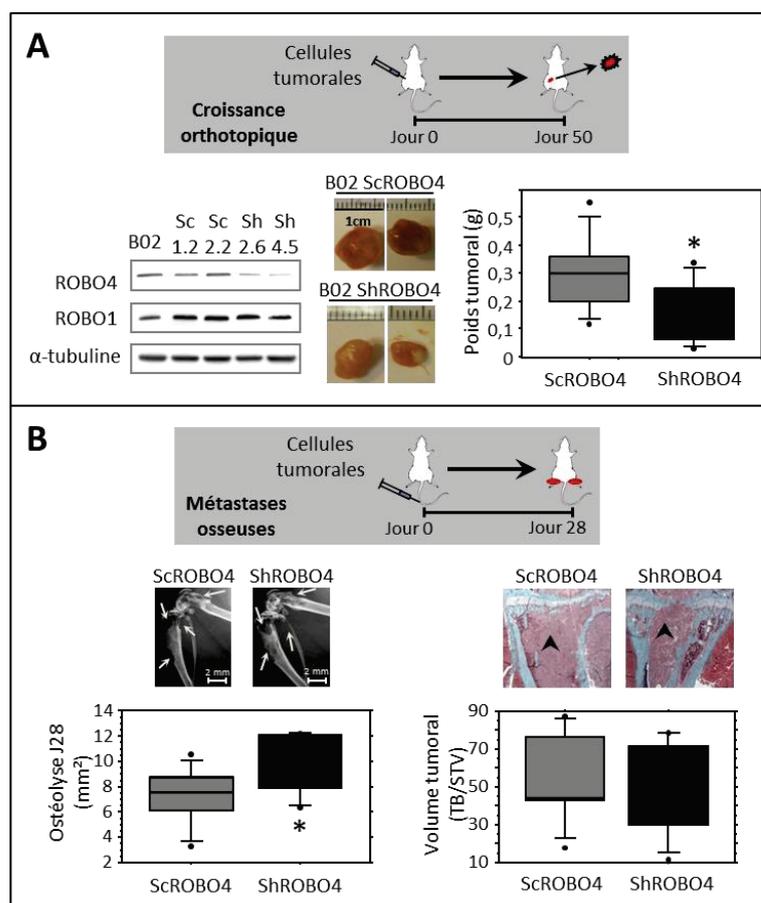


Figure 40 : Effet de l'inhibition de l'expression du récepteur ROBO4 sur la croissance orthotopique de tumeurs mammaires et sur la formation de métastases osseuses à long terme chez la souris

A. L'inactivation de l'expression de ROBO4 dans les cellules Bo2 par la stratégie d'ARN interférence est vérifiée par western-blot avant injection des cellules Bo2 Sc/ShROBO4 (10^6 cellules) dans la glande mammaire de souris ($n=8$). Les animaux ont été sacrifiés 50 jours après l'injection et les tumeurs pesées. Des images représentatives de tumeurs sont montrées pour chaque groupe. **B.** Les cellules Bo2 Sc/ShROBO4 ($5 \cdot 10^5$ cellules) ont été inoculées dans l'artère caudale de souris ($n=8$). Les animaux ont été sacrifiés 28 jours après l'inoculation des cellules tumorales, les lésions osseuses, indiquées par des flèches, ont été analysées par radiographie (panel de gauche), la charge tumorale et le volume osseux par histologie (panel de droite). * $p < 0,05$ comparé au groupe ScROBO4.

L'inhibition de ROBO4 réduit la survie et la prolifération des cellules cancéreuses dans la moelle osseuse.

L'invasion et l'ancrage des cellules tumorales dans la moelle osseuse se produit à un stade très précoce du processus de formation des métastases osseuses. Cependant, l'apparition de lésions osseuses n'est parfois observée que 10 ans après la mise en évidence d'un cancer du sein. Bien que l'inhibition de ROBO4 diminue de façon drastique la croissance tumorale primaire, soulignant

ainsi le rôle crucial de ce récepteur dans ce processus, de manière surprenante, à long terme l'inactivation de ROBO4 dans les cellules B02 ne conduit pas à une différence significative dans la formation des métastases osseuses. Cependant, il a été montré qu'*in vitro* les cellules B02 ShROBO4 envahissent moins que les cellules B02 ScROBO4 (Thèse Bénédicte Eckel), nous avons donc émis l'hypothèse que ces récepteurs pourraient faciliter la prise de greffe de cellules tumorales dans le micro-environnement de la moelle osseuse. Pour répondre à cette question, les cellules cancéreuses B02 Sc ou ShROBO4 ont été injectées dans l'artère caudale des animaux. Les souris ont ensuite été sacrifiées 7 jours après l'inoculation des cellules tumorales, date à laquelle aucune métastase n'est encore détectée par radiographie ou par bioluminescence. La moelle osseuse des membres postérieurs de ces animaux a ensuite été récupérée et mise en culture sous sélection antibiotique, ce qui a permis la croissance sélective des cellules tumorales résistantes aux antibiotiques. En comparaison avec les souris inoculées avec des cellules B02 ScROBO4, le nombre de colonies de cellules tumorales dans la moelle osseuse de souris inoculées avec des cellules ShROBO4 a été réduit de 83% (Figure 41A).

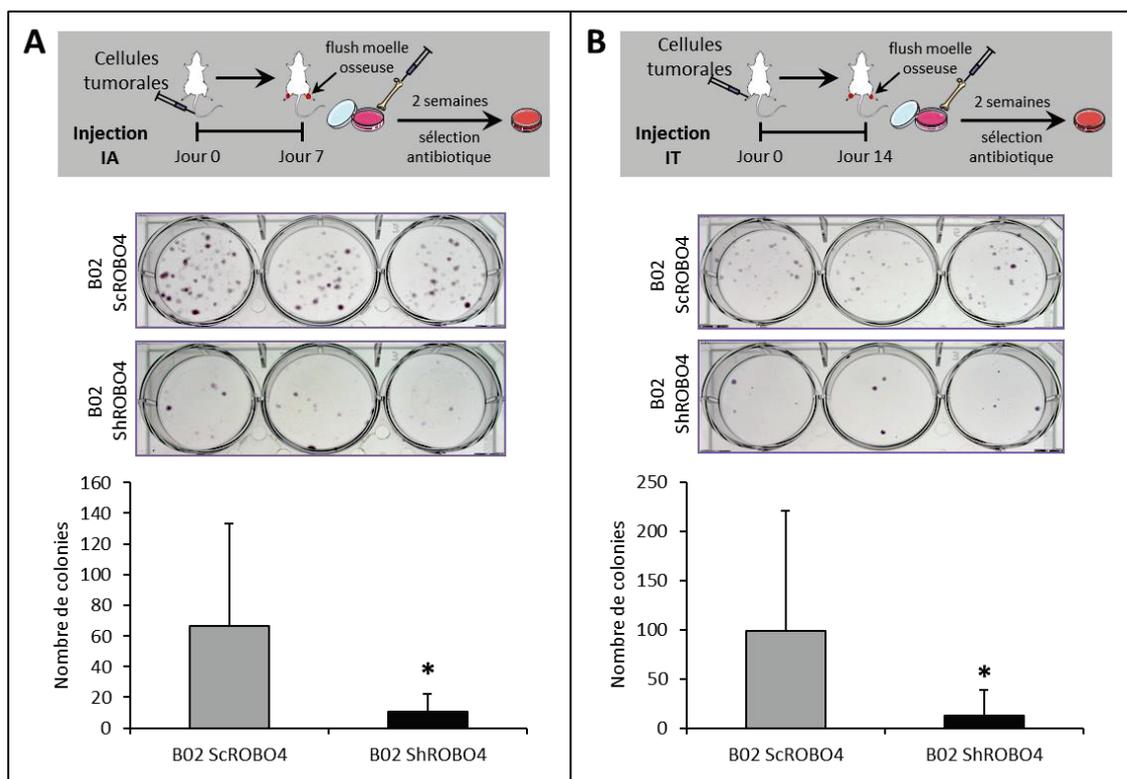


Figure 41 : Colonisation de la moelle osseuse par les cellules B02

A. Les cellules B02 Sc/ShROBO4 ($5 \cdot 10^5$ cellules) ont été injectées dans l'artère caudale de souris ($n=10$). Sept jours après l'inoculation des cellules, les animaux ont été sacrifiés et les membres postérieurs récoltés. Les cellules de moelle osseuse obtenues ont été cultivées sous sélection antibiotique ce qui permet la croissance sélective des cellules cancéreuses résistantes aux antibiotiques. Les colonies de cellules tumorales ont été fixées et colorées au cristal violet puis comptées. Des images représentatives de chaque groupe sont présentées. **B.** Les cellules B02 Sc/ShROBO4 ($1 \cdot 10^5$ cellules) ont été injectées directement dans la cavité médullaire du tibia de souris ($n=10$). Quatorze jours après l'inoculation des cellules, les animaux ont été sacrifiés et le même protocole que pour A. a été mis en place. * $p < 0,05$ comparé au groupe ScROBO4.

De plus, lorsque les cellules tumorales sont directement inoculées dans la cavité de la moelle osseuse du tibia, le nombre de colonies ShROBO4 présentes dans la moelle osseuse a été réduit de 86% par rapport à celui observé pour les cellules ScROBO4 (Figure 41B). Ainsi, ROBO4 semble nécessaire à la nidation et peut-être à la survie des cellules cancéreuses du sein dans la moelle osseuse, jouant ainsi un rôle essentiel dans les étapes précoces de formation des métastases osseuses.

2- Mise en évidence et caractérisation de deux isoformes de ROBO4

Analyse des niveaux de ROBO4 dans les lignées de cancers du sein.

Afin d'élargir nos observations à d'autres lignées de cancer du sein et d'établir un état des lieux des niveaux de transcrits et de protéines dans les différentes lignées de carcinomes mammaires disponibles au laboratoire nous avons évalué cela par RT-PCR et western-blot. Nous disposons au laboratoire de plusieurs lignées de cancer du sein représentant les grandes familles moléculaires de carcinomes mammaires. En effet, nous avons pu travailler sur une autre lignée triple négative, les cellules Hs578T, qui comme les cellules MDA-MB-231 n'expriment ni les récepteurs hormonaux (ER et PR) ni l'oncoprotéine HER2. Nous possédons également une lignée HER2, les cellules SK-BR-3, qui surexpriment HER2 et un ensemble de lignées luminales : MCF7, T-47D, ZR-75-1 (luminal A) et BT-474 (luminal B).

Lignées	ROBO1		ROBO2		ROBO3		ROBO4		SLIT2	
	2 ^{-ΔΔCt}	Ct								
MDA-MB-231	1 ± 0,03	22,9	1 ± 0,04	33,8	1 ± 0,5	35,2	1 ± 0,29	26,6	1 ± 0,12	25,2
Hs578T	3 ± 0,14	21,4	79 ± 8,6	27,7	0,04 ± 0,02	39,9	0,17 ± 0,05	29,8	1,14 ± 0,06	25,1
SK-BR-3	0,32 ± 0,03	25,1	1,4 ± 0,33	34,0	nd	nd	0,04 ± 0,01	31,4	0,01 ± 0,004	32,9
MCF7	0,12 ± 0,01	25,2	0,08 ± 0,01	37,6	0,72 ± 0,47	34,9	0,12 ± 0,02	29,7	0,15 ± 0,004	27,2
T-47D	0,41 ± 0,02	23,8	59 ± 3,4	27,5	2,7 ± 0,65	33,2	0,16 ± 0,01	30,1	nd	nd
ZR-75-1	0,59 ± 0,01	25,1	12,5 ± 2,9	31,7	4,5 ± 1,36	34,4	0,12 ± 0,07	30,6	0,03 ± 0,02	31,8
BT-474	0,35 ± 0,02	24,7	12,6 ± 0,9	30,4	2,0 ± 1,1	34,5	0,11 ± 0,09	29,9	0,21 ± 0,01	27,6

Figure 42 : Analyse des taux de transcrits de ROBO1, ROBO2, ROBO3, ROBO4 et SLIT2 dans des lignées de carcinomes mammaires.

La présence des transcrits a été déterminée par RT-PCR semi-quantitative puis normalisée avec l'expression du gène codant pour la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP) et comparée au niveau dans les cellules MDA-MB-231.

ROBO1 est surexprimé dans les lignées triples négatives (MDA-MB-231 et Hs578T) tandis que les niveaux de ROBO2 et ROBO3 sont anecdotiques dans la plupart des lignées testées (excepté ROBO2 pour les cellules Hs578T et T-47D) (Figure 42). Quant à la quantité de protéine, nous avons (i) confirmé la surexpression de ROBO1 et ROBO4 dans les cellules Bo2 comparées aux différentes lignées de carcinomes mammaires, (ii) montré la présence de ces deux récepteurs de guidage axonal dans la majorité des carcinomes mammaires (Figure 43). Ces observations confirment notamment la présence de ROBO1 et ROBO4 en quantité importante dans les cancers dits « triples négatifs » et considérés comme plus agressifs.

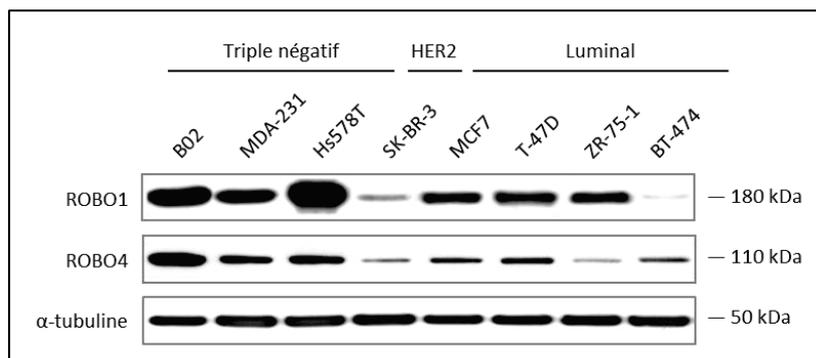


Figure 43 : Analyse des niveaux d'expression des protéines ROBO1 et ROBO4 dans des lignées de carcinomes mammaires.

La quantité de protéine a été déterminée par western-blot et l'α-tubuline a été utilisée comme contrôle interne.

La surexpression de ROBO4 dans les lignées humaines de cancer du sein aboutit à la production d'une forme de haut poids moléculaire de ROBO4.

Afin de confirmer l'implication de ROBO4 dans la formation des métastases osseuses, nous avons surexprimé ROBO4 par transduction dans six lignées humaines de carcinomes mammaires représentant la diversité moléculaire de ce cancer (cellules MDA-MB-231 et Hs578T pour représenter les cancers triples négatifs, cellules SK-BR-3 pour les cancers HER2⁺ et MCF7, T-47D et ZR-75-1 pour les cancers luminaux). Dans le but d'éviter un effet clonal nous avons choisi de transduire les cellules avec un vecteur lentiviral et d'obtenir ainsi une population hétérogène de cellules exprimant la forme humaine de ROBO4.

Suite à la transduction avec un vecteur lentiviral, l'ARNm de ROBO4 humain est fortement détecté dans toutes les lignées cellulaires transduites avec le vecteur pLPCX/hROBO4 comparées à celles transduites avec le vecteur vide pLPCX (Figure 44A). De manière surprenante, le niveau protéique de ROBO4 ne varie pas dans les lignées transduites lorsque nous utilisons l'anticorps anti-ROBO4 qui reconnaît la protéine de 110 kDa dans les cellules Bo2 (Figure 44B), taille correspondant à la masse moléculaire attendue en fonction de la taille en nucléotides de la séquence codante de ROBO4 utilisée pour la construction dans le vecteur pLPCX et publiée dans les bases de données génomiques. Par contre la présence de ROBO4 est détectée en abondance avec un second anticorps dans les cellules transduites avec le vecteur contenant le transgène indiquant que la construction utilisée est bien fonctionnelle (Figure 44B). Cependant, avec ce second anticorps la protéine ROBO4 n'est plus observée à sa taille attendue (110 kDa) mais à un poids moléculaire plus élevé (160 kDa). Des expériences de cytométrie en flux réalisées à l'aide de ce second anticorps confirment les observations réalisées avec ce même anticorps en western-blot et montrent que la protéine ROBO4 est fortement détectée dans les lignées transduites avec le vecteur contenant le transgène démontrant que la protéine ROBO4 est correctement produite et acheminée à la membrane (Figure 44C). Cette isoforme surexprimée de ROBO4 de haut poids moléculaire suggère une possible modification post-traductionnelle. De manière intéressante,

aucun signal à ce poids moléculaire n'est observé dans les cellules B02, alors que dans les cellules endothéliales HUVEC, les deux formes de ROBO4 sont détectées.

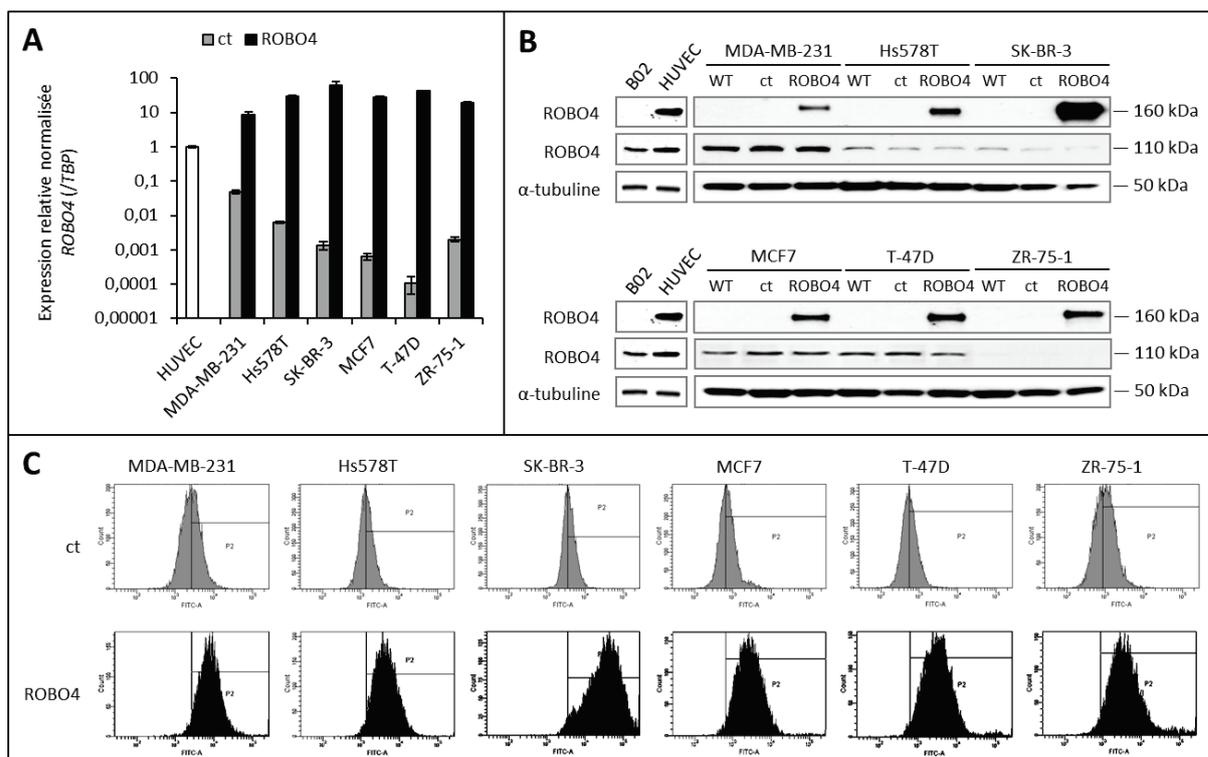


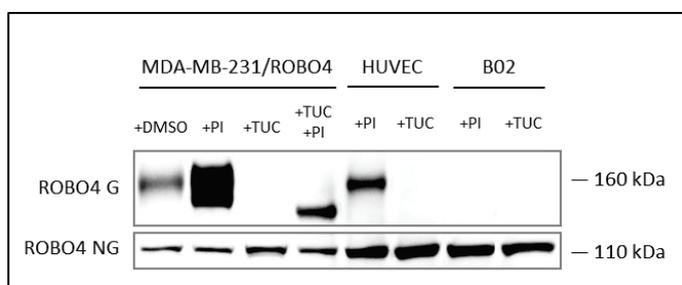
Figure 44 : Analyse du taux des transcrits et de la protéine ROBO4 dans les lignées humaines de cancer du sein transduites.

A. La présence des transcrits de ROBO4 a été déterminée par RT-PCR semi-quantitative entre les cellules contrôles (transduites avec le vecteur pLPCX) et les cellules surexprimant ROBO4 (transduites avec le vecteur pLPCX/hROBO4). L'ensemble a été comparé au niveau dans les cellules endothéliales HUVEC et représenté par un graphe logarithmique. **B.** La présence de la protéine ROBO4 a été examinée par western blot, dans les cellules parentales (WT), transduites avec le vecteur vide (ct) ou bien le vecteur contenant l'ADNc de ROBO4 (ROBO4) à l'aide de deux anticorps dirigés contre ROBO4. Des cellules endothéliales HUVEC ont été utilisées comme contrôle positif. **C.** La présence de la protéine ROBO4 à la membrane a été confirmée par cytométrie de flux.

La forme de haut poids moléculaire de ROBO4 correspond à la forme glycosylée de ROBO4.

Au regard des résultats précédents, nous avons émis l'hypothèse que la différence de masse moléculaire observée en western-blot pouvait résulter d'une modification post-traductionnelle de la protéine ROBO4. Sur la base de la séquence de l'ADNc de ce récepteur, quatre sites potentiels de N-glycosylation dans la partie extracellulaire ont été décrits (Huminięcki et al., 2002). Cependant, l'existence d'une isoforme glycosylée de ROBO4 n'a pas été décrite à ce jour. En conséquence, des cellules MDA-MB-231 surexprimant ou non le récepteur humain ROBO4 ont été traitées à la tunicamycine, un antibiotique qui bloque les premières étapes de la N-

glycosylation, afin d'observer son effet sur la synthèse des isoformes de ROBO4 à 110 et 160 kDa. Le traitement des cellules à la tunicamycine provoque la perte du signal à 160 kDa, suggérant qu'une glycosylation est à l'origine du haut poids moléculaire observé en western-blot. Cependant, l'accumulation de la protéine à une masse moléculaire de 110 kDa, n'est pas modifiée par le traitement par la tunicamycine. Par contre, le co-traitement des cellules avec de la tunicamycine et des inhibiteurs du protéasome (MG132 et lactacystine) montre une accumulation d'une forme intermédiaire ce qui nous permet de dire que i) l'inhibition de la glycosylation entraîne la dégradation de la protéine ROBO4 par le protéasome et ii) la N-glycosylation n'est pas la seule modification post-transcriptionnelle puisque nous observons une forme intermédiaire et non l'accumulation de la forme non glycosylée à faible poids moléculaire (110 kDa) comme attendue (Figure 45).



Les cellules de la lignée MDA-MB-231 surexprimant la protéine ROBO4 ont été traitées pendant 19h soit par de la tunicamycine (TUC) (un inhibiteur de la N-glycosylation), soit par des inhibiteurs de protéasome (IP), soit par de la tunicamycine et des inhibiteurs de protéasome (TUC + IP), soit par du DMSO.

Figure 45 : Caractérisation de la glycosylation du récepteur ROBO4.

Mise en place de tests fonctionnels pour les anticorps anti-ROBO4.

Pour détecter ces deux isoformes de ROBO4 nous utilisons différents anticorps (résumé dans la Figure 46) : les anticorps A1 ou A2 nous permettent de reconnaître la forme non glycosylée de ROBO4 à 110 kDa (ROBO4 NG) et l'anticorps B la forme glycosylée à 160 kDa (ROBO4 G). Ces anticorps nous ont permis d'observer que la forme non glycosylée de ROBO4 était présente, à des niveaux plus ou moins élevés, dans la plupart des lignées de cancers du sein testées au laboratoire mais que la forme glycosylée était exclusivement exprimée par les HUVEC (Figure 44B).

Nom	Fournisseur	Référence	Isoforme reconnue	Antigène	Technique
A1	Abcam	ab103674	Non glycosylée (NG) 110 kDa	Peptide synthétique	WB, IHC
A2	Thermo Fisher	PA5-25023	Non glycosylée (NG) 110 kDa	Peptide synthétique	WB, FC
B	R&D	MAB24541	Glycosylée (G) 160 kDa	Protéine recombinante	WB, FC, IHC

Figure 46 : Tableau récapitulatif des différents anticorps anti-ROBO4 utilisés

WB : western-blot, IHC : immunohistochimie, FC : cytométrie de flux.

- Dans les cellules endothéliales : modèle HUVEC

Suite à ces observations, nous avons choisi d'utiliser les cellules HUVEC qui expriment les deux formes de ROBO4 pour tester l'impact de ces différents anticorps sur la capacité migratrice de ces cellules (Figure 47A). En effet, la migration des cellules endothéliales induite par ROBO4 a été décrite durant le développement (Sheldon et al., 2009)(Kaur et al., 2006). A l'aide de la littérature nous avons relevé différentes possibilités pour les tests de migration utilisant des HUVEC. Tout d'abord, il a fallu déterminer si un coating de la chambre supérieure avec de la fibronectine était nécessaire à la migration des HUVEC. Nous avons constaté que l'utilisation de fibronectine n'était pas un choix judicieux vu le nombre réduit de cellules migrantes dans les puits avec de la fibronectine par rapport aux puits sans fibronectine (Figure 47B). De plus, le choix du chimioattractant a également été réfléchi : dans la littérature, du VEGF ou du SVF était régulièrement utilisé. Le VEGF n'a pas permis d'activer la migration des HUVEC, nous avons donc choisi de poursuivre nos tests avec 2% de SVF (Figure 47B). La concentration idéale de SVF a également été déterminée (données non montrées). Pour finir, différentes concentrations cellulaires ont été utilisées dans le but d'obtenir des puits lisibles avec des cellules individualisées et non en amas. Nous avons décidé de travailler par la suite avec $5 \cdot 10^4$ cellules par puits (Figure 47C).

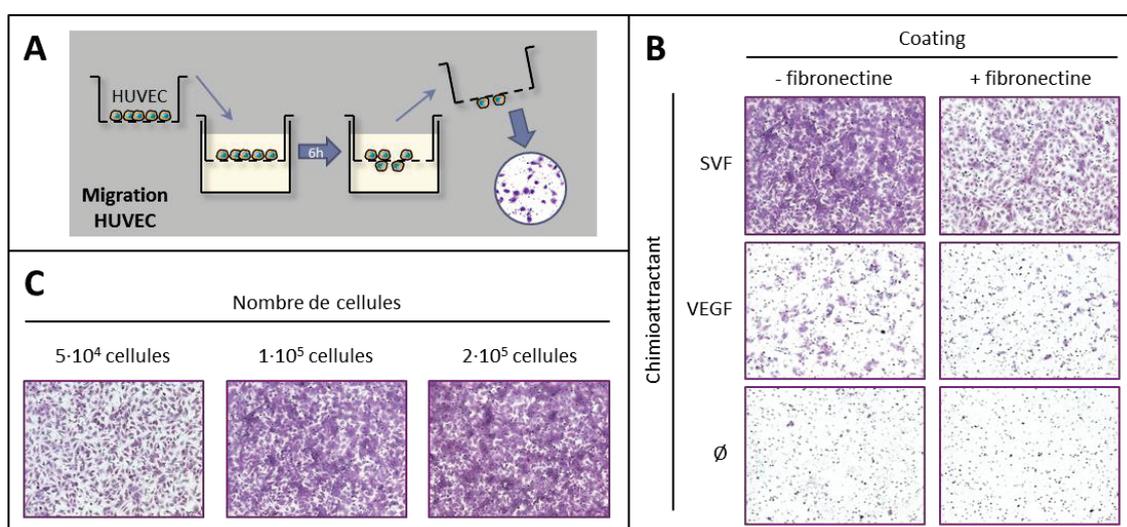


Figure 47 : Mise au point des tests de migration par les HUVEC.

Principe des tests de migration réalisés à l'aide de chambres de Boyden modifiées (A). L'intérêt d'un coating à la fibronectine ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) et le choix du chimioattractant ont été déterminés (SVF 2% ou VEGF $10 \text{ ng}/\text{mL}$) (B) ainsi que le nombre de cellules (C).

Un autre test fonctionnel a également été mis en place : la formation de pseudo-capillaires par les HUVEC (Figure 48A). Cette expérience est plus délicate à mettre en oeuvre car elle demande des cellules endothéliales primaires en phase exponentielle à un faible passage et présente une fenêtre d'observation précise aux alentours de 16h après l'incubation des cellules. Une fois ces

conditions réunies il a fallu déterminer le nombre de cellules nécessaires pour former un réseau abouti mais sans amas cellulaires au niveau des inter-connexions. A la suite de trois essais de concentrations cellulaires différentes, nous avons choisi de poursuivre avec $8 \cdot 10^4$ cellules par condition (Figure 48B). A la fin des expériences de formation de pseudo-capillaires, les puits ont été photographiés et le réseau formé par les HUVEC analysé *via* ImageJ grâce à une macro mise au point à l'aide d'un ingénieur du Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (CIQLE) (Figure 48C). Cette analyse a permis de quantifier la densité du réseau formé.

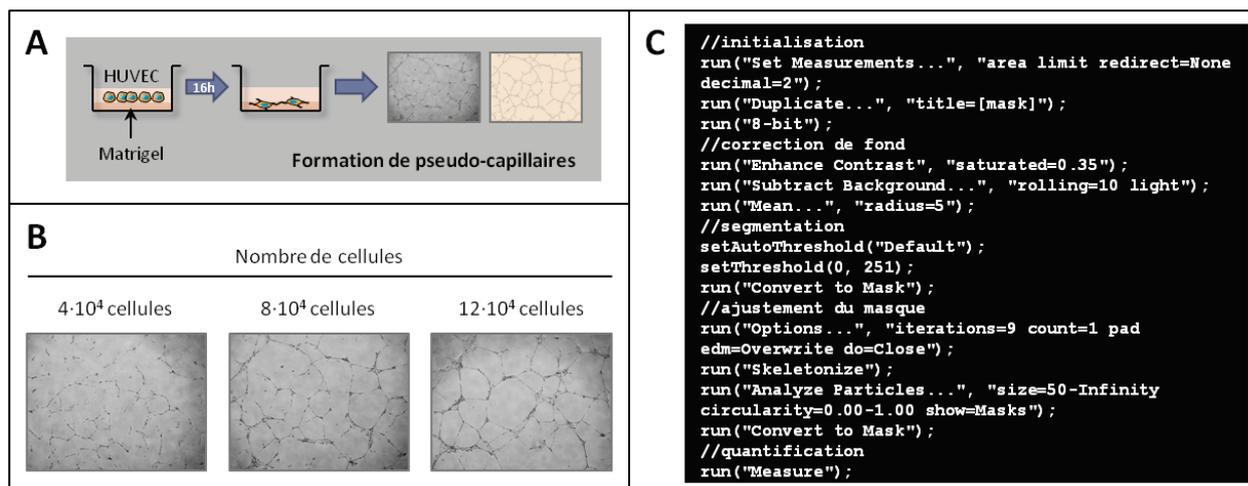


Figure 48 : Mise au point du test de formation de pseudo-capillaires par les HUVEC.

Principe de la formation de pseudo-capillaires observée 16h après le dépôt des HUVEC sur une fine couche de matrigel (A). Le nombre de cellules à déposer a été déterminé et les photographies des différents puits ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ afin de quantifier la densité du réseau (B) La macro créée spécialement pour le traitement des photographies est présentée ci-dessus (C).

- Dans la niche ostéoblastique : modèle MC3T3-E1

Les travaux réalisés sur les HUVEC permettent d'évaluer l'impact d'un anticorps anti-ROBO4 dans un système endothélial où ROBO4 joue un rôle dans la migration des cellules. De plus, ce modèle a l'avantage d'exprimer les deux isoformes de ROBO4 caractérisées précédemment (glycosylée et non glycosylée). Cependant, afin de confirmer les premiers travaux sur l'implication du récepteur ROBO4 dans la formation des métastases osseuses et notamment dans l'ancrage des cellules tumorales dans le microenvironnement osseux, nous nous sommes tournés vers les cellules cancéreuses B02 et leur interaction avec les cellules ostéoblastiques MC3T3-E1. En effet, nous avons émis l'hypothèse que lorsque les cellules tumorales métastatiques arrivent dans la cavité médullaire elles s'ancraient dans la niche osseuse d'une manière similaire aux cellules souches hématopoïétiques, c'est-à-dire en interagissant, notamment avec les ostéoblastes (Taichman, 2005)(Lévesque et al., 2010)(Calvi et al., 2003).

C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé des tests d'adhésion avec les cellules MC3T3-E1 qui sont des cellules murines pré-ostéoblastiques dont il est nécessaire de provoquer la différenciation à l'aide d'acide ascorbique et de β -glycérophosphate (Figure 49A). L'augmentation des niveaux de transcrits de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I (*Col1a1*) et d'ostéocalcine (*Ocn*) a été confirmée par RT-PCR dans les cellules MC3T3 après 14 jours de différenciation comparées aux cellules non différenciées (Figure 49B). Nous avons également évalué la différenciation des pré-ostéoblastes en déterminant leur capacité à former une matrice minérale détectable au rouge d'alizarine (Figure 49B).

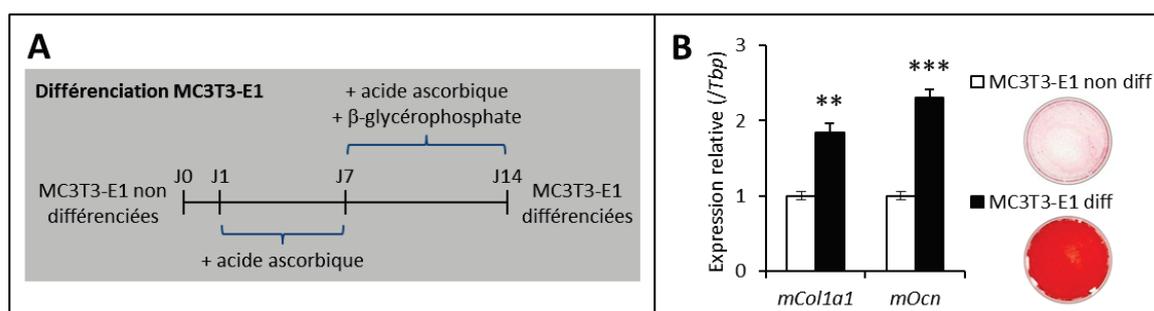


Figure 49 : Différenciation des cellules pré-ostéoblastiques murines MC3T3-E1 en lignée ostéoblastique mature.

A. La différenciation des cellules pré-ostéoblastiques murines MC3T3 est induite par traitement à l'acide ascorbique seul (50 μ g/mL) puis en combinaison avec du β -glycérophosphate (10 mM) selon le protocole présenté ci-dessus. **B.** La différenciation est confirmée par l'analyse des taux de transcrits *Col1a1* et *Ocn* par RT-PCR et par coloration au rouge d'alizarine. $^{**}p < 0,005$ comparé au groupe MC3T3-E1 non différenciées.

Caractérisation de l'adhésion des cellules tumorales B02 sur les cellules ostéoblastiques.

Par la suite, nous avons utilisé ce même protocole pour différencier les cellules MC3T3-E1 et les utiliser pour des tests d'adhésion. Pour réaliser ces essais, nous avons formé un tapis ostéoblastique de cellules différenciées avant d'ajouter un nombre connu de cellules tumorales luciférase⁺ et de déterminer 18h après le nombre de cellules qui ont adhéré aux cellules MC3T3 grâce à la luminescence émise par les cellules cancéreuses (Figure 50A). Nous avons pu remarquer que les cellules tumorales n'adhéraient pas naturellement au plastique des plaques d'adhésion mais bien aux cellules ostéoblastiques. En effet, après 18h dans du milieu basal les cellules cancéreuses ne parvenaient pas à adhérer au plastique et formaient de petits amas de cellules éliminés au rinçage contrairement aux cellules B02 en contact avec les cellules MC3T3 (Figure 50B). De plus, la mesure de la luminescence a confirmé ces observations puisque 18h après l'incubation des cellules B02 seuls les puits contenant les B02 sur les MC3T3 ont donné une valeur au luminomètre (Figure 50C). Ces expériences nous ont permis i) d'observer l'étalement des cellules B02 sur le tapis ostéoblastiques et ii) de confirmer l'adhésion des cellules B02 grâce à la luminescence émise par ces dernières.

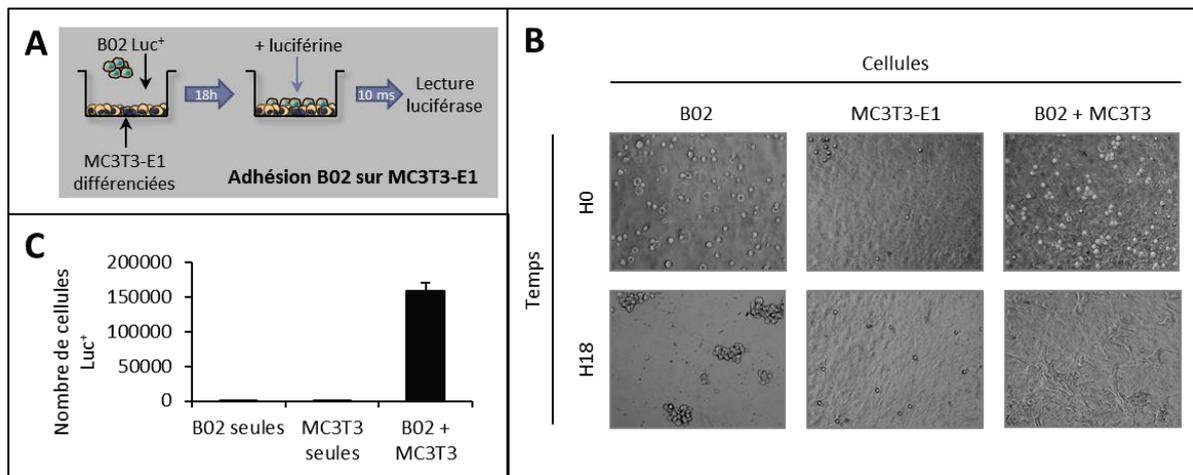


Figure 50 : Mise au point du test d'adhésion des cellules tumorales B02 sur les cellules ostéoblastiques murines MC3T3-E1.

A. L'adhésion des cellules tumorales B02 Luc⁺ sur le tapis cellulaire ostéoblastique est mesurée 18h après l'ajout des cellules cancéreuses par mesure de l'émission bioluminescente. **B.** Des photographies représentatives des puits pour les différentes conditions ont été réalisées au début de l'expérience (H0) et à la fin (H18). **C.** Le nombre de cellules tumorales B02 Luc⁺ est déterminé par lecture au luminomètre.

La mise aux points de ces différents essais que ce soit dans un modèle endothélial (HUVEC) qui exprime les deux isoformes de ROBO4 ou dans un modèle tumoral (B02) qui exprime exclusivement la forme non glycosylée de ROBO4 nous a permis par la suite de tester l'effet de nos différents outils et notamment celui des trois anticorps commerciaux ciblant ROBO4 (Figure 46) sur la migration, l'invasion, la formation de pseudo-capillaires et l'adhésion.

Le ciblage de l'isoforme non glycosylée de ROBO4 bloque l'invasion des cellules tumorales et inhibe l'adhésion des cellules B02 aux cellules ostéoblastiques MC3T3.

Le ciblage des différentes isoformes a été réalisé par pré-traitement durant 1h des cellules endothéliales avec soit l'anticorps A1 qui reconnaît ROBO4 non glycosylé, soit l'anticorps B qui se fixe à l'isoforme glycosylée, soit un isotype contrôle. De manière intéressante, lorsque l'isoforme non glycosylée de ROBO4 est ciblée (anticorps A1) cela inhibe fortement la migration des HUVEC alors qu'avec l'anticorps ciblant la forme glycosylée de ROBO4 (anticorps B) le nombre de cellules qui a migré est similaire au nombre de cellules migrant dans les conditions contrôles (cellules non traitées ou cellules traitées avec l'isotype) (Figure 51A).

Il a été décrit récemment que la production d'anticorps monoclonaux anti-ROBO4 par la souris suite à une vaccination inhibe l'angiogenèse dans un modèle sous-cutané d'éponge (Suchting et al., 2005). C'est pourquoi nous avons testé l'anticorps anti-ROBO4 A1, qui inhibe la migration des HUVEC, sur la formation de pseudo-capillaires. Comme attendu, l'anticorps A1

diminue le réseau de pseudo-capillaires après 18h d'incubation des HUVEC sur une couche de matrigel (Figure 51B).

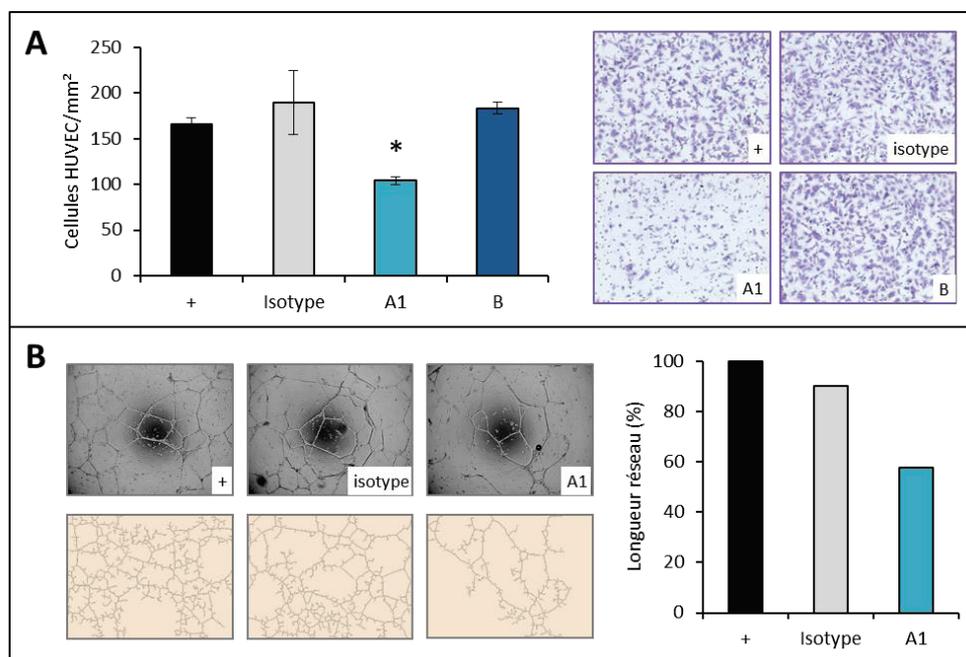


Figure 51 : Effet du ciblage des isoformes de ROBO4 sur la migration des HUVEC et la formation de pseudo-capillaires.

A. Effets des anticorps anti-ROBO4 A1 et B à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur la capacité des HUVEC à migrer en chambre de Boyden modifiée. Des photographies représentatives de chaque concentration d'anticorps anti-ROBO4 sont présentées. **B.** Effet de l'anticorps anti-ROBO4 A1 à la concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur la formation d'un réseau par les HUVEC. Les cellules ont été incubées 16h sur une couche de matrigel puis les photographies des différents puits ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ afin de quantifier la densité du réseau. * $p < 0,05$ comparé aux cellules HUVEC non traitées (+).

Ces résultats encourageants dans les cellules endothéliales HUVEC nous ont amenés à tester ces mêmes anticorps dans notre modèle cellulaire B02. Nous avons donc utilisé les deux anticorps reconnaissant la forme non glycosylée de ROBO4 (anticorps A1 et A2) ainsi que l'anticorps ciblant la glycoforme de ROBO4 (anticorps B) pour déterminer leurs effets sur la capacité invasive des cellules B02. En comparaison à l'anticorps B qui ne module pas l'invasion des cellules, les anticorps A1 et A2 montrent tous deux un effet inhibiteur sur ce processus (Figure 52A) de la même manière que pour la migration des HUVEC (Figure 51A). Nous avons également réalisé des tests d'adhésion afin de déterminer l'effet de ces trois anticorps sur la capacité des cellules B02 à s'ancrer sur un tapis de cellules ostéoblastiques MC3T3. De manière similaire, les anticorps A1 et A2 diminuent fortement l'ancrage (-74%) des cellules sur le tapis ostéoblastique contrairement à l'anticorps B qui n'a aucun effet (Figure 52B).

Ainsi, le ciblage de la forme non glycosylée de ROBO4 semble le plus pertinent pour bloquer la migration et l'ancrage des cellules ce qui laisse penser que cette isoforme correspond à une forme

"agressive" du récepteur. Les cellules B02 n'expriment que la forme non glycosylée du récepteur ROBO4, au détriment de la forme glycosylée de ROBO4, favorisant ainsi la migration, l'invasion et l'ancrage dans la niche métastatique.

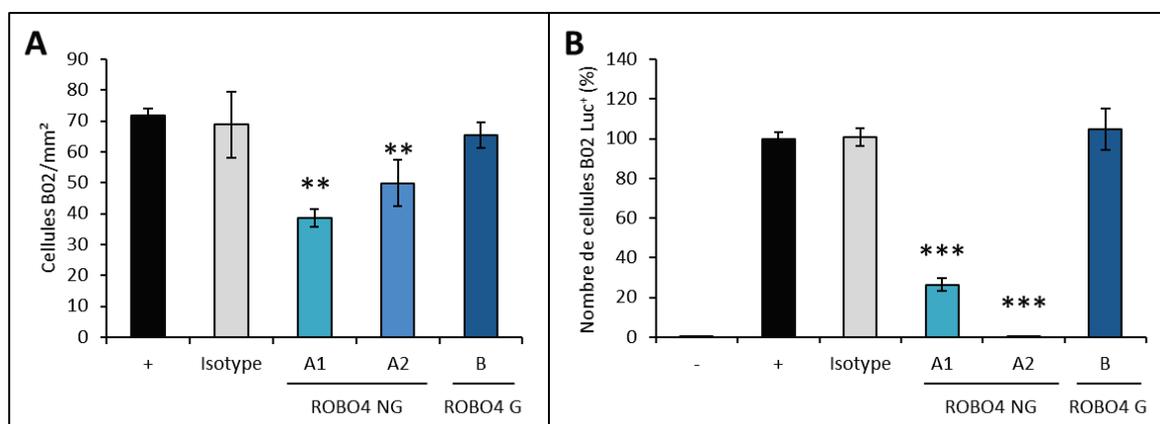


Figure 52 : Effet du ciblage des isoformes de ROBO4 sur l'invasion des cellules B02 et l'adhésion aux cellules ostéoblastiques MC3T3-E1.

Effets des anticorps anti-ROBO4 A1, A2 et B à 10 µg/mL sur la capacité des cellules B02 à envahir en chambre de Boyden modifiée (A) et à adhérer aux cellules ostéoblastiques murines MC3T3-E1 (B). $p^{**} < 0,05$ et $***p < 0,001$ comparé aux cellules B02 non traitées (+).

Afin d'élargir nos observations à une autre lignée tumorale, nous avons choisi de vérifier l'effet inhibiteur de l'anticorps anti-ROBO4 A1 sur les cellules Hs578T Luc+. Cette lignée cancéreuse montre un niveau moins important de ROBO4 comparé aux cellules B02 (Figure 43) et fait partie, comme les cellules MDA-MB-231 et les B02, des cancers du sein dits « triples négatifs » (ER-, PR-, HER2-). De la même manière que pour les cellules B02, l'anticorps anti-ROBO4 A1 inhibe l'adhésion aux cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 de façon dose-dépendante (Figure 53). Ce résultat confirme que l'utilisation d'un anticorps anti-ROBO4 peut bloquer l'adhésion des cellules tumorales aux ostéoblastes.

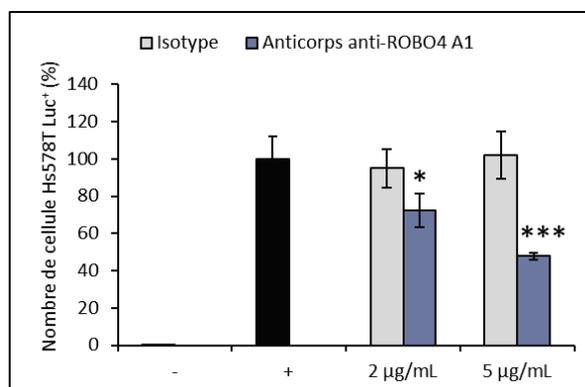


Figure 53 : Effet du ciblage de ROBO4 sur l'adhésion des cellules Hs578T aux cellules ostéoblastiques MC3T3-E1.

Effet de l'anticorps anti-ROBO4 A1 à 2 et 5 µg/mL sur la capacité des cellules Hs578T à adhérer aux cellules ostéoblastiques murines MC3T3-E1. $*p < 0,05$ et $***p < 0,001$ comparé aux cellules Hs578T non traitées (+).

3- Ciblage de la forme non glycosylée de ROBO4 et du microenvironnement osseux

L'utilisation d'un anticorps anti-ROBO4 bloque l'invasion des cellules tumorales *in vitro* et l'ancrage dans l'environnement osseux *in vivo*.

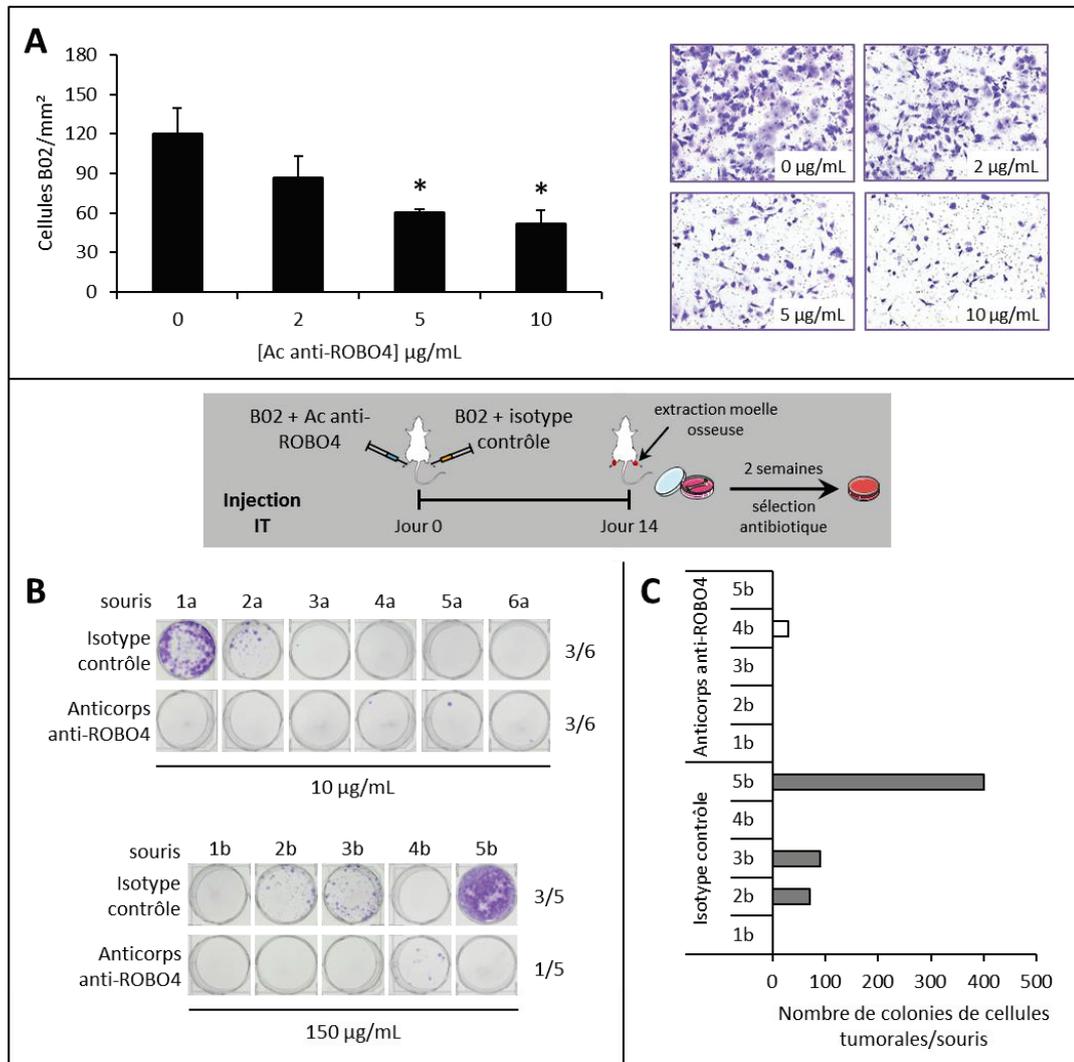


Figure 54 : Effets du ciblage par un anticorps anti-ROBO4 sur l'invasion et l'ancrage dans la moelle osseuse des cellules tumorales B02

A. Effets de concentrations croissantes d'anticorps anti-ROBO4 sur l'invasion des cellules cancéreuses ostéotropiques B02. Des photographies représentatives de chaque concentration d'anticorps anti-ROBO4 sont présentées. * $p < 0,05$, comparé aux cellules B02 non traitées (0 µg/mL). **B.** et **C.** Effet de doses croissantes d'anticorps anti-ROBO4 sur la colonisation osseuse des cellules ostéotropiques B02 comparé à un isotype contrôle. Les cellules B02 pré-traitées 1h avec un anticorps anti-ROBO4 ou un isotypique contrôle ont été injectées ($1 \cdot 10^5$ cellules) directement dans la cavité médullaire du tibia de souris ($n=5$). Quatorze jours après l'inoculation des cellules, les animaux ont été sacrifiés et les membres postérieurs récoltés. Les cellules de moelle osseuse obtenues ont été cultivées sous sélection antibiotique ce qui permet la croissance sélective des cellules cancéreuses résistantes aux antibiotiques. Les colonies de cellules tumorales ont été fixées et colorées au cristal violet (**A**) puis dénombrées (**B**).

Afin de confirmer les résultats obtenus avec les cellules Bo2 ShROBO4, nous avons évalué les conséquences du ciblage de ROBO4 par un anticorps anti-ROBO4 sur l'invasion des cellules cancéreuses parentales Bo2. Suite aux travaux exposés précédemment sur les différentes isoformes de ROBO4 et la mise en évidence d'une forme non glycosylée et agressive de ROBO4 nous avons choisi de travailler avec l'anticorps anti-ROBO4 A1 dirigé contre cette forme. Comparé au traitement avec un isotype contrôle, le traitement des cellules Bo2 avec l'anticorps anti-ROBO4 inhibe l'invasion de façon dose-dépendante en présence de concentrations croissantes d'anticorps (Figure 54A). Afin de confirmer cette observation *in vivo*, nous avons testé l'effet de cet anticorps anti-ROBO4 sur l'ancrage dans l'os des cellules Bo2. Pour ce faire, les cellules Bo2 ont été préalablement incubées 1h avec deux concentrations (10 µg/mL et 150 µg/mL) d'anticorps anti-ROBO4 ou d'isotype contrôle puis injectées respectivement dans les tibias droits ou gauches de souris immunodéprimées. Quatorze jours après l'injection, les cellules de la moelle osseuse ont été extraites et mises en culture en présence d'un antibiotique permettant de sélectionner les cellules tumorales résistantes. Les résultats présentés ci-dessus montrent qu'à faible concentration l'incidence de développement de clones cellulaires est identique lorsque les cellules injectées sont traitées par l'anticorps anti-ROBO4 ou par l'anticorps isotypique (3/6 vs 3/6) alors qu'à une forte concentration de 150 µg/mL le développement de clones cellulaires est observé chez 3 souris parmi les 5 qui ont reçu des cellules traitées par l'isotype contrôle tandis qu'une seule des souris ayant reçu des cellules traitées par l'anticorps anti-ROBO4 a développé des clones cellulaires (Figure 54B). En outre, à 150 µg/mL le nombre de clones cellulaires obtenus est beaucoup plus important lors d'un traitement des cellules par l'anticorps isotypique par comparaison au nombre obtenu lorsque les cellules avaient été traitées par l'anticorps anti-ROBO4 (Figure 54C). Ces résultats montrent qu'un anticorps ciblant ROBO4 ralentit l'ancrage des cellules Bo2 dans la moelle osseuse et confirment donc les résultats obtenus avec l'injection des cellules dépletées en ROBO4.

SLIT2 est produit par le microenvironnement de moelle osseuse métastatique.

Afin d'identifier les molécules impliquées dans l'ancrage des cellules tumorales Bo2 dans l'environnement osseux nous nous sommes intéressés aux ligands des récepteurs roundabout. D'une part à SLIT2 et SLIT3, ligands naturels du récepteur ROBO1 mais dont la liaison avec ROBO4 est controversée. Et d'autre part à UNC5B un autre récepteur de guidage axonal dont l'interaction avec ROBO4 a récemment été décrite. Par RT-PCR nous avons observé que les ARNm *Slit2* et *Unc5b* sont produits par les ostéoblastes mais pas par les ostéoclastes (Figure 55A), ce qui suggère que les ostéoblastes sont la principale source de SLIT2 et d'UNC5B dans les lésions métastatiques osseuses. De plus, afin de préciser le rôle des ostéoblastes dans la production de SLIT2, SLIT3 et UNC5B nous avons réalisé des co-cultures d'ostéoblastes murins différenciés MC3T3-E1 et de cellules tumorales Bo2. puis déterminé le niveau d'expression de ces trois gènes dans les cellules ostéoblastiques L'interaction directe des cellules cancéreuses sur les

cellules MC3T3-E1 conduit à l'augmentation du niveau d'expression de *Slit2* mais pas de *Slit3* et d'*Unc5b* par les cellules ostéoblastiques (Figure 55B). L'addition du milieu conditionné provenant des cellules B02 sur les cellules MC3T3-E1 différenciées provoque également une augmentation du niveau d'expression de *Slit2* ce qui indique qu'un facteur diffusible produit par les cellules tumorales active l'expression de ce gène (Figure 55C). L'ensemble de ces observations montre que la présence des cellules tumorales dans le microenvironnement osseux entraîne la surexpression de *Slit2* par les ostéoblastes, principales cellules composant l'os. Ces observations confirment un résultat précédent obtenu au laboratoire où une augmentation des niveaux d'ARNm murins *Slit2* dans la moelle osseuse des animaux métastatiques injectés avec des cellules humaines de cancer du sein comparé à des animaux non injectés avaient été observée (données non montrées Thèse Vincent Gonin).

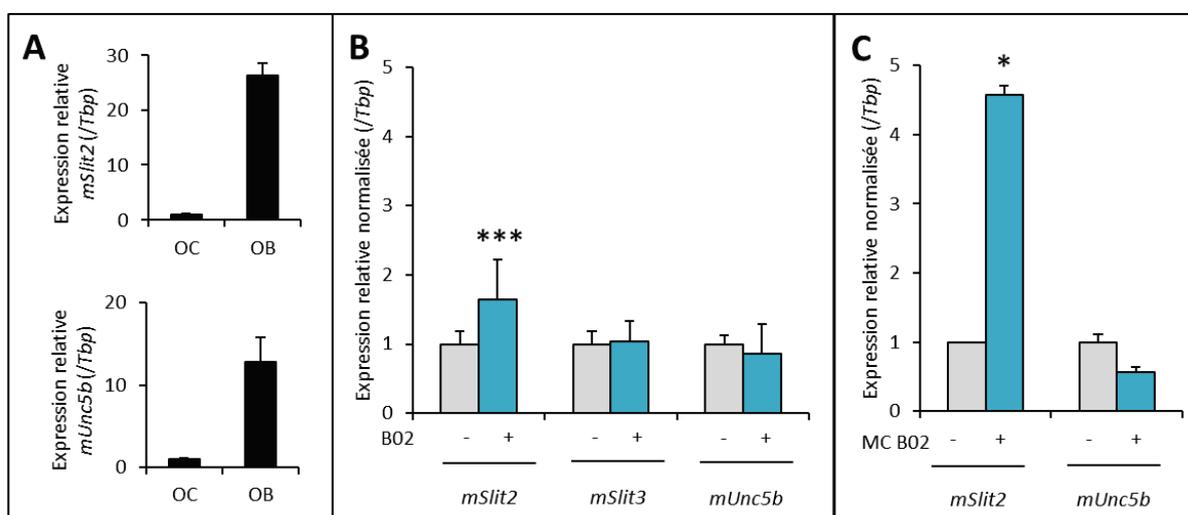


Figure 55 : Analyse du taux d'expression des transcrits *Slit2*, *Slit3* et *Unc5b* dans l'environnement osseux murin

A. Expression de *Slit2* et *Unc5b* dans les ostéoclastes (OC) et les ostéoblastes (OB) de souris. Les niveaux d'expression relatifs de *Slit2* sont exprimés en fonction de ceux exprimés dans les ostéoclastes. **B.** et **C.** Evaluation de l'expression par RT-PCR semi-quantitative en temps réel de *Slit2*, *Slit3* et *Unc5b* dans les cellules MC3T3-E1 mises en présence pendant 10 jours de cellules B02 (**B**, n=9) ou des milieux conditionnés extraits des cellules B02 (**C**, n=3). * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ comparé aux MC3T3 seules.

L'axe SLIT2/ROBO4 est nécessaire à l'adhésion des cellules B02 sur les cellules ostéoblastiques murines MC3T3-E1.

Au vu des résultats précédents, nous avons émis l'hypothèse que l'ancrage des cellules B02 dans la moelle osseuse était favorisé par la production de SLIT2 par les ostéoblastes. Pour confirmer notre hypothèse, nous avons utilisé le test d'adhésion des cellules B02 F11 Luc N13 sur un tapis de cellules ostéoblastiques MC3T3 différenciées. D'une part, nous avons pré-traité pendant 1h les cellules MC3T3 avec un anticorps anti-SLIT2 ou un anticorps anti-UNC5B avant d'ajouter les cellules B02 afin de piéger les ligands potentiels produits par les ostéoblastes.

D'autre part, nous avons pré-traité les cellules B02 directement avec un anticorps anti-ROBO4 pour bloquer les récepteurs à la surface des cellules tumorales. Nous avons observé une diminution dose-dépendante du nombre de cellules B02 adhérentes aux ostéoblastes suite au traitement avec un anticorps anti-ROBO4 comparé au traitement avec un isotype contrôle (Figure 56A). De manière similaire, le traitement des cellules MC3T3 avec un anticorps anti-SLIT2 perturbe l'ancrage des cellules B02 (Figure 56B) alors qu'un anticorps anti-UNC5B n'a aucun effet sur le nombre de cellules capable d'adhérer aux cellules MC3T3 (Figure 56C). Ces résultats confirment le rôle crucial de ROBO4 dans l'ancrage des cellules tumorales dans la niche endostéale *via* leur interaction avec les ostéoblastes, et également que la production de SLIT2 par les ostéoblastes serait l'un des éléments clés permettant l'arrêt des cellules dans l'environnement osseux.

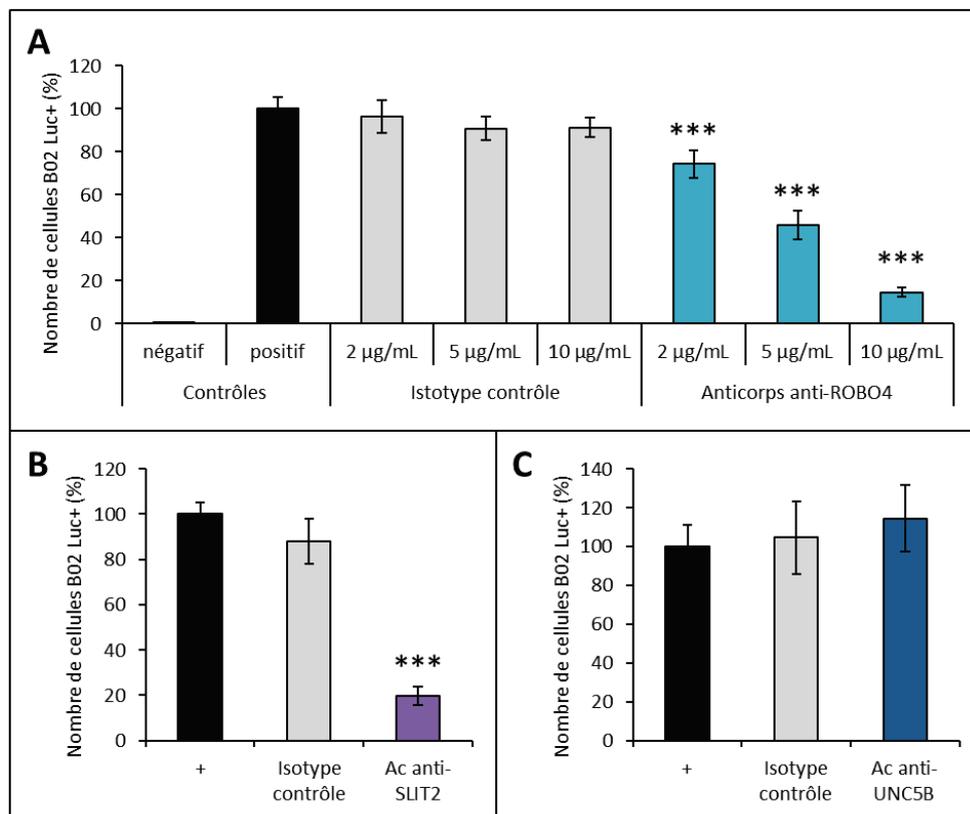


Figure 56 : Effet du ciblage par des anticorps sur l'adhésion des cellules tumorales B02 sur les cellules ostéoblastiques MC3T3-E1

Après 18h d'incubation des cellules B02 luciférase⁺ sur un tapis cellulaire d'ostéoblastes murins MC3T3-E1 différenciés, la luminescence émise par les cellules B02 a été mesurée au luminomètre. Avant l'incubation des cellules des prétraitements ont été réalisés, soit pour les cellules B02 avec un anticorps anti-ROBO4 (A) soit pour les cellules MC3T3 avec un anticorps anti-SLIT2 (B) ou UNC5 (C). ****p* < 0,001 comparé aux cellules B02 non traitées (+).

ROBO1 n'est pas requis pour l'adhésion des cellules B02 sur les cellules ostéoblastiques murines MC3T3-E1.

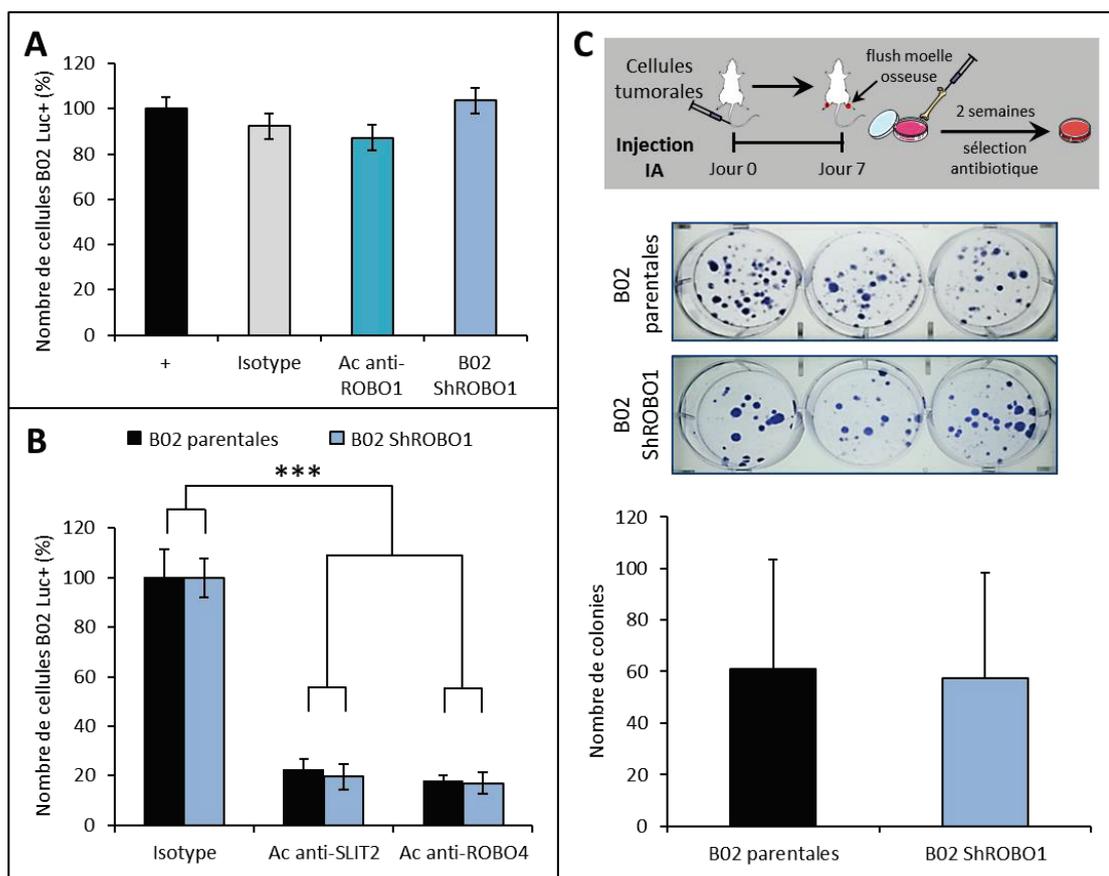


Figure 57 : Effet de la déplétion de ROBO1 dans les cellules B02 sur l'ancrage

Après 18h d'incubation des cellules B02 luciférase⁺ (parentales ou ShROBO1) sur un tapis cellulaire d'ostéoblastes murins MC3T3-E1 différenciés, la luminescence émise par les cellules B02 a été mesurée au luminomètre. Avant l'incubation des cellules des prétraitements ont été réalisés, soit pour les cellules B02 avec un anticorps anti-ROBO1 (A) ou anti-ROBO4 (B) soit pour les cellules MC3T3 avec un anticorps anti-SLIT2 (B). *** $p < 0,001$ comparé aux cellules B02 parentales ou ShROBO1 traitées avec l'isotype contrôle. C. Les cellules B02 parentales ou ShROBO1 ($5 \cdot 10^5$ cellules) ont été injectées dans l'artère caudale de souris ($n=10$). Sept jours après l'inoculation des cellules, les animaux ont été sacrifiés et les membres postérieurs récoltés. Les cellules de moelle osseuse obtenues ont été cultivées sous sélection antibiotique ce qui permet la croissance sélective des cellules cancéreuses résistantes aux antibiotiques. Les colonies de cellules tumorales ont été fixées et colorées au cristal violet puis comptées. Des images représentatives de chaque groupe sont présentées.

L'interaction directe SLIT2/ROBO4 étant controversée et à ce jour jamais clairement démontrée, l'une des hypothèses est une hétérodimérisation des récepteurs ROBO1 et ROBO4 pour permettre la transduction du signal *via* SLIT. Pour vérifier notre hypothèse nous avons utilisé les cellules B02 ShROBO1 précédemment construites au laboratoire (Thèse Vincent Gonin) ainsi qu'un anticorps ciblant ROBO1 pour réaliser un test d'adhésion des cellules tumorales sur les cellules ostéoblastiques MC3T3-E1. Dans les deux cas, que l'on utilise un anticorps contre ROBO1 ou que l'on utilise des cellules déplétées pour ce récepteur, aucune différence significative

de l'adhésion des cellules n'est observée. De plus, l'utilisation d'un anticorps anti-ROBO4 en pré-traitement des cellules Bo2 ou d'un anticorps anti-SLIT2 pour les MC3T3 utilisé précédemment (Figures 44A et 44B respectivement) conduit au même effet inhibiteur sur les cellules Bo2 quel que soit le niveau de ROBO1. *In vivo*, l'injection de cellules cancéreuses Bo2 shROBO1 dans l'artère caudale de souris immunodéficientes ne modifie pas le nombre de colonies de cellules tumorales dans la moelle osseuse en comparaison avec les souris inoculées avec des cellules Bo2 parentales. Ces résultats montrent que ROBO1 n'est pas nécessaire à l'ancrage des cellules Bo2 dans l'os.

L'ensemble de ces résultats montre que le récepteur de guidage axonal ROBO4 est nécessaire à l'ancrage des cellules tumorales aux ostéoblastes et plus généralement dans la moelle osseuse. Le ciblage du récepteur ROBO4 ou de son ligand potentiel SLIT2 inhibe l'adhésion des cellules cancéreuses Bo2 aux cellules ostéoblastiques murines MC3T3-E1. Cette signalisation est indépendante du récepteur ROBO1.

4- Développement de nouveaux outils thérapeutiques

Suite aux observations concernant l'implication du récepteur ROBO4 dans la formation des métastases osseuses et aux travaux sur l'utilisation d'anticorps (commerciaux) ciblant ROBO4 il paraissait particulièrement pertinent de développer de nouveaux outils à visée thérapeutique. Ainsi, durant ma thèse une collaboration avec l'équipe du Dr Bruno Robert a été mise en place, avec le soutien d'INSERM Transfert, dans le but de produire des anticorps dirigés contre ROBO4 afin d'obtenir des quantités suffisantes d'anticorps dans le but de traiter des animaux. Par ailleurs, des molécules de fusion UNC5B-Fc et ROBO4-Fc ont également été produites afin d'être utilisées comme preuve de concept validant le développement en phase clinique d'anticorps humanisés.

Production d'anticorps anti-ROBO4

L'utilisation d'anticorps commerciaux anti-ROBO4 diminue l'invasion et l'adhésion des cellules Bo2 *in vitro* ainsi que l'ancrage dans la moelle osseuse *in vivo*. Suite à ces résultats encourageants et dans le but de mettre en place des essais thérapeutiques à grande échelle chez la souris, une collaboration avec l'équipe du Dr Bruno Robert (U896 - Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier) a permis de produire six scFv (single-chain variable fragment) anti-ROBO4 par phage display. Ces constructions ont été couplées à des fragments Fc d'immunoglobulines humaines IgG1 afin de générer des constructions d'anticorps de type scFv-Fc. Avant envoi à notre laboratoire, pour être utilisés dans les différents tests fonctionnels mis au point et présentés précédemment, les différents scFv-Fc anti-ROBO4 ont été testés en cytométrie de flux sur les cellules de cancer du pancréas MIA-PaCa-2 qui présentent un profil similaire à celui des cellules Bo2 (Figure 58A).

Après validation en cytométrie par l'équipe de Bruno Robert (Figure 58B) nous avons tout d'abord testé au laboratoire ces anticorps en chambre de Boyden pour évaluer leur capacité à bloquer la migration des HUVEC. L'anticorps commercial A1 ciblant la forme non glycosylée de ROBO4 a été utilisé comme contrôle pour cette expérience. Les petits anticorps scFv-Fc possédant i) un encombrement stérique moins important que des anticorps complets ii) une affinité moins forte qu'un anticorps monoclonal, nous avons testé différentes concentrations (10 et 50 µg/mL) (Figure 58C). De plus, comme il s'agit d'anticorps monoclonaux alors que les anticorps commerciaux A1 et A2 qui inhibent la migration des HUVEC et l'adhésion des cellules Bo2 sont des anticorps polyclonaux nous avons également utilisé des combinaisons de plusieurs anticorps scFv-Fc pour se rapprocher d'un mélange polyclonal (Figure 58D). Dans tous les cas, que ce soit utilisé seul ou en combinaison, nous n'avons observé aucun effet significatif de ces anticorps sur la migration des HUVEC.

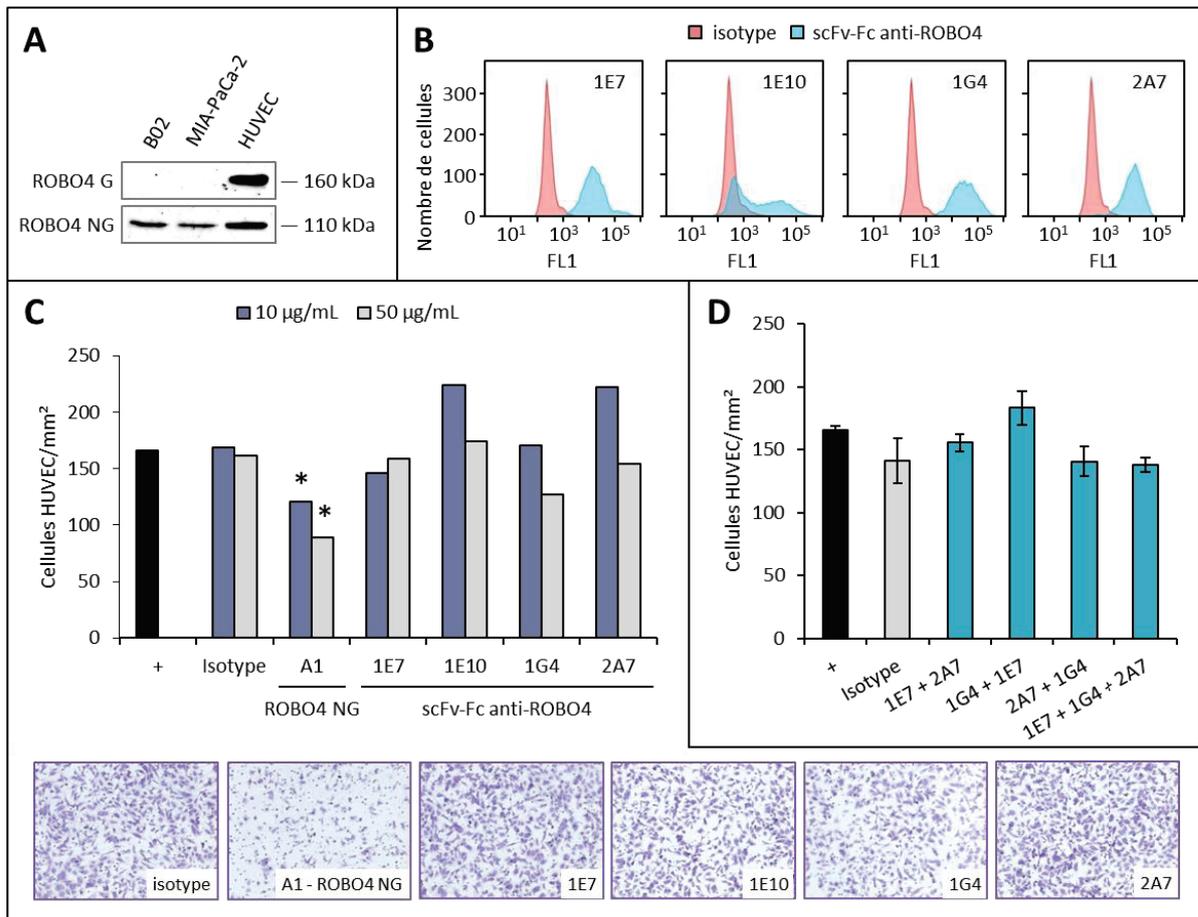


Figure 58 : Effet des scFv-Fc anti-ROBO4 sur la migration des HUVEC.

A. Analyse par western-blot des isoformes de ROBO4 exprimées par les cellules MIA-PaCa-2 utilisées à Montpellier pour le criblage des scFv-Fc anti-ROBO4. **B.** La reconnaissance de la protéine ROBO4 par les anticorps scFv-Fc anti-ROBO4 a été confirmée par cytométrie de flux. **C.** Effets des anticorps scFv-Fc anti-ROBO4 à 10 et 50 µg/mL sur la capacité des HUVEC à migrer en chambre de Boyden modifiée. Des photographies représentatives pour le test à 50 µg/mL de chaque anticorps anti-ROBO4 sont présentées. **D.** Effet de différentes combinaisons de scFv-Fc anti-ROBO4, à 10 µg/mL chacun, sur la migration des HUVEC. * $p < 0,05$ comparé aux cellules HUVEC non traitées (+).

Par ailleurs, afin de compléter l'étude et de valider ces observations dans un modèle tumoral, un test d'adhésion des cellules BO2 sur les cellules ostéoblastiques a été réalisé avec les mêmes anticorps scFv-Fc anti-ROBO4. Nous avons tout d'abord testé les différents anticorps à une faible concentration (10 µg/mL) pour laquelle l'anticorps commercial A1 diminue de 74% l'ancrage des cellules tumorales BO2. De nouveau, les différents anticorps scFv-Fc utilisés seuls ou en combinaison ne présentent aucun effet (Figure 59A). Du fait d'un encombrement sphérique moins important dû au format plus petit des scFv-Fc par rapport à des anticorps complets, nous avons pris la décision de réaliser les mêmes essais à des concentrations plus élevées en anticorps (50 et 250 µg/mL). A la concentration de 50 µg/mL nous n'observons toujours pas d'effet mais à 250 µg/mL un anticorps scFv-Fc, le 1E7, montre un effet inhibiteur (-43%) par rapport aux

cellules non traitées (Figure 59B). Ce résultat montre que ce scFv-Fc 1E7 est potentiellement un bon candidat et doit à présent être reconfiguré dans un format d'anticorps complet.

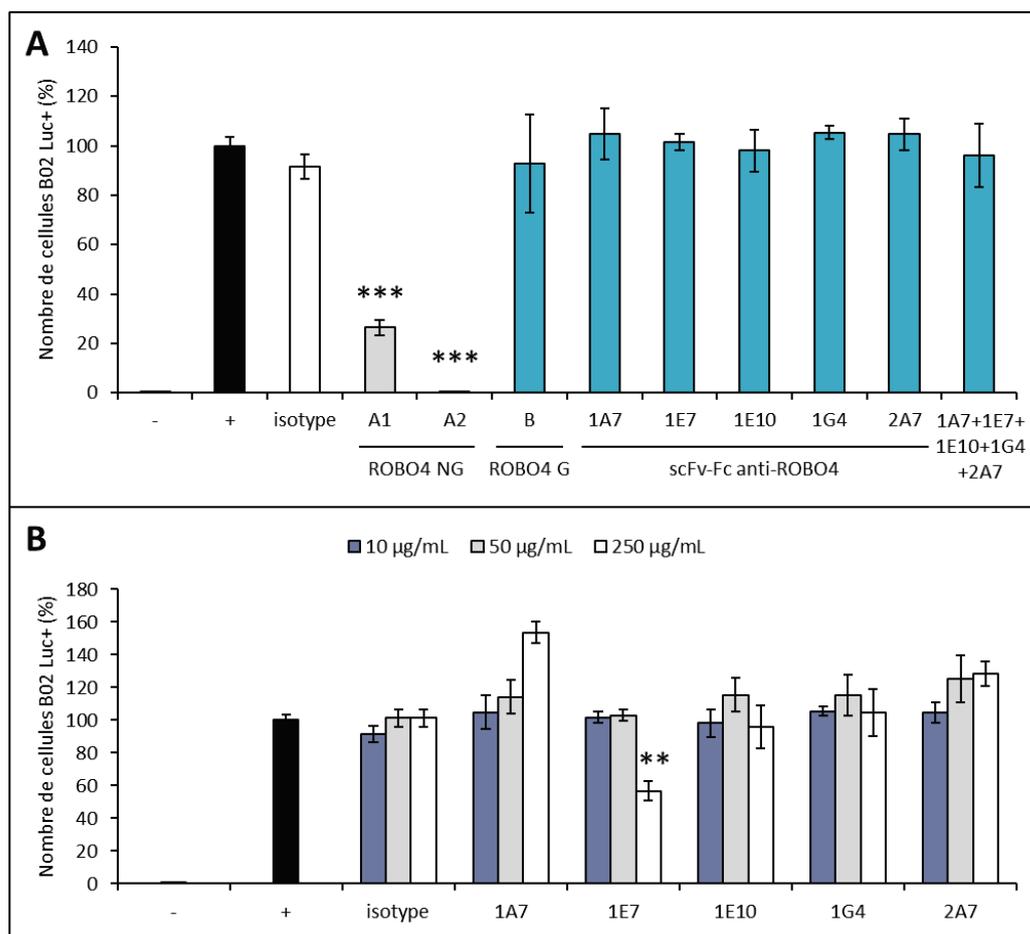


Figure 59 : Effet des scFv-Fc anti-ROBO4 sur l'adhésion des cellules B02 aux cellules ostéoblastiques MC3T3-E1.

Effets des anticorps scFv-Fc anti-ROBO4 sur la capacité des cellules B02 à adhérer aux cellules ostéoblastiques murines MC3T3-E1 seuls ou en combinaison à 10 µg/mL (A) ou à différentes concentrations croissantes (10, 50 et 250 µg/mL) (B). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparé aux cellules B02 non traitées (+).

Production de protéines de fusion Fc

En parallèle, nous avons développé une stratégie similaire à celle qui fut employée pour développer en clinique l'anticorps monoclonal anti-RANKL (denosumab) . Le denosumab bloque l'interaction du ligand RANKL avec son récepteur RANK et inhibe la destruction osseuse associée aux métastases osseuses. En amont du développement de la phase clinique du denosumab, des protéines de fusion RANK-Fc (domaine extracellulaire de RANK fusionné à la partie Fc d'immunoglobuline) et OPG-Fc (récepteur leurre associé à la partie Fc) avait été utilisées comme preuve de concept pour montrer que ces molécules inhibaient l'interaction RANK/RANKL dans des modèles animaux de métastases osseuses (Lacey et al., 2012). Sur le même principe, nous avons développé des molécules chimériques constituées du domaine extracellulaire de ROBO4 ou

de son ligand potentiel UNC5B fusionné avec le domaine Fc des immunoglobulines IgG1 de souris. Ces molécules pourraient agir comme des récepteurs leurres qui, en piégeant les ligands, seraient susceptibles de bloquer les interactions ROBO4/UNC5B. La stratégie a été de construire chacune de ces molécules avec soit la forme humaine soit la forme murine du domaine extracellulaire du récepteur afin d'obtenir une palette d'outils utilisables directement soit contre les cellules tumorales humaines par compétition des protéines de fusion avec les récepteurs présents à la surface des cellules, soit contre le microenvironnement dans notre modèle murin par saturation de l'environnement osseux des souris. Les séquences codantes ont été clonées à partir d'ARN extraits de cellules en culture (cellules de carcinomes mammaires MDA-MB-231 pour les formes humaines ou 4T1 pour les formes murines) par synthèse de l'ADNc et amplification par une polymérase de haute fidélité. Enfin les séquences ont été clonées dans un vecteur d'expression en fusion avec la partie Fc d'immunoglobuline IgG1 de souris en raison de l'utilisation du modèle murin pour toutes les expériences *in vivo*. De plus, la forme IgG1 est la moins immunogène, il y a ainsi très peu de risque avec cette forme d'activer la voie du complément lors d'une administration de ces molécules à l'animal. Après avoir contrôlé l'intégrité des séquences clonées, les cellules CHO ont été transfectées afin de vérifier la bonne expression de ces molécules chimériques sur un gel SDS-PAGE à partir des milieux conditionnés. La production à plus grande échelle et la purification par chromatographie d'affinité sur protéine A ont été réalisées par la société Biotem (Figure 60).

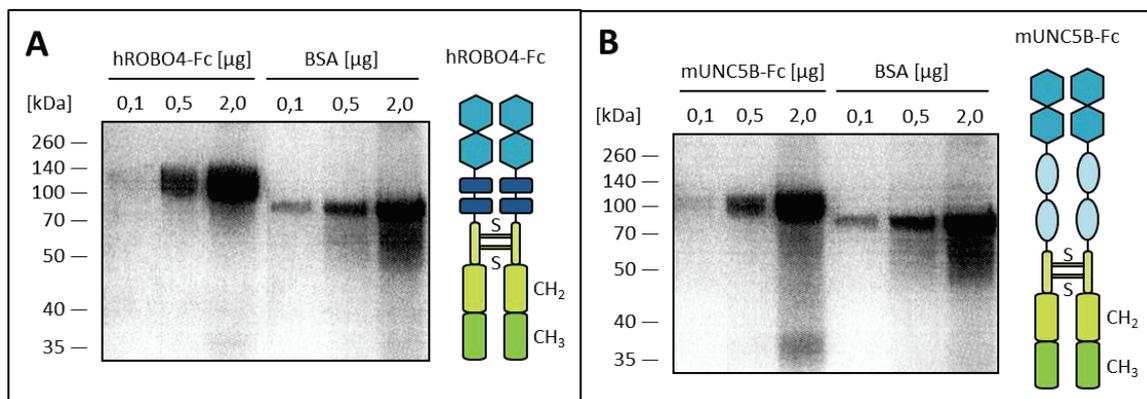


Figure 60 : Production des protéines de fusion hROBO4-Fc et mUNC5B-Fc.

Les parties codantes des domaines extracellulaires de ROBO4 humain (A) et d'UNC5B murin (B) ont été fusionnées à la région Fc d'immunoglobuline IgG1 de souris. L'expression des fusions par les cellules CHO dans le milieu de culture a été confirmée par SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Les tailles observées après coloration au bleu de Coomassie correspondent bien aux poids moléculaires attendus (77 kDa pour hROBO4-Fc et 66 kDa pour mUNC5B-Fc comparé à la BSA dont le poids moléculaire est de 65 kDa).

La production de la protéine de fusion mUNC5B-Fc a été réalisée dans l'optique de perturber l'interaction ROBO4/UNC5B décrite dans les cellules endothéliales (Koch et al., 2011). Nous avons donc tout d'abord vérifié la fonctionnalité des molécules produites dans un système angiogénique, les cellules HUVEC. Nous avons ainsi observé que la présence de mUNC5B-Fc dans

le milieu de culture des cellules endothéliales inhibait la formation de pseudo-capillaires (Figure 61A). De la même manière, la migration des HUVEC est significativement bloquée lorsque les cellules sont incubées avec le mUNC5B-Fc (Figure 61B). Par contre, l'utilisation de mUNC5B-Fc ne produit pas d'effet significatif sur l'invasion des cellules tumorales B02 (Figure 61C). Ces résultats nous permettent de valider que cette molécule de fusion est fonctionnelle dans un modèle endothélial mais n'a aucun effet sur les cellules cancéreuses telles que les cellules B02 dans le contexte in vitro de l'essai réalisé.

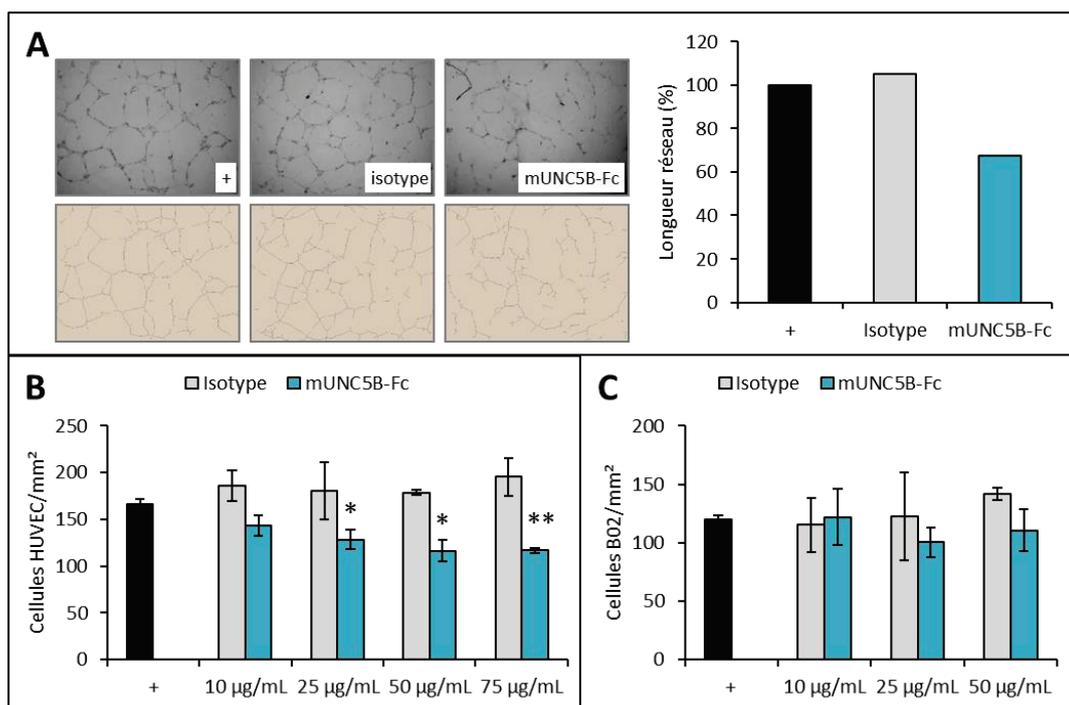


Figure 61 : Effets de la molécule de fusion UNC5B-Fc sur la migration des cellules endothéliales et l'invasion des cellules tumorales B02.

A. Effet du mUNC5B-Fc à 10 µg/mL sur la formation d'un réseau par les HUVEC. Les cellules ont été incubées 16h sur une couche de matrigel puis les photographies des différents puits ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ afin de quantifier la densité du réseau. **B.** et **C.** Effets du mUNC5B-Fc sur la capacité des HUVEC à migrer (**B**) et des cellules tumorales B02 à envahir en chambre de Boyden modifiée. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparé aux cellules non traitées (+).

Par ailleurs, dans le but de piéger le ligand potentiel de ROBO4 nous avons également construit des protéines de fusion hROBO4-Fc. Nous avons tout d'abord vérifié que la forme produite de hROBO4-Fc était non glycosylée et reconnue par l'anticorps anti-ROBO4 A1 (Figure 62A). Le dépôt de quelques nanogrammes sur un gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes nous a permis d'observer hROBO4-Fc à son poids moléculaire attendu et donc sous une forme non glycosylée. Ensuite, nous avons utilisé ce hROBO4-Fc de la même manière que l'anticorps anti-SLIT2 décrit précédemment (Figure 44B) afin de perturber l'adhésion des cellules tumorales B02 aux cellules ostéoblastiques MC3T3. Cependant, de manière surprenante, l'utilisation de ces molécules de fusion ne modifie pas la capacité d'adhésion des cellules cancéreuses (Figure 62B).

Néanmoins, il est difficile à l'aide de ce seul résultat d'écarter l'utilisation de ce hROBO4-Fc pour piéger les ligands potentiels de ROBO4 *in vivo*. De plus, la présence d'une molécule de fusion Fc n'est peut-être pas suffisante pour contrecarrer une interaction complexe entre SLIT2, ROBO4 et un éventuel co-récepteur.

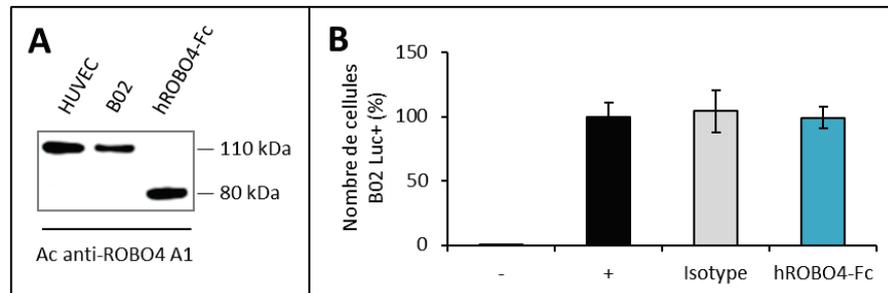


Figure 62 : Effet de la molécule de fusion ROBO4-Fc sur l'adhésion des cellules B02 aux cellules ostéoblastiques MC3T3-E1.

A. Analyse par western-blot du hROBO4-Fc (10 ng) reconnu par l'anticorps anti-Robo4 A1 qui cible la forme non glycosylée de ROBO4. **B.** Effet du hROBO4-Fc (10 µg/mL) sur la capacité des cellules B02 Luc+ à adhérer aux cellules ostéoblastiques murines MC3T3-E1.

PARTIE IV : Discussion et perspectives

Les protéines SLIT et leurs récepteurs ROBO, ont initialement été découverts dans le système nerveux où ils agissent comme des facteurs clés du guidage axonal et du développement neuronal (Ypsilanti et al., 2010)(Zheng et al., 2012). Depuis leur découverte, de nombreux rôles additionnels leur ont été attribués, notamment dans la régulation de la prolifération (Secq et al., 2015), de l'adhésion (Stine et al., 2014) et de la migration cellulaires (Geutskens et al., 2012) ainsi que de l'angiogenèse (Suchting et al., 2005) dans divers modèles cellulaires. Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont démontré l'implication de la voie de signalisation SLIT/ROBO dans la régulation de ces différents processus cellulaires, soulevant ainsi la possibilité d'un rôle important exercé par cette voie dans la transformation tumorale et dans la formation des métastases (Mehlen et al., 2011)(Göhrig et al., 2014). En effet, l'expression des protéines SLIT et ROBO est souvent altérée dans de nombreux cancers ; ces protéines peuvent donc être considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles.

A l'heure actuelle, aucune étude n'a décrit l'implication des récepteurs ROBO et de leurs ligands SLIT dans des mécanismes de formation des métastases osseuses. Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse, associés aux travaux précédemment réalisés au laboratoire par Bénédicte Eckel, ont permis de mettre en évidence le rôle de ROBO4 dans la formation et le développement des métastases osseuses.

ROBO4 et colonisation de la moelle osseuse

Au laboratoire, une analyse transcriptomique comparative entre une lignée humaine de cancer du sein, les MDA-MB-231, et sa sous-population ostéotrope, les MDA-MB-231/B02, avait montré une surexpression des composants de la voie de signalisation SLIT/ROBO dans les cellules B02 (données non montrées). Ces observations nous ont conduits à étudier, en particulier, l'implication des récepteurs ROBO1 et ROBO4 dans la dissémination métastatique à l'os des cellules de cancer du sein.

Afin de définir une valeur pronostique de l'expression de ROBO1 et ROBO4 chez des patientes atteintes de cancer du sein, nous avons analysé l'expression de ces récepteurs dans une cohorte de 254 patientes : l'expression de ROBO4 dans les tumeurs primaires du sein est associée à un mauvais pronostic de rechute métastatique alors que les taux de survie sans récurrence ne diffèrent pas selon les niveaux d'expression de ROBO1. Cette analyse conforte l'hypothèse d'une implication du récepteur de guidage axonal ROBO4 dans la formation des métastases osseuses puisque des niveaux élevés de ROBO4 corrélaient avec la rechute métastatique à l'os et confirme l'intérêt de travailler sur ROBO4 dans un modèle de cancer du sein métastatique comme les cellules B02 afin de déterminer son rôle précis dans la formation des métastases osseuses.

L'étude *in vivo* des conséquences de la déplétion de ROBO4 dans les cellules Bo2 (ShROBO4) nous a permis d'observer une différence significative au niveau de la formation des tumeurs primaires. Les souris injectées avec les cellules ShROBO4 montraient des volumes tumoraux plus petits comparés aux animaux contrôles (ScROBO4). Par contre, une augmentation de l'étendue de l'ostéolyse était observée chez les animaux injectés en intra-artériel avec les cellules ShROBO4, comparée aux animaux contrôles ; la charge tumorale présente dans les membres postérieurs métastatiques restant similaire dans les deux groupes. Ces résultats surprenants nous ont amenés à examiner les étapes précoces de la colonisation de la moelle osseuse en stoppant les protocoles animaux avant toute apparition de lésions ostéolytiques observables. Les résultats obtenus avec les animaux injectés, par voie intra-artérielle, avec des cellules Bo2 déplétées en ROBO4 montrent que l'absence de ROBO4 induit une diminution de 80% de la colonisation de la moelle osseuse. De manière similaire, lorsque les cellules ont été injectées directement dans la cavité médullaire nous avons observé de nouveau une diminution de 78% de la colonisation, suggérant ainsi que ROBO4 est également nécessaire à la nidation des cellules tumorales dans l'environnement osseux.

Ainsi, la présence du récepteur ROBO4 semble nécessaire pour la nidation, l'ancrage et probablement la survie des cellules cancéreuses Bo2 dans la moelle osseuse. Toutefois, l'absence de ROBO4 provoquant à long terme une augmentation des lésions ostéolytiques dues à une augmentation de l'activité ostéoclastique (Thèse Bénédicte Eckel), le ciblage de ROBO4 devra être couplé à des traitements complémentaires tels que les bisphosphonates ou le dénosumab afin de limiter cette activité ostéoclastique intrinsèque.

Quel axe de signalisation ?

Il avait également été démontré, au laboratoire, par RT-PCR que l'environnement métastatique favorisait la production de SLIT2 dans l'os (Thèse de Vincent Gonin). Une étude plus précise des deux types cellulaires majeurs de l'os, les ostéoblastes et les ostéoclastes, a révélé que ce sont spécifiquement les ostéoblastes qui sécrètent SLIT2. SLIT2 est un ligand très controversé pour le récepteur ROBO4, mais formellement identifié pour ROBO1. Cependant, des études récentes ont mis en évidence l'activation de la voie de signalisation en aval de ROBO4 *via* SLIT2 ou SLIT3 (Jones et al., 2009)(Paul et al., 2013). Mais il est encore difficile de savoir si SLIT se fixe directement à ROBO4. En effet, des interactions ont été démontrées par co-immunoprécipitation (Park et al., 2003)(Zhang et al., 2009a), mais pas dans des essais Biacore (Suchting et al., 2005). Ainsi, il semble probable qu'un co-récepteur soit nécessaire pour permettre la liaison SLIT/ROBO4. Dans certains contextes, ROBO1 peut remplir cette fonction (Sheldon et al., 2009), tandis que dans d'autres contextes, ce peuvent être des protéoglycans à héparane-sulfate comme le syndécan (Hu, 2001)(Steigemann et al., 2004). Dans notre modèle

cellulaire (Bo2) la présence ou l'absence de ROBO1 ne modifie pas la capacité des cellules à adhérer aux ostéoblastes et l'utilisation d'anticorps anti-SLIT2 en prétraitement des cellules ostéoblastiques ou d'anticorps anti-ROBO4 pour les cellules Bo2 déplétées ou non en ROBO1 ont les mêmes effets que ce soit avec les cellules parentales ou ShROBO1. *In vivo*, la capacité de colonisation des cellules ShROBO1 dans la moelle osseuse suite à l'injection intra-artérielle chez les animaux est identique à celle des cellules parentales. Ce résultat est en accord avec les observations de l'équipe de Yu J. *et al* sur la lympho-angiogenèse où là aussi la modulation de ROBO1 ne perturbe pas l'activation par SLIT2 de la voie de signalisation en aval de ROBO4 (Yu et al., 2014). Quant à la question de l'implication de SLIT3 dont l'interaction avec ROBO4 a également été mise en évidence dans l'angiogenèse (Paul et al., 2013), il semble que SLIT3 n'affecte pas l'adhésion des progéniteurs hématopoïétiques (Geutskens et al., 2012) ce qui confirme nos résultats de co-culture où la présence des cellules Bo2 ne modifie par la production de SLIT3 par les ostéoblastes.

De plus, la découverte de l'interaction de ROBO4 avec un autre récepteur de guidage axonal UNC5B (Koch et al., 2011) a révélé un nouveau niveau de complexité dans les relations ligand/récepteur des molécules de guidage axonal. Dans ce modèle ROBO4 joue le rôle de ligand pour UNC5B et active uniquement la cascade de signalisation en aval d'UNC5B. Il serait donc intéressant d'examiner les interactions potentielles de ROBO4 avec d'autres récepteurs de guidage axonal telles que les éphrines et les plexines/neuropilines dont l'implication dans l'homéostasie osseuse est démontrée, en particulier celle de la plexine A1 qui, à l'aide de la neuropiline 1, lie la SEMA3A et régule négativement la résorption osseuse et favorise la formation osseuse (Hayashi et al., 2012). De plus, il a été récemment démontré que la plexine A1 est également capable de fixer le fragment SLIT-C, dont l'activité biologique était jusqu'à présent inconnue, et de transduire un signal indépendamment des récepteurs ROBO et des neuropilines (Delloye-Bourgeois et al., 2015). La protéine transmembranaire neuropiline 1 joue également un rôle important dans la modulation de la réponse cellulaire induite par la liaison de SEMA3E à son récepteur plexine D1. Sur les neurones qui expriment la plexine D1 mais pas la neuropiline 1, SEMA3E agit comme un signal répulsif. Au contraire, sur les neurones qui expriment à la fois plexine D1 et neuropiline 1, la signalisation répulsive de SEMA3E est convertie en attraction (Chauvet et al., 2007). De façon intéressante, cette modulation peut être induite expérimentalement par une forme soluble du domaine extracellulaire de neuropiline 1. Ces résultats révèlent un nouveau mécanisme de contrôle de la signalisation des sémaphorines par les neuropilines et illustrent comment, en fonction du contexte cellulaire, des interactions extracellulaires entre récepteurs membranaires peuvent changer radicalement la signalisation d'une molécule de guidage axonal. Ainsi, il serait intéressant de déterminer les éventuelles interactions des récepteurs ROBO avec les autres récepteurs de guidage axonal dans notre modèle cellulaire Bo2 afin de déterminer leurs rôles ainsi que les voies de signalisations impliquées et

d'évaluer si l'inhibition des récepteurs ROBO peut être plus ou moins compensée par ces autres récepteurs.

Glycosylation de ROBO4

L'hétérogénéité des interactions du récepteur ROBO4 notamment avec le récepteur ROBO1 et le récepteur à la nétrine UNC5B démontre la complexité du réseau d'interactions et de signalisation entre les récepteurs de guidage axonal. De plus, l'identification de glycoformes des récepteurs ROBO4 offre de nouvelles perspectives dans la compréhension des multiples fonctions de ces récepteurs. Suite à la transduction des cellules de carcinomes mammaires avec la forme humaine de ROBO4 nous avons été surpris de ne pas observer la protéine ROBO4 à son poids moléculaire prédit par la séquence bioinformatique (110 kDa) mais à une masse moléculaire beaucoup plus élevée (160 kDa). De manière intéressante, dans certaines études, la protéine ROBO4 est détectée à 150 kDa comme dans les cellules endothéliales trophoblastiques du placenta (Liao et al., 2012), mais également dans les cellules de la rétine (Huang et al., 2009) démontrant qu'il n'est pas inhabituel de détecter la protéine à ce haut poids moléculaire. De plus, lors de l'identification de ROBO4 quatre sites potentiels de N-glycosylation dans la partie extracellulaire du récepteur ont été décrits (Huminiacki et al., 2002). La N-glycosylation est essentiellement co-traductionnelle : le glycane est attaché à la chaîne polypeptidique en cours de biosynthèse et pendant son transport dans le réticulum endoplasmique (Helenius and Aebi, 2001). Le N signifie que le glycane est attaché de manière covalente à l'azote du groupement amide d'une asparagine (motif Asn-X-Ser/Thr). Cependant, la glycosylation du récepteur ROBO4 n'avait jamais été décrite. Nous avons démontré l'existence d'une isoforme glycosylée du récepteur ROBO4 à l'aide d'un traitement par la tunicamycine (un inhibiteur de la N-glycosylation) couplé à l'utilisation d'inhibiteurs de protéasome. Alors que les formes à 110 et 160 kDa sont toutes deux détectées dans les cellules HUVEC qui expriment fortement la protéine ROBO4, seule la forme à 110 kDa est détectée dans les cellules B02. Le variant non glycosylé de ROBO4 à 110 kDa exprimé dans les B02 pourrait être alors le seul à l'origine des effets observés sur la formation des métastases osseuses. En effet, outre l'impact que peut avoir la glycosylation sur des mécanismes biologiques tel que le maintien d'une structure spatiale particulière, le contrôle qualité et l'adressage des glycoprotéines il est maintenant admis que l'absence ou la présence de structures glycaniques influe sur l'activité biologique d'une protéine (Fournier et al., 2015)(Janik et al., 2010). Dans les cellules cancéreuses une hyperglycosylation aberrante des protéines est souvent observée et associée à la progression métastatique (Couldrey and Green, 2000)(Xu et al., 2014). A l'inverse, une récente étude a montré que la complète glycosylation du récepteur ICAM-2 était associée à une diminution des propriétés métastatiques d'une lignée cancéreuse de neuroblastome (Feduska et al., 2013).

Dans la même optique, la glycosylation du récepteur ROBO4 pourrait diminuer les propriétés tumorales et métastatiques des cellules de la lignée Bo2. Cependant, la forme non glycosylée à 110 kDa est retrouvée également en abondance dans les HUVEC et n'est donc probablement pas le fruit d'une dérégulation de la glycosylation au sein de la lignée Bo2. D'ailleurs, l'utilisation d'un anticorps ciblant la forme à 110 kDa réduit de façon très significative la migration des HUVEC et la capacité invasive des cellules Bo2 *in vitro* alors qu'un anticorps ciblant la forme glycosylée n'a aucun effet sur la migration des HUVEC. Le rôle exact de ROBO4 dans l'angiogenèse est encore débattu : il induit la migration des cellules endothéliales durant le développement (Sheldon et al., 2009)(Kaur et al., 2006) mais il est également capable d'inhiber l'angiogenèse dans le but d'une stabilisation vasculaire (Koch et al., 2011)(Marlow et al., 2010)(Jones et al., 2009). La glycosylation pourrait alors moduler la fixation des ligands de ROBO4 et les rôles pro et anti-angiogéniques de ROBO4 pourraient être assurés par les deux formes respectivement. Les cellules Bo2 n'expriment que la forme non glycosylée du récepteur ROBO4, au détriment de la forme glycosylée de ROBO4, favorisant ainsi la migration, l'invasion et l'ancrage dans la niche métastatique. Ces résultats ouvrent de nouvelles pistes dans le décryptage de la fonction du récepteur ROBO4. Des expériences de mutagenèse dirigée contre les sites de N-glycosylation sont en cours pour évaluer le rôle de la glycosylation du récepteur ROBO4 dans la formation et l'établissement des métastases osseuses (Travail de thèse de François Le Pape). Il sera intéressant de voir si la surexpression de la forme non glycosylée par rapport à la forme glycosylée modifie la capacité des cellules tumorales à métastaser.

Chez l'homme (et la souris), le locus *ROBO1* possède deux promoteurs alternatifs produisant deux isoformes, ROBO1 et Dutt1 (Nural et al., 2007). Les transcrits montrent des extrémités 5' différentes mais 3' similaires et donc codent pour des isoformes protéiques distinctes dans leur partie N-terminale. Les deux isoformes ont des profils d'expression distincts dans le système nerveux embryonnaire murin qui se chevauchent partiellement. Dutt1 est l'isoforme prédominante, avec une expression répandue dans les cellules neuro-épithéliales et les neurones post-mitotiques. L'isoforme ROBO1, quant à elle, a un profil d'expression plus limité restreint à un sous-ensemble de neurones, dont la plupart n'expriment pas Dutt1. Des isoformes sont également décrites pour les autres membres de la famille ROBO excepté pour ROBO4 (Camurri et al., 2005)(Yue et al., 2006)(Chen et al., 2008). Au vu de ces observations et pour approfondir l'étude des glycoformes de ROBO4, l'examen de la région 5'UTR de *ROBO4* par RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA-Ends by Polymerase Chain Reaction) paraît donc pertinent et devrait nous permettre de déterminer si pour *ROBO4* il existe aussi un promoteur alternatif. En comparant les transcrits présents dans les HUVEC ou les cellules Bo2 nous pourrions déterminer si des transcrits différents existent. Et dans l'affirmative, décortiquer les mécanismes co-translationnels de glycosylation mis en place par les cellules pour aboutir à deux versions de la protéine ROBO4.

ROBO4 : une nouvelle cible thérapeutique ?

Ces premières observations sur les glycoformes de ROBO4 et l'utilisation des différents anticorps ciblant l'une ou l'autre forme nous ont permis de montrer qu'il existait un réel intérêt thérapeutique à bloquer la forme non glycosylée. En effet, en ciblant cette isoforme dans les Bo2 nous avons pu inhiber *in vitro* l'invasion des cellules en chambre de Boyden et réduire l'adhésion aux cellules ostéoblastiques murines. Ces résultats sont en accord avec les expériences menées *in vivo* avec ce même anticorps en pré-traitement des cellules Bo2 avant l'injection intra-tibiale. De nouveau, l'ancrage des cellules dans la moelle osseuse est modulé négativement comparé à l'utilisation d'un isotype. L'ensemble de ces résultats conforte l'hypothèse selon laquelle ROBO4 participe à l'ancrage des cellules tumorales Bo2 dans l'os et montre, de manière intéressante, que le ciblage de ROBO4 par un anticorps entrave ce mécanisme d'ancrage. Les cellules tumorales expriment plusieurs molécules qui facilitent leur ancrage dans l'os, particulièrement des molécules initialement exprimées par les cellules résidentes de la moelle osseuse comme les cellules souches hématopoïétiques (CSH). C'est le cas par exemple du récepteur CXCR4 qui est une protéine clé à la fois dans le tropisme osseux des cellules tumorales mais aussi dans la colonisation et l'ancrage dans l'os *via* l'interaction avec son ligand CXCL12 (Wang et al., 2006). De manière intéressante, dans un modèle de cancer de la prostate, l'utilisation, *in vivo*, d'un anticorps dirigé contre CXCR4 diminue la formation de métastases osseuses (Sun et al., 2005). Dans un contexte physiologique, l'axe CXCR4/CXCL12 est nécessaire pour l'ancrage des CSH dans la moelle osseuse, un antagoniste de ce récepteur induit la mobilisation des CSH dans la circulation sanguine périphérique (Sugiyama and Nagasawa, 2012). Dans une surprenante étude, il a été mis en évidence que le récepteur ROBO4 est exprimé par les CSH et agit en synergie avec le couple CXCR4/CXCL12 pour ancrer les CSH dans l'os. Ainsi de la même manière que le récepteur CXCR4, l'inhibition de ROBO4 induit la mobilisation des CSH dans la circulation sanguine (Smith-Berdan et al., 2011). Les cellules de la lignée Bo2 n'expriment pas le récepteur CXCR4 (données non montrées), l'interaction de ROBO4 avec les composants de la moelle osseuse ne résulterait donc pas d'une collaboration avec le couple CXCR4/CXCL12. Toutefois, ceci est particulièrement intéressant car les cellules tumorales qui expriment CXCR4 sont capables de rentrer en compétition avec les CSH pour s'ancrer dans l'os (Shiozawa et al., 2011). Nous pouvons donc imaginer que les cellules tumorales qui expriment ROBO4 puissent également entrer en compétition avec les CSH dans la moelle osseuse pour s'y ancrer et à l'instar de l'étude réalisée avec un anticorps neutralisant anti-CXCR4, l'utilisation d'un anticorps anti-ROBO4 ralentirait l'ancrage des cellules tumorales dans l'os, comme observé dans nos études, et de ce fait la formation de métastases osseuses. De plus, nous pouvons également imaginer que l'utilisation d'un tel anticorps pourrait mobiliser les cellules tumorales hors de l'environnement osseux, ou déstabiliser leurs interactions avec cet environnement, les rendant alors plus accessibles aux traitements thérapeutiques, tels que la chimiothérapie.

Le récepteur ROBO4 semble donc être un bon candidat pour le développement de traitements thérapeutiques. A l'aide d'une collaboration avec le Dr Bruno Robert, de l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, des protéines de fusion scFv-Fc anti-ROBO4 ont été produites par la technique de phage display, elles permettront de poursuivre cette caractérisation en traitant les souris par l'anticorps après injection de cellules tumorales. Dans le cadre d'une utilisation thérapeutique, les scFv seraient rapidement éliminés par l'organisme en raison de leur petite taille c'est pourquoi ils ont été fusionnés à la région Fc complète d'une immunoglobuline humaine (scFv-Fc) (Weisser and Hall, 2009). Ce format d'anticorps a déjà été utilisé chez la souris contre le récepteur à l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1). L'injection d'IGF-1R scFv-Fc (500 µg/souris, deux fois par semaine) inhibe de manière significative la croissance tumorale des cellules de cancer du sein MCF7 chez des souris athymiques (Li et al., 2000). Les avantages de ce format sont l'humanisation de l'anticorps (partie Fc), l'amélioration des niveaux d'expression et la facilité de purification par l'intermédiaire d'une chromatographie d'affinité sur protéine A. L'inconvénient est qu'en règle générale, les scFv-Fc présentent une affinité inférieure à celle d'un anticorps monoclonal "classique". Cependant, l'utilisation de scFv-Fc pourrait être une première étape et ferait preuve de concept avant le développement potentiel de futures thérapies. Pour le moment, un seul scFv-Fc anti-ROBO4 (le 1E7) testé *in vitro* pour l'invasion et l'adhésion semble intéressant. Cependant une concentration élevée a dû être utilisée pour observer un effet significatif. Il est donc à présent primordial de retravailler le format de cet anticorps pour augmenter son affinité pour ROBO4. Bien entendu il sera intéressant de tester *in vivo* l'effet d'un anticorps anti-ROBO4 couplé à un traitement anti-ostéolytique afin d'évaluer le bénéfice en thérapie d'un ciblage de ROBO4 puisqu'à long terme les cellules tumorales dépêlétées en ROBO4 forment des lésions ostéolytiques plus importantes. Par ailleurs, ce ciblage de ROBO4 chez la souris permettra d'évaluer le rapport bénéfice/risque d'un tel traitement ; en effet, les récepteurs ROBO jouant un rôle important dans le développement du système nerveux ainsi que dans la vascularisation, une inhibition de l'activité de ces récepteurs par des agents modulateurs, tels que des anticorps, pourrait conduire à d'éventuels troubles neurologiques et vasculaires. Cependant, ces récepteurs interviennent essentiellement lors du développement embryonnaire, ce qui laisse penser que leur ciblage pourrait être intéressant en thérapie et avec de faibles conséquences physiologiques.

Par ailleurs, en nous basant sur les travaux réalisés pour la production de l'anticorps humanisé anti-RANKL, le denosumab (Lacey et al., 2012), nous avons développé deux protéines de fusion comprenant la partie extracellulaire des récepteurs étudiés associée au domaine Fc d'immunoglobuline de souris. D'une part, nous avons construit un ROBO4-Fc afin de piéger les ligands potentiels de ROBO4 dans le microenvironnement osseux. D'autre part, nous avons produit un UNC5B-Fc pour cibler directement ROBO4 puisque l'interaction entre ces deux récepteurs a récemment été démontrée (Koch et al., 2011). Malheureusement, ces deux molécules n'ont donné aucun résultat satisfaisant *in vitro* avec les cellules tumorales. Néanmoins, il serait

tout de même intéressant de vérifier si elles n'ont également aucun effet dans un système *in vitro* plus complexe tel qu'une niche osseuse reconstituée. Ce projet pourrait être réalisé en collaboration avec le Dr Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès de l'équipe « Interactions cellules souches-niches: physiologie, tumeurs et réparation tissulaire » qui travaille sur la mise en place d'un modèle 3D de niche osseuse avec les cellules Bo2. De plus, vu les résultats concernant i) la production de SLIT2 par les ostéoblastes en réponse à la présence des cellules métastatiques dans leur environnement et ii) l'inhibition de l'adhésion des cellules Bo2 aux cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 suite au traitement avec un anticorps anti-SLIT2 il serait à présent pertinent de construire également une protéine de fusion SLIT2-Fc pour confirmer l'implication d'un axe SLIT2/ROBO4 dans les mécanismes d'adhésion aux ostéoblastes. Enfin, il serait nécessaire de tester *in vivo* ces molécules chez la souris.

Vers un modèle syngénique

Pour approfondir l'étude du rôle de ROBO4 dans la formation et l'établissement des métastases osseuses et pallier aux limites rencontrées dans le modèle Bo2, il serait intéressant d'utiliser un modèle murin de carcinome mammaire syngénique. En effet, un tel modèle permet l'utilisation de souris immunocompétentes et autorise ainsi l'étude de l'implication du système immunitaire dans le développement tumoral et métastatique. La lignée cellulaire de carcinome mammaire murin 4T1, dérivée d'une tumeur spontanée survenue chez une souris femelle Balb/c (Tao et al., 2008), a été choisie notamment pour ses propriétés, similaires à celles des cancers du sein humain, à former des métastases spontanément aux poumons mais aussi à l'os une fois injectée dans la glande mammaire d'une souris Balb/c. Le niveau d'expression de ROBO4 dans les cellules de la lignée 4T1 a été établi par PCR quantitative et western blot. Nous avons pu observer que l'ARNm et la protéine ROBO4 (isoforme glycosylée et non glycosylée) ne sont détectés que très faiblement dans ces cellules. Nous considérons que la lignée cellulaire 4T1 est un modèle approprié pour étudier les conséquences, *in vivo*, de la surexpression de ROBO4 dans le tropisme osseux des cellules tumorales. En effet, en transduisant d'une part la forme glycosylée de ROBO4 et d'autre part la forme mutée sur ces sites de glycosylation nous pourrions confirmer le rôle agressif de l'isoforme hypoglycosylée de ROBO4. Nous émettons ainsi l'hypothèse que la surexpression de cette forme de ROBO4 dans la lignée 4T1, qui forme principalement des métastases aux poumons, augmenterait l'apparition de métastases osseuses. Les premiers résultats concernant la surexpression de la glycoforme de ROBO4 vont dans ce sens : aucun effet sur le volume tumoral ni sur le tropisme des cellules cancéreuses (données non montrées).

L'ensemble de ces travaux au cours de mes trois années de thèse m'ont permis de montrer que ROBO4 pouvait être un facteur de mauvais pronostic dans les tumeurs primaires de cancers du sein. De plus, j'ai confirmé son rôle pro-invasif *in vitro* et donc son implication dans la cascade métastatique. J'ai également observé que les cellules tumorales interagissaient avec les ostéoblastes de façon ROBO4-dépendante. *In vivo*, j'ai montré la pertinence de l'utilisation d'un anticorps anti-ROBO4 pour diminuer l'ancrage dans l'os des cellules ostéotropiques Bo2 ce qui a conduit à la production de scFv-Fc anti-ROBO4 en collaboration avec l'équipe « Immunociblage et Radiobiologie en Oncologie » du Dr Bruno Robert. J'ai mis au point les tests adéquats pour analyser *in vitro* l'activité de ces molécules sur l'invasion et l'adhésion des cellules Bo2. Ces outils permettront donc une première approche thérapeutique chez l'animal pouvant faire preuve de concept, en évaluant notamment le rapport bénéfice/risque d'un tel traitement. Ces outils pourraient également être utilisés afin de tester la mobilisation des cellules tumorales hors de l'environnement osseux, ou de déstabiliser leurs interactions avec cet environnement, les rendant alors plus accessibles aux traitements thérapeutiques conventionnels, tels que la chimiothérapie.

L'ensemble de ces résultats, qui examinent pour la première fois le rôle d'un récepteur de guidage axonal, ROBO4, dans la formation et le développement des métastases osseuses devrait permettre à terme d'envisager des thérapies innovantes pour le traitement de ces métastases.

Publications et communications scientifiques

Brevet déposé

« Methods and pharmaceutical compositions for the treatment of bone metastases »

L. Clément-Demange, B. Eckel, C. Diaz-Latoud, P. Clézardin

Numéro de publication : WO2014072416 A1

Date de publication : 15 mai 2014

Publication

« Emerging therapies in bone metastasis »

L. Clément-Demange, P. Clézardin

Current Opinion in Pharmacology. 2015 Apr 30;22:79-86.

Communications dans le cadre de congrès (*présentation orale)

4th Joint Meeting of ECTS and IBMS

Rotterdam, Pays-Bas 25-28 avril 2015

L. Clément-Demange, B. Eckel, D. Goehrig, C. Diaz-Latoud, P. Clézardin

« Roundabout receptors: a new molecular target for the prevention of bone metastasis »

Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR)

Houston, USA 12-15 septembre 2014

L. Clément-Demange, B. Eckel, V. Gonin, D. Goehrig, C. Diaz-Latoud, P. Clézardin

« Roundabout receptors mediate breast cancer bone metastasis formation and progression »

Journée des Maladies Osseuses (JMO)

Lyon, France 3 septembre 2014

*L. Clément-Demange, B. Eckel, V. Gonin, D. Goehrig, C. Diaz-Latoud, P. Clézardin

« Implication des récepteurs roundabout dans la formation et le développement des métastases osseuses du cancer du sein »

13th International Conference on Cancer-Induced Bone Disease (CIBD)

Miami, USA 6-9 novembre 2013

L. Clément-Demange, B. Eckel, V. Gonin, D. Goehrig, C. Diaz-Latoud, P. Clézardin

« Involvement of roundabout receptors in breast cancer bone metastasis formation and progression »

Journée des doctorants de la SFR Lyon-Est

Lyon, France 5 septembre 2013

*L. Clément-Demange, B. Eckel, V. Gonin, D. Goehrig, C. Diaz-Latoud, P. Clézardin

« Implication des récepteurs roundabout dans la formation et le développement de métastases osseuses du cancer du sein »

12th International Conference on Cancer-Induced Bone Disease (CIBD)

Lyon, France 15-17 novembre 2012

*B. Eckel, V. Gonin, L. Clément-Demange, D. Goehrig, C. Diaz-Latoud P. Clézardin.

« Involvement of the ROBO 1 and 4 proteins in breast cancer bone metastasis »

7^{èmes} Journées Scientifiques du Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA)

Lyon, France 20-21 mars 2012

B. Eckel, L. Clément-Demange, D. Goehrig, C. Diaz-Latoud P. Clézardin.

« Rôle des récepteurs de guidage axonal ROBO1 et 4 dans la formation et le développement de métastases osseuses du cancer du sein »

Bibliographie

Abdollahi, A., Schwager, C., Kleeff, J., Esposito, I., Domhan, S., Peschke, P., Hauser, K., Hahnfeldt, P., Hlatky, L., Debus, J., et al. (2007). Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 12890–12895.

Adams, G.B., Chabner, K.T., Alley, I.R., Olson, D.P., Szczepiorkowski, Z.M., Poznansky, M.C., Kos, C.H., Pollak, M.R., Brown, E.M., and Scadden, D.T. (2006). Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* *439*, 599–603.

Addison, W.N., Nelea, V., Chicatun, F., Chien, Y.-C., Tran-Khanh, N., Buschmann, M.D., Nazhat, S.N., Kaartinen, M.T., Vali, H., Tecklenburg, M.M., et al. (2015). Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: An ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone. *Bone* *71*, 244–256.

Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 834–846.

Akech, J., Wixted, J.J., Bedard, K., van der Deen, M., Hussain, S., Guise, T.A., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Languino, L.R., Altieri, D.C., et al. (2010). Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. *Oncogene* *29*, 811–821.

Alajez, N.M., Lenarduzzi, M., Ito, E., Hui, A.B.Y., Shi, W., Bruce, J., Yue, S., Huang, S.H., Xu, W., Waldron, J., et al. (2011). MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway. *Cancer Res.* *71*, 2381–2391.

Alvarez, C., Tapia, T., Cornejo, V., Fernandez, W., Muñoz, A., Camus, M., Alvarez, M., Devoto, L., and Carvallo, P. (2013). Silencing of tumor suppressor genes RASSF1A, SLIT2, and WIF1 by promoter hypermethylation in hereditary breast cancer. *Mol. Carcinog.* *52*, 475–487.

Ara, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Egawa, T., Kawabata, K., and Nagasawa, T. (2003). Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity* *19*, 257–267.

Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* *118*, 149–161.

Baeriswyl, V., and Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* *19*, 329–337.

Balooch, G., Balooch, M., Nalla, R.K., Schilling, S., Filvaroff, E.H., Marshall, G.W., Marshall, S.J., Ritchie, R.O., Derynck, R., and Alliston, T. (2005). TGF-beta regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18813–18818.

Bashaw, G.J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., and Goodman, C.S. (2000). Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* *101*, 703–715.

Becker, C.B. (2014). Sclerostin inhibition for osteoporosis--a new approach. *N. Engl. J. Med.* *370*, 476–477.

Van Beek, E., Löwik, C., van der Pluijm, G., and Papapoulos, S. (1999). The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *14*, 722–729.

Bellahcène, A., Bachelier, R., Detry, C., Lidereau, R., Clézardin, P., and Castronovo, V. (2007). Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *101*, 135–148.

Bendre, M.S., Margulies, A.G., Walser, B., Akel, N.S., Bhattacharya, S., Skinner, R.A., Swain, F., Ramani, V., Mohammad, K.S., Wessner, L.L., et al. (2005). Tumor-derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand pathway. *Cancer Res.* *65*, 11001–11009.

- Benzaïd, I., Mönkkönen, H., Bonnelye, E., Mönkkönen, J., and Clézardin, P. (2012). In vivo phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors trigger Vγ9Vδ2 T-cell antitumor cytotoxicity through ICAM-1 engagement. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 6249–6259.
- Bi, L.X., Mainous, E.G., Yngve, D.A., and Buford, W.L. (2008). Cellular isolation, culture and characterization of the marrow sac cells in human tubular bone. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* *8*, 43–49.
- Bockhorn, M., Jain, R.K., and Munn, L.L. (2007). Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncol.* *8*, 444–448.
- Bonewald, L.F. (2011). The amazing osteocyte. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *26*, 229–238.
- Bonnomet, A., Syne, L., Brysse, A., Feyereisen, E., Thompson, E.W., Noël, A., Foidart, J.-M., Birembaut, P., Polette, M., and Gilles, C. (2012). A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* *31*, 3741–3753.
- Boyce, B., and Xing, L. (2011). Src inhibitors in the treatment of metastatic bone disease: rationale and clinical data. *Clin. Investig.* *1*, 1695–1706.
- Bragado, P., Sosa, M.S., Keely, P., Condeelis, J., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2012). Microenvironments dictating tumor cell dormancy. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Prog. Dans Rech. Sur Cancer* *195*, 25–39.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* *96*, 795–806.
- Broxmeyer, H.E., Orschell, C.M., Clapp, D.W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P.A., Liles, W.C., Li, X., Graham-Evans, B., Campbell, T.B., et al. (2005). Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J. Exp. Med.* *201*, 1307–1318.
- Bu, G., Lu, W., Liu, C.-C., Selander, K., Yoneda, T., Hall, C., Keller, E.T., and Li, Y. (2008). Breast cancer-derived Dickkopf1 inhibits osteoblast differentiation and osteoprotegerin expression: implication for breast cancer osteolytic bone metastases. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *123*, 1034–1042.
- Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., et al. (1998). osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* *12*, 1260–1268.
- Buijs, J.T., Stayrook, K.R., and Guise, T.A. (2012). The role of TGF-β in bone metastasis: novel therapeutic perspectives. *BoneKey Rep.* *1*, 96.
- Burgess, T.L., Qian, Y., Kaufman, S., Ring, B.D., Van, G., Capparelli, C., Kelley, M., Hsu, H., Boyle, W.J., Dunstan, C.R., et al. (1999). The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J. Cell Biol.* *145*, 527–538.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* *425*, 841–846.
- Camurri, L., Mambetisaeva, E., Davies, D., Parnavelas, J., Sundaresan, V., and Andrews, W. (2005). Evidence for the existence of two Robo3 isoforms with divergent biochemical properties. *Mol. Cell. Neurosci.* *30*, 485–493.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* *407*, 249–257.
- Castañeda-Corral, G., Jimenez-Andrade, J.M., Bloom, A.P., Taylor, R.N., Mantyh, W.G., Kaczmarek, M.J., Ghilardi, J.R., and Mantyh, P.W. (2011). The majority of myelinated and unmyelinated sensory nerve fibers that innervate bone express the tropomyosin receptor kinase A. *Neuroscience* *178*, 196–207.
- Lo Celso, C., Fleming, H.E., Wu, J.W., Zhao, C.X., Miake-Lye, S., Fujisaki, J., Côté, D., Rowe, D.W., Lin, C.P., and Scadden, D.T. (2009). Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* *457*, 92–96.

- Chanana, B., Steigemann, P., Jäckle, H., and Vorbrüggen, G. (2009). Reception of Slit requires only the chondroitin-sulphate-modified extracellular domain of Syndecan at the target cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 11984–11988.
- Chang, M.K., Raggatt, L.-J., Alexander, K.A., Kuliwaba, J.S., Fazzalari, N.L., Schroder, K., Maylin, E.R., Ripoll, V.M., Hume, D.A., and Pettit, A.R. (2008). Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 1232–1244.
- Chantry, A.D., Heath, D., Mulivor, A.W., Pearsall, S., Baud'huin, M., Coulton, L., Evans, H., Abdul, N., Werner, E.D., Bouxsein, M.L., et al. (2010). Inhibiting activin-A signaling stimulates bone formation and prevents cancer-induced bone destruction in vivo. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *25*, 2633–2646.
- Chao, Y.L., Shepard, C.R., and Wells, A. (2010). Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Mol. Cancer* *9*, 179.
- Chauvet, S., Cohen, S., Yoshida, Y., Fekrane, L., Livet, J., Gayet, O., Segu, L., Buhot, M.-C., Jessell, T.M., Henderson, C.E., et al. (2007). Gating of Semaphorin 3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron* *56*, 807–822.
- Chen, G., Deng, C., and Li, Y.-P. (2012). TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int. J. Biol. Sci.* *8*, 272–288.
- Chen, J.H., Wen, L., Dupuis, S., Wu, J.Y., and Rao, Y. (2001). The N-terminal leucine-rich regions in Slit are sufficient to repel olfactory bulb axons and subventricular zone neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 1548–1556.
- Chen, Z., Gore, B.B., Long, H., Ma, L., and Tessier-Lavigne, M. (2008). Alternative splicing of the Robo3 axon guidance receptor governs the midline switch from attraction to repulsion. *Neuron* *58*, 325–332.
- Clark, K., Hammond, E., and Rabbitts, P. (2002). Temporal and spatial expression of two isoforms of the Dutt1/Robo1 gene in mouse development. *FEBS Lett.* *523*, 12–16.
- Clézardin, P. (2011a). Therapeutic targets for bone metastases in breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* *13*, 207.
- Clézardin, P. (2011b). [The role of RANK/RANKL/osteoprotegerin (OPG) triad in cancer-induced bone diseases: pathophysiology and clinical implications]. *Bull. Cancer (Paris)* *98*, 837–846.
- Coleman, H.A., Labrador, J.-P., Chance, R.K., and Bashaw, G.J. (2010). The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 2417–2426.
- Coleman, R., Gnant, M., Morgan, G., and Clezardin, P. (2012). Effects of bone-targeted agents on cancer progression and mortality. *J. Natl. Cancer Inst.* *104*, 1059–1067.
- Conway, C.D., Howe, K.M., Nettleton, N.K., Price, D.J., Mason, J.O., and Pratt, T. (2011). Heparan sulfate sugar modifications mediate the functions of slits and other factors needed for mouse forebrain commissure development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 1955–1970.
- Corral, D.A., Amling, M., Priemel, M., Loyer, E., Fuchs, S., Ducy, P., Baron, R., and Karsenty, G. (1998). Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 13835–13840.
- Couldrey, C., and Green, J.E. (2000). Metastases: the glycan connection. *Breast Cancer Res. BCR* *2*, 321–323.
- Crockett, J.C., Rogers, M.J., Coxon, F.P., Hocking, L.J., and Helfrich, M.H. (2011). Bone remodelling at a glance. *J. Cell Sci.* *124*, 991–998.
- Dallol, A., Da Silva, N.F., Viacava, P., Minna, J.D., Bieche, I., Maher, E.R., and Latif, F. (2002a). SLIT2, a human homologue of the Drosophila Slit2 gene, has tumor suppressor activity and is frequently inactivated in lung and breast cancers. *Cancer Res.* *62*, 5874–5880.
- Dallol, A., Forgacs, E., Martinez, A., Sekido, Y., Walker, R., Kishida, T., Rabbitts, P., Maher, E.R., Minna, J.D., and Latif, F. (2002b). Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers. *Oncogene* *21*, 3020–3028.

- Dallol, A., Krex, D., Hesson, L., Eng, C., Maher, E.R., and Latif, F. (2003a). Frequent epigenetic inactivation of the SLIT2 gene in gliomas. *Oncogene* **22**, 4611–4616.
- Dallol, A., Morton, D., Maher, E.R., and Latif, F. (2003b). SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res.* **63**, 1054–1058.
- Delaisse, J.-M. (2014). The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *BoneKEy Rep.* **3**, 561.
- Delloye-Bourgeois, C., Jacquier, A., Charoy, C., Reynaud, F., Nawabi, H., Thoinet, K., Kindbeiter, K., Yoshida, Y., Zagar, Y., Kong, Y., et al. (2015). PlexinA1 is a new Slit receptor and mediates axon guidance function of Slit C-terminal fragments. *Nat. Neurosci.* **18**, 36–45.
- Denoyelle, C., Hong, L., Vannier, J.-P., Soria, J., and Soria, C. (2003). New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *Br. J. Cancer* **88**, 1631–1640.
- Desgrosellier, J.S., and Cheresh, D.A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 9–22.
- Dickinson, R.E., Dallol, A., Bieche, I., Krex, D., Morton, D., Maher, E.R., and Latif, F. (2004). Epigenetic inactivation of SLIT3 and SLIT1 genes in human cancers. *Br. J. Cancer* **91**, 2071–2078.
- Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* **495**, 231–235.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**, 747–754.
- Dunaway, C.M., Hwang, Y., Lindsley, C.W., Cook, R.S., Wu, J.Y., Boothby, M., Chen, J., and Brantley-Sieders, D.M. (2011). Cooperative signaling between Slit2 and Ephrin-A1 regulates a balance between angiogenesis and angiostasis. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 404–416.
- Dunn, L.K., Mohammad, K.S., Fournier, P.G.J., McKenna, C.R., Davis, H.W., Niewolna, M., Peng, X.H., Chirgwin, J.M., and Guise, T.A. (2009). Hypoxia and TGF-beta drive breast cancer bone metastases through parallel signaling pathways in tumor cells and the bone microenvironment. *PLoS One* **4**, e6896.
- Dunwell, T.L., Dickinson, R.E., Stankovic, T., Dallol, A., Weston, V., Austen, B., Catchpoole, D., Maher, E.R., and Latif, F. (2009). Frequent epigenetic inactivation of the SLIT2 gene in chronic and acute lymphocytic leukemia. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* **4**, 265–269.
- Duong, L.T., Wesolowski, G.A., Leung, P., Oballa, R., and Pickarski, M. (2014). Efficacy of a cathepsin K inhibitor in a preclinical model for prevention and treatment of breast cancer bone metastasis. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 2898–2909.
- Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161–174.
- Eleftheriou, F., Ahn, J.D., Takeda, S., Starbuck, M., Yang, X., Liu, X., Kondo, H., Richards, W.G., Bannon, T.W., Noda, M., et al. (2005). Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* **434**, 514–520.
- Elston, C.W., and Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19**, 403–410.
- El Touny, L.H., Vieira, A., Mendoza, A., Khanna, C., Hoenerhoff, M.J., and Green, J.E. (2014). Combined SFK/MEK inhibition prevents metastatic outgrowth of dormant tumor cells. *J. Clin. Invest.* **124**, 156–168.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Cox, T.R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q.-T., and Giaccia, A.J. (2009). Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* **15**, 35–44.
- Evans, T.A., and Bashaw, G.J. (2010). Functional diversity of Robo receptor immunoglobulin domains promotes distinct axon guidance decisions. *Curr. Biol. CB* **20**, 567–572.

- Feduska, J.M., Garcia, P.L., Brennan, S.B., Bu, S., Council, L.N., and Yoon, K.J. (2013). N-glycosylation of ICAM-2 is required for ICAM-2-mediated complete suppression of metastatic potential of SK-N-AS neuroblastoma cells. *BMC Cancer* 13, 261.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458.
- Fish, J.E., Wythe, J.D., Xiao, T., Bruneau, B.G., Stainier, D.Y.R., Srivastava, D., and Woo, S. (2011). A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* 138, 1409–1419.
- Forsberg, E.C., Prohaska, S.S., Katzman, S., Heffner, G.C., Stuart, J.M., and Weissman, I.L. (2005). Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS Genet.* 1, e28.
- Fournier, T., Guibourdenche, J., and Evain-Brion, D. (2015). Review: hCGs: Different sources of production, different glycoforms and functions. *Placenta* 36 *Suppl 1*, S60–S65.
- Fritz, J.L., and VanBerkum, M.F.A. (2002). Regulation of rho family GTPases is required to prevent axons from crossing the midline. *Dev. Biol.* 252, 46–58.
- Fukuhara, N., Howitt, J.A., Hussain, S.-A., and Hohenester, E. (2008). Structural and functional analysis of slit and heparin binding to immunoglobulin-like domains 1 and 2 of *Drosophila* Robo. *J. Biol. Chem.* 283, 16226–16234.
- Fulciniti, M., Tassone, P., Hideshima, T., Vallet, S., Nanjappa, P., Ettenberg, S.A., Shen, Z., Patel, N., Tai, Y.-T., Chauhan, D., et al. (2009). Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood* 114, 371–379.
- Le Gall, C., Bellahcène, A., Bonnelye, E., Gasser, J.A., Castronovo, V., Green, J., Zimmermann, J., and Clézardin, P. (2007). A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Res.* 67, 9894–9902.
- Gay, L.J., and Felding-Habermann, B. (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 11, 123–134.
- Geutskens, S.B., Andrews, W.D., van Stalborch, A.-M.D., Brussen, K., Holtrop-de Haan, S.E., Parnavelas, J.G., Hordijk, P.L., and van Hennik, P.B. (2012). Control of human hematopoietic stem/progenitor cell migration by the extracellular matrix protein Slit3. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 92, 1129–1139.
- Ghilardi, J.R., Freeman, K.T., Jimenez-Andrade, J.M., Mantyh, W.G., Bloom, A.P., Bouhana, K.S., Trollinger, D., Winkler, J., Lee, P., Andrews, S.W., et al. (2011). Sustained blockade of neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC reduces non-malignant skeletal pain but not the maintenance of sensory and sympathetic nerve fibers. *Bone* 48, 389–398.
- Giannoni, E., Bianchini, F., Masieri, L., Serni, S., Torre, E., Calorini, L., and Chiarugi, P. (2010). Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res.* 70, 6945–6956.
- Gladson, C.L., and Welch, D.R. (2008). New insights into the role of CXCR4 in prostate cancer metastasis. *Cancer Biol. Ther.* 7, 1849–1851.
- Göhrig, A., Detjen, K.M., Hilfenhaus, G., Körner, J.L., Welzel, M., Arsenic, R., Schmuck, R., Bahra, M., Wu, J.Y., Wiedenmann, B., et al. (2014). Axon guidance factor SLIT2 inhibits neural invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 74, 1529–1540.
- Goto-Koshino, Y., Fukuchi, Y., Shibata, F., Abe, D., Kuroda, K., Okamoto, S., Kitamura, T., and Nakajima, H. (2012). Robo4 plays a role in bone marrow homing and mobilization, but is not essential in the long-term repopulating capacity of hematopoietic stem cells. *PLoS One* 7, e50849.
- Grellier, M., Ferreira-Tojais, N., Bourget, C., Bareille, R., Guillemot, F., and Amédée, J. (2009). Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells. *J. Cell. Biochem.* 106, 390–398.
- Gröne, J., Doeblner, O., Loddenkemper, C., Hotz, B., Buhr, H.-J., and Bhargava, S. (2006). Robo1/Robo4: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 15, 1437–1443.

- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W.W., Izpisua Belmonte, J.C., and Choe, S. (2002). Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* *420*, 636–642.
- Guerrier, S., Coutinho-Budd, J., Sassa, T., Gresset, A., Jordan, N.V., Chen, K., Jin, W.-L., Frost, A., and Polleux, F. (2009). The F-BAR domain of srGAP2 induces membrane protrusions required for neuronal migration and morphogenesis. *Cell* *138*, 990–1004.
- Guise, T.A., Yin, J.J., Thomas, R.J., Dallas, M., Cui, Y., and Gillespie, M.T. (2002). Parathyroid hormone-related protein (PTHrP)-(1-139) isoform is efficiently secreted in vitro and enhances breast cancer metastasis to bone in vivo. *Bone* *30*, 670–676.
- Gupta, G.P., and Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* *127*, 679–695.
- Halvorson, K.G., Kubota, K., Sevcik, M.A., Lindsay, T.H., Sotillo, J.E., Ghilardi, J.R., Rosol, T.J., Boustany, L., Shelton, D.L., and Mantyh, P.W. (2005). A blocking antibody to nerve growth factor attenuates skeletal pain induced by prostate tumor cells growing in bone. *Cancer Res.* *65*, 9426–9435.
- Hayashi, M., Nakashima, T., Taniguchi, M., Kodama, T., Kumanogoh, A., and Takayanagi, H. (2012). Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature* *485*, 69–74.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* *291*, 2364–2369.
- Henderson, M.A., Danks, J.A., Slavin, J.L., Byrnes, G.B., Choong, P.F.M., Spillane, J.B., Hopper, J.L., and Martin, T.J. (2006). Parathyroid hormone-related protein localization in breast cancers predict improved prognosis. *Cancer Res.* *66*, 2250–2256.
- Herbert, S.P., and Stainier, D.Y.R. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 551–564.
- Hiraga, T., Kizaka-Kondoh, S., Hirota, K., Hiraoka, M., and Yoneda, T. (2007). Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. *Cancer Res.* *67*, 4157–4163.
- Hiraga, T., Myoui, A., Hashimoto, N., Sasaki, A., Hata, K., Morita, Y., Yoshikawa, H., Rosen, C.J., Mundy, G.R., and Yoneda, T. (2012). Bone-derived IGF mediates crosstalk between bone and breast cancer cells in bony metastases. *Cancer Res.* *72*, 4238–4249.
- Hivert, B., Liu, Z., Chuang, C.-Y., Doherty, P., and Sundaresan, V. (2002). Robo1 and Robo2 are homophilic binding molecules that promote axonal growth. *Mol. Cell. Neurosci.* *21*, 534–545.
- Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Boyle, W.J., and Riggs, B.L. (2000). The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *15*, 2–12.
- Hohenester, E. (2008). Structural insight into Slit-Robo signalling. *Biochem. Soc. Trans.* *36*, 251–256.
- Houston, B., Stewart, A.J., and Farquharson, C. (2004). PHOSPHO1-A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralisation in bone and cartilage. *Bone* *34*, 629–637.
- Howlader, N., Chen, V.W., Ries, L.A.G., Loch, M.M., Lee, R., DeSantis, C., Lin, C.C., Ruhl, J., and Cronin, K.A. (2014). Overview of breast cancer collaborative stage data items--their definitions, quality, usage, and clinical implications: a review of SEER data for 2004-2010. *Cancer* *120 Suppl 23*, 3771–3780.
- Hsu, Y.-C., and Fuchs, E. (2012). A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 103–114.
- Hu, H. (2001). Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein. *Nat. Neurosci.* *4*, 695–701.
- Hu, H., Li, M., Labrador, J.-P., McEwen, J., Lai, E.C., Goodman, C.S., and Bashaw, G.J. (2005). Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse links the Roundabout receptor to Rac to regulate midline repulsion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 4613–4618.

- Huang, J.C., Sakata, T., Pflieger, L.L., Bencsik, M., Halloran, B.P., Bikle, D.D., and Nissenson, R.A. (2004). PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *19*, 235–244.
- Huang, L., Yu, W., Li, X., Niu, L., Li, K., and Li, J. (2009). Robo1/Robo4: different expression patterns in retinal development. *Exp. Eye Res.* *88*, 583–588.
- Huang, Z., Wen, P., Kong, R., Cheng, H., Zhang, B., Quan, C., Bian, Z., Chen, M., Zhang, Z., Chen, X., et al. (2014). USP33 mediates Slit-Robo signaling in inhibiting colorectal cancer cell migration. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.*
- Hume, D.A. (2008). Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal Immunol.* *1*, 432–441.
- Huminięcki, L., Gorn, M., Suchting, S., Poulson, R., and Bicknell, R. (2002). Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics* *79*, 547–552.
- Hussain, S.-A., Piper, M., Fukuhara, N., Strohlic, L., Cho, G., Howitt, J.A., Ahmed, Y., Powell, A.K., Turnbull, J.E., Holt, C.E., et al. (2006). A molecular mechanism for the heparan sulfate dependence of slit-robo signaling. *J. Biol. Chem.* *281*, 39693–39698.
- Institut National du Cancer (2015). Les cancers en France en 2014 - L'essentiel des faits et chiffres.
- Irie, N., Takada, Y., Watanabe, Y., Matsuzaki, Y., Naruse, C., Asano, M., Iwakura, Y., Suda, T., and Matsuo, K. (2009). Bidirectional signaling through ephrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis. *J. Biol. Chem.* *284*, 14637–14644.
- Ito, S., Nakanishi, H., Ikehara, Y., Kato, T., Kasai, Y., Ito, K., Akiyama, S., Nakao, A., and Tatematsu, M. (2001). Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *93*, 212–217.
- Janik, M.E., Lityńska, A., and Vereecken, P. (2010). Cell migration-the role of integrin glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* *1800*, 545–555.
- Javed, A., Barnes, G.L., Pratap, J., Antkowiak, T., Gerstenfeld, L.C., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B., and Stein, G.S. (2005). Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3/CBFA1) transcription factors in breast cancer cells inhibits osteolysis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1454–1459.
- Jensen, P.R., Andersen, T.L., Hauge, E.-M., Bollerslev, J., and Delaissé, J.-M. (2015). A joined role of canopy and reversal cells in bone remodeling--lessons from glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* *73*, 16–23.
- Jimenez-Andrade, J.M., Bloom, A.P., Stake, J.I., Mantyh, W.G., Taylor, R.N., Freeman, K.T., Ghilardi, J.R., Kuskowski, M.A., and Mantyh, P.W. (2010). Pathological sprouting of adult nociceptors in chronic prostate cancer-induced bone pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 14649–14656.
- Jin, J., You, H., Yu, B., Deng, Y., Tang, N., Yao, G., Shu, H., Yang, S., and Qin, W. (2009). Epigenetic inactivation of SLIT2 in human hepatocellular carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *379*, 86–91.
- Joeckel, E., Haber, T., Prawitt, D., Junker, K., Hampel, C., Thüroff, J.W., Roos, F.C., and Brenner, W. (2014). High calcium concentration in bones promotes bone metastasis in renal cell carcinomas expressing calcium-sensing receptor. *Mol. Cancer* *13*, 42.
- Johnson, K.G., Ghose, A., Epstein, E., Lincecum, J., O'Connor, M.B., and Van Vactor, D. (2004). Axonal heparan sulfate proteoglycans regulate the distribution and efficiency of the repellent slit during midline axon guidance. *Curr. Biol. CB* *14*, 499–504.
- Jones, C.A., London, N.R., Chen, H., Park, K.W., Sauvaget, D., Stockton, R.A., Wythe, J.D., Suh, W., Larrieu-Lahargue, F., Mukoyama, Y.-S., et al. (2008). Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. *Nat. Med.* *14*, 448–453.
- Jones, C.A., Nishiya, N., London, N.R., Zhu, W., Sorensen, L.K., Chan, A.C., Lim, C.J., Chen, H., Zhang, Q., Schultz, P.G., et al. (2009). Slit2-Robo4 signalling promotes vascular stability by blocking Arf6 activity. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1325–1331.

- Jones, D.H., Nakashima, T., Sanchez, O.H., Koziarzki, I., Komarova, S.V., Sarosi, I., Morony, S., Rubin, E., Sarao, R., Hojilla, C.V., et al. (2006). Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440, 692–696.
- Joo, Y.N., Jin, H., Eun, S.Y., Park, S.W., Chang, K.C., and Kim, H.J. (2014). P2Y2R activation by nucleotides released from the highly metastatic breast cancer cell MDA-MB-231 contributes to pre-metastatic niche formation by mediating lysyl oxidase secretion, collagen crosslinking, and monocyte recruitment. *Oncotarget* 5, 9322–9334.
- Juárez, P., and Guise, T.A. (2011). TGF- β in cancer and bone: implications for treatment of bone metastases. *Bone* 48, 23–29.
- Junankar, S., Shay, G., Jurczyk, J., Ali, N., Down, J., Pocock, N., Parker, A., Nguyen, A., Sun, S., Kashemirov, B., et al. (2015). Real-time intravital imaging establishes tumor-associated macrophages as the extraskelatal target of bisphosphonate action in cancer. *Cancer Discov.* 5, 35–42.
- Kang, S., and Kumanogoh, A. (2013). Semaphorins in bone development, homeostasis, and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 163–171.
- Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438, 820–827.
- Karsenty, G. (2008). Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 183–196.
- Kaur, S., Castellone, M.D., Bedell, V.M., Konar, M., Gutkind, J.S., and Ramchandran, R. (2006). Robo4 signaling in endothelial cells implies attraction guidance mechanisms. *J. Biol. Chem.* 281, 11347–11356.
- Kaur, S., Samant, G.V., Pramanik, K., Loscombe, P.W., Pendrak, M.L., Roberts, D.D., and Ramchandran, R. (2008). Silencing of directional migration in roundabout4 knockdown endothelial cells. *BMC Cell Biol.* 9, 61.
- Keleman, K., Ribeiro, C., and Dickson, B.J. (2005). Comm function in commissural axon guidance: cell-autonomous sorting of Robo in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 156–163.
- Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M.C.U., Voduc, D., Speers, C.H., Nielsen, T.O., and Gelmon, K. (2010). Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 3271–3277.
- Khusial, P.R., Vadla, B., Krishnan, H., Ramlall, T.F., Shen, Y., Ichikawa, H., Geng, J.-G., and Goldberg, G.S. (2010). Src activates Abl to augment Robo1 expression in order to promote tumor cell migration. *Oncotarget* 1, 198–209.
- Kim, H.K., Zhang, H., Li, H., Wu, T.-T., Swisher, S., He, D., Wu, L., Xu, J., Elmets, C.A., Athar, M., et al. (2008). Slit2 inhibits growth and metastasis of fibrosarcoma and squamous cell carcinoma. *Neoplasia N. Y. N* 10, 1411–1420.
- Kimura, T., Kuwata, T., Ashimine, S., Yamazaki, M., Yamauchi, C., Nagai, K., Ikehara, A., Feng, Y., Dimitrov, D.S., Saito, S., et al. (2010). Targeting of bone-derived insulin-like growth factor-II by a human neutralizing antibody suppresses the growth of prostate cancer cells in a human bone environment. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 121–129.
- Kingsley, L.A., Fournier, P.G.J., Chirgwin, J.M., and Guise, T.A. (2007). Molecular biology of bone metastasis. *Mol. Cancer Ther.* 6, 2609–2617.
- Koch, A.W., Mathivet, T., Larrivé, B., Tong, R.K., Kowalski, J., Pibouin-Fragner, L., Bouvrée, K., Stawicki, S., Nicholes, K., Rathore, N., et al. (2011). Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B. *Dev. Cell* 20, 33–46.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., et al. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755–764.
- Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., et al. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315–323.

- Kopper, L. (2012). Denosumab--a powerful RANKL inhibitor to stop lytic metastases and other bone loss actions by osteoclasts. *Pathol. Oncol. Res. POR* 18, 743–747.
- Krishnan, V., Moore, T.L., Ma, Y.L., Helvering, L.M., Frolik, C.A., Valasek, K.M., Ducy, P., and Geiser, A.G. (2003). Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 17, 423–435.
- Kristensen, H.B., Andersen, T.L., Marcussen, N., Rolighed, L., and Delaisse, J.-M. (2014). Osteoblast recruitment routes in human cancellous bone remodeling. *Am. J. Pathol.* 184, 778–789.
- Kusumbe, A.P., Ramasamy, S.K., and Adams, R.H. (2014). Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* 507, 323–328.
- Kwan Tat, S., Padrines, M., Théoleyre, S., Heymann, D., and Fortun, Y. (2004). IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 49–60.
- Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., et al. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165–176.
- Lacey, D.L., Boyle, W.J., Simonet, W.S., Kostenuik, P.J., Dougall, W.C., Sullivan, J.K., San Martin, J., and Dansey, R. (2012). Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 401–419.
- Latil, A., Chêne, L., Cochant-Priollet, B., Mangin, P., Fournier, G., Berthon, P., and Cussenot, O. (2003). Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 103, 306–315.
- Leto, G. (2010). Activin A and bone metastasis. *J. Cell. Physiol.* 225, 302–309.
- Lévesque, J.-P., Helwani, F.M., and Winkler, I.G. (2010). The endosteal “osteoblastic” niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia* 24, 1979–1992.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689.
- Leyva-Díaz, E., del Toro, D., Menal, M.J., Cambray, S., Susín, R., Tessier-Lavigne, M., Klein, R., Egea, J., and López-Bendito, G. (2014). FLRT3 is a Robo1-interacting protein that determines Netrin-1 attraction in developing axons. *Curr. Biol. CB* 24, 494–508.
- Li, S.L., Liang, S.J., Guo, N., Wu, A.M., and Fujita-Yamaguchi, Y. (2000). Single-chain antibodies against human insulin-like growth factor I receptor: expression, purification, and effect on tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 49, 243–252.
- Li, Y.-P., Chen, W., Liang, Y., Li, E., and Stashenko, P. (1999). Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat. Genet.* 23, 447–451.
- Liang, Z., Brooks, J., Willard, M., Liang, K., Yoon, Y., Kang, S., and Shim, H. (2007). CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 716–722.
- Liao, D., Corle, C., Seagroves, T.N., and Johnson, R.S. (2007). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res.* 67, 563–572.
- Liao, J., Schneider, A., Datta, N.S., and McCauley, L.K. (2006). Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res.* 66, 9065–9073.
- Liao, W.-X., Laurent, L.C., Agent, S., Hodges, J., and Chen, D.-B. (2012). Human placental expression of SLIT/ROBO signaling cues: effects of preeclampsia and hypoxia. *Biol. Reprod.* 86, 111.
- Lin, G.L., and Hankenson, K.D. (2011). Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem.* 112, 3491–3501.

- Liu, D., Hou, J., Hu, X., Wang, X., Xiao, Y., Mou, Y., and De Leon, H. (2006). Neuronal chemorepellent Slit2 inhibits vascular smooth muscle cell migration by suppressing small GTPase Rac1 activation. *Circ. Res.* *98*, 480–489.
- Liu, J., Zhang, L., Wang, D., Shen, H., Jiang, M., Mei, P., Hayden, P.S., Sedor, J.R., and Hu, H. (2003). Congenital diaphragmatic hernia, kidney agenesis and cardiac defects associated with Slit3-deficiency in mice. *Mech. Dev.* *120*, 1059–1070.
- Liu, Z., Patel, K., Schmidt, H., Andrews, W., Pini, A., and Sundaresan, V. (2004). Extracellular Ig domains 1 and 2 of Robo are important for ligand (Slit) binding. *Mol. Cell. Neurosci.* *26*, 232–240.
- London, N.R., Zhu, W., Bozza, F.A., Smith, M.C.P., Greif, D.M., Sorensen, L.K., Chen, L., Kaminoh, Y., Chan, A.C., Passi, S.F., et al. (2010). Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci. Transl. Med.* *2*, 23ra19.
- Lu, X., Wang, Q., Hu, G., Van Poznak, C., Fleisher, M., Reiss, M., Massagué, J., and Kang, Y. (2009). ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes Dev.* *23*, 1882–1894.
- Lundström, A., Gallio, M., Englund, C., Steneberg, P., Hemphälä, J., Aspenström, P., Keleman, K., Falileeva, L., Dickson, B.J., and Samakovlis, C. (2004). Vlse, a conserved Rac/Cdc42 GAP mediating Robo repulsion in tracheal cells and axons. *Genes Dev.* *18*, 2161–2171.
- Luo, L. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *18*, 601–635.
- Lynch, C.C., Hikosaka, A., Acuff, H.B., Martin, M.D., Kawai, N., Singh, R.K., Vargo-Gogola, T.C., Begtrup, J.L., Peterson, T.E., Fingleton, B., et al. (2005). MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell* *7*, 485–496.
- Mach, D.B., Rogers, S.D., Sabino, M.C., Luger, N.M., Schwei, M.J., Pomonis, J.D., Keyser, C.P., Clohisy, D.R., Adams, D.J., O'Leary, P., et al. (2002). Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience* *113*, 155–166.
- Mantyh, P. (2013). Bone cancer pain: causes, consequences, and therapeutic opportunities. *Pain* *154 Suppl 1*, S54–S62.
- Mao, Y., Huang, X., Zhao, J., and Gu, Z. (2011). Preliminary identification of potential PDZ-domain proteins downstream of ephrin B2 during osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *Int. J. Mol. Med.* *27*, 669–677.
- Marlow, R., Strickland, P., Lee, J.S., Wu, X., Pebenito, M., Binnewies, M., Le, E.K., Moran, A., Macias, H., Cardiff, R.D., et al. (2008). SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium. *Cancer Res.* *68*, 7819–7827.
- Marlow, R., Binnewies, M., Sorensen, L.K., Monica, S.D., Strickland, P., Forsberg, E.C., Li, D.Y., and Hinck, L. (2010). Vascular Robo4 restricts proangiogenic VEGF signaling in breast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 10520–10525.
- Matsuguchi, T., Chiba, N., Bandow, K., Kakimoto, K., Masuda, A., and Ohnishi, T. (2009). JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *24*, 398–410.
- Matsuo, K., and Otaki, N. (2012). Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases. *Cell Adhes. Migr.* *6*, 148–156.
- McNamee, K.E., Burleigh, A., Gompels, L.L., Feldmann, M., Allen, S.J., Williams, R.O., Dawbarn, D., Vincent, T.L., and Inglis, J.J. (2010). Treatment of murine osteoarthritis with TrkAd5 reveals a pivotal role for nerve growth factor in non-inflammatory joint pain. *Pain* *149*, 386–392.
- Mehlen, P., Delloy-Bourgeois, C., and Chédotal, A. (2011). Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat. Rev. Cancer* *11*, 188–197.
- Van der Meijden, K., Lips, P., van Driel, M., Heijboer, A.C., Schulten, E.A.J.M., den Heijer, M., and Bravenboer, N. (2014). Primary human osteoblasts in response to 25-hydroxyvitamin D3, 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 24R,25-dihydroxyvitamin D3. *PLoS One* *9*, e110283.

- Mendelson, A., and Frenette, P.S. (2014). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat. Med.* *20*, 833–846.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* *466*, 829–834.
- Mendoza-Villanueva, D., Zeef, L., and Shore, P. (2011). Metastatic breast cancer cells inhibit osteoblast differentiation through the Runx2/CBFB β -dependent expression of the Wnt antagonist, sclerostin. *Breast Cancer Res. BCR* *13*, R106.
- Mihai, R., Stevens, J., McKinney, C., and Ibrahim, N.B.N. (2006). Expression of the calcium receptor in human breast cancer--a potential new marker predicting the risk of bone metastases. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* *32*, 511–515.
- Miyamoto, K., Yoshida, S., Kawasumi, M., Hashimoto, K., Kimura, T., Sato, Y., Kobayashi, T., Miyauchi, Y., Hoshi, H., Iwasaki, R., et al. (2011). Osteoclasts are dispensable for hematopoietic stem cell maintenance and mobilization. *J. Exp. Med.* *208*, 2175–2181.
- Morlot, C., Thielens, N.M., Ravelli, R.B.G., Hemrika, W., Romijn, R.A., Gros, P., Cusack, S., and McCarthy, A.A. (2007). Structural insights into the Slit-Robo complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 14923–14928.
- Morrison, S.J., Uchida, N., and Weissman, I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11*, 35–71.
- Mukherjee, D., and Zhao, J. (2013). The role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *Am. J. Cancer Res.* *3*, 46–57.
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* *410*, 50–56.
- Murai, K.K., and Pasquale, E.B. (2003). “Eph”ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J. Cell Sci.* *116*, 2823–2832.
- Myat, A., Henry, P., McCabe, V., Flintoft, L., Rotin, D., and Tear, G. (2002). Drosophila Nedd4, a ubiquitin ligase, is recruited by Commissureless to control cell surface levels of the roundabout receptor. *Neuron* *35*, 447–459.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* *108*, 17–29.
- Nannuru, K.C., Futakuchi, M., Varney, M.L., Vincent, T.M., Marcusson, E.G., and Singh, R.K. (2010). Matrix metalloproteinase (MMP)-13 regulates mammary tumor-induced osteolysis by activating MMP9 and transforming growth factor-beta signaling at the tumor-bone interface. *Cancer Res.* *70*, 3494–3504.
- Narayan, G., Goparaju, C., Arias-Pulido, H., Kaufmann, A.M., Schneider, A., Dürst, M., Mansukhani, M., Pothuri, B., and Murty, V.V. (2006). Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression. *Mol. Cancer* *5*, 16.
- Naumov, G.N., Bender, E., Zurakowski, D., Kang, S.-Y., Sampson, D., Flynn, E., Watnick, R.S., Straume, O., Akslen, L.A., Folkman, J., et al. (2006). A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J. Natl. Cancer Inst.* *98*, 316–325.
- Nawabi, H., and Castellani, V. (2011). Axonal commissures in the central nervous system: how to cross the midline? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *68*, 2539–2553.
- Negishi-Koga, T., Shinohara, M., Komatsu, N., Bito, H., Kodama, T., Friedel, R.H., and Takayanagi, H. (2011). Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat. Med.* *17*, 1473–1480.
- Nilsson, S.K., Johnston, H.M., Whitty, G.A., Williams, B., Webb, R.J., Denhardt, D.T., Bertoncello, I., Bendall, L.J., Simmons, P.J., and Haylock, D.N. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* *106*, 1232–1239.
- Ning, Y., Sun, Q., Dong, Y., Xu, W., Zhang, W., Huang, H., and Li, Q. (2011). Slit2-N inhibits PDGF-induced migration in rat airway smooth muscle cells: WASP and Arp2/3 involved. *Toxicology* *283*, 32–40.

- Novinec, M., and Lenarčič, B. (2013). Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *Biol. Chem.* *394*, 1163–1179.
- Nural, H.F., Todd Farmer, W., and Mastick, G.S. (2007). The Slit receptor Robo1 is predominantly expressed via the Dutt1 alternative promoter in pioneer neurons in the embryonic mouse brain and spinal cord. *Gene Expr. Patterns GEP* *7*, 837–845.
- Ocaña, O.H., Córcoles, R., Fabra, A., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., Barrallo-Gimeno, A., Cano, A., and Nieto, M.A. (2012). Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell* *22*, 709–724.
- Okada, Y., Yano, K., Jin, E., Funahashi, N., Kitayama, M., Doi, T., Spokes, K., Beeler, D.L., Shih, S.-C., Okada, H., et al. (2007). A three-kilobase fragment of the human Robo4 promoter directs cell type-specific expression in endothelium. *Circ. Res.* *100*, 1712–1722.
- Okada, Y., Jin, E., Nikolova-Krstevski, V., Yano, K., Liu, J., Beeler, D., Spokes, K., Kitayama, M., Funahashi, N., Doi, T., et al. (2008). A GABP-binding element in the Robo4 promoter is necessary for endothelial expression in vivo. *Blood* *112*, 2336–2339.
- Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., and Nagasawa, T. (2010). The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* *33*, 387–399.
- Ota, I., Li, X.-Y., Hu, Y., and Weiss, S.J. (2009). Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20318–20323.
- Pacifici, R. (1996). Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *11*, 1043–1051.
- Papachristou, D.J., Basdra, E.K., and Papavassiliou, A.G. (2012). Bone metastases: molecular mechanisms and novel therapeutic interventions. *Med. Res. Rev.* *32*, 611–636.
- Park, K.W., Morrison, C.M., Sorensen, L.K., Jones, C.A., Rao, Y., Chien, C.-B., Wu, J.Y., Urness, L.D., and Li, D.Y. (2003). Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Dev. Biol.* *261*, 251–267.
- Pasterkamp, R.J., and Kolodkin, A.L. (2013). SnapShot: Axon Guidance. *Cell* *153*, 494, 494e1–e2.
- Paul, J.D., Coulombe, K.L.K., Toth, P.T., Zhang, Y., Marsboom, G., Bindokas, V.P., Smith, D.W., Murry, C.E., and Rehman, J. (2013). SLIT3-ROBO4 activation promotes vascular network formation in human engineered tissue and angiogenesis in vivo. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *64*, 124–131.
- Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., et al. (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* *283*, 845–848.
- Philipp, M., Niederkofler, V., Debrunner, M., Alther, T., Kunz, B., and Stoeckli, E.T. (2012). RabGDI controls axonal midline crossing by regulating Robo1 surface expression. *Neural Develop.* *7*, 36.
- Prager, G.W., Poettler, M., Unseld, M., and Zielinski, C.C. (2011). Angiogenesis in cancer: anti-VEGF escape mechanisms. *Transl. Lung Cancer Res.* *1*, 14–25.
- Prasad, A., Fernandis, A.Z., Rao, Y., and Ganju, R.K. (2004). Slit protein-mediated inhibition of CXCR4-induced chemotactic and chemoinvasive signaling pathways in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 9115–9124.
- Prasad, A., Paruchuri, V., Preet, A., Latif, F., and Ganju, R.K. (2008). Slit-2 induces a tumor-suppressive effect by regulating beta-catenin in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 26624–26633.
- Radisky, E.S., and Radisky, D.C. (2010). Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *15*, 201–212.
- Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E., and Dickson, B.J. (2000). Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the Drosophila CNS. *Cell* *103*, 1033–1045.
- Ray, P., Stacer, A.C., Fenner, J., Cavnar, S.P., Meguiar, K., Brown, M., Luker, K.E., and Luker, G.D. (2014). CXCL12-γ in primary tumors drives breast cancer metastasis. *Oncogene* *o*.

- Rhee, J., Buchan, T., Zukerberg, L., Lilien, J., and Balsamo, J. (2007). Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat. Cell Biol.* *9*, 883–892.
- Richert, M.M., Vaidya, K.S., Mills, C.N., Wong, D., Korz, W., Hurst, D.R., and Welch, D.R. (2009). Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone. *Oncol. Rep.* *21*, 761–767.
- Rodan, G.A. (1998). Bone homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 13361–13362.
- Romero, I., Garrido, F., and Garcia-Lora, A.M. (2014). A novel preclinical murine model of immune-mediated metastatic dormancy. *Oncoimmunology* *3*, e29258.
- Rucci, N., Susa, M., and Teti, A. (2008). Inhibition of protein kinase c-Src as a therapeutic approach for cancer and bone metastases. *Anticancer Agents Med. Chem.* *8*, 342–349.
- Sabatier, C., Plump, A.S., Le Ma, null, Brose, K., Tamada, A., Murakami, F., Lee, E.Y.-H.P., and Tessier-Lavigne, M. (2004). The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* *117*, 157–169.
- Sabbota, A.L., Kim, H.-R.C., Zhe, X., Fridman, R., Bonfil, R.D., and Cher, M.L. (2010). Shedding of RANKL by tumor-associated MT1-MMP activates Src-dependent prostate cancer cell migration. *Cancer Res.* *70*, 5558–5566.
- Saito, H., Tsunenari, T., Onuma, E., Sato, K., Ogata, E., and Yamada-Okabe, H. (2005). Humanized monoclonal antibody against parathyroid hormone-related protein suppresses osteolytic bone metastasis of human breast cancer cells derived from MDA-MB-231. *Anticancer Res.* *25*, 3817–3823.
- Samant, G.V., Schupp, M.O., François, M., Moleri, S., Kothinti, R.K., Chun, C.Z., Sinha, I., Sellars, S., Leigh, N., Pramanik, K., et al. (2011). Sox factors transcriptionally regulate ROBO4 gene expression in developing vasculature in zebrafish. *J. Biol. Chem.* *286*, 30740–30747.
- Sanders, J.L., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Yamaguchi, T., and Brown, E.M. (2001). Ca²⁺-sensing receptor expression and PTHrP secretion in PC-3 human prostate cancer cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *281*, E1267–E1274.
- Sapir-Koren, R., and Livshits, G. (2011). Bone mineralization and regulation of phosphate homeostasis. *IBMS BoneKEy* *8*, 286–300.
- Schmid, B.C., Rezniczek, G.A., Fabjani, G., Yoneda, T., Leodolter, S., and Zeillinger, R. (2007). The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *106*, 333–342.
- Schulz, J.G., Ceulemans, H., Caussinus, E., Baietti, M.F., Affolter, M., Hassan, B.A., and David, G. (2011). *Drosophila* syndecan regulates tracheal cell migration by stabilizing Robo levels. *EMBO Rep.* *12*, 1039–1046.
- Schwaninger, R., Rentsch, C.A., Wetterwald, A., van der Horst, G., van Bezooijen, R.L., van der Pluijm, G., Löwik, C.W.G.M., Ackermann, K., Pyerin, W., Hamdy, F.C., et al. (2007). Lack of noggin expression by cancer cells is a determinant of the osteoblast response in bone metastases. *Am. J. Pathol.* *170*, 160–175.
- Secondini, C., Wetterwald, A., Schwaninger, R., Thalmann, G.N., and Cecchini, M.G. (2011). The role of the BMP signaling antagonist noggin in the development of prostate cancer osteolytic bone metastasis. *PLoS One* *6*, e16078.
- Secq, V., Leca, J., Bressy, C., Guillaumond, F., Skrobuk, P., Nigri, J., Lac, S., Lavaut, M.-N., Bui, T.-T., Thakur, A.K., et al. (2015). Stromal SLIT2 impacts on pancreatic cancer-associated neural remodeling. *Cell Death Dis.* *6*, e1592.
- Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., and Goodman, C.S. (1993). Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* *10*, 409–426.
- Seki, M., Watanabe, A., Enomoto, S., Kawamura, T., Ito, H., Kodama, T., Hamakubo, T., and Aburatani, H. (2010). Human ROBO1 is cleaved by metalloproteinases and gamma-secretase and migrates to the nucleus in cancer cells. *FEBS Lett.* *584*, 2909–2915.
- Senaratne, S.G., Pirianov, G., Mansi, J.L., Arnett, T.R., and Colston, K.W. (2000). Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br. J. Cancer* *82*, 1459–1468.

- Sethi, N., Dai, X., Winter, C.G., and Kang, Y. (2011). Tumor-derived Jagged1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell* 19, 192–205.
- Sevcik, M.A., Ghilardi, J.R., Peters, C.M., Lindsay, T.H., Halvorson, K.G., Jonas, B.M., Kubota, K., Kuskowski, M.A., Boustany, L., Shelton, D.L., et al. (2005). Anti-NGF therapy profoundly reduces bone cancer pain and the accompanying increase in markers of peripheral and central sensitization. *Pain* 115, 128–141.
- Sheldon, H., Andre, M., Legg, J.A., Heal, P., Herbert, J.M., Sainson, R., Sharma, A.S., Kitajewski, J.K., Heath, V.L., and Bicknell, R. (2009). Active involvement of Robo1 and Robo4 in filopodia formation and endothelial cell motility mediated via WASP and other actin nucleation-promoting factors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 513–522.
- Shi, Y., and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685–700.
- Shibata, F., Goto-Koshino, Y., Morikawa, Y., Komori, T., Ito, M., Fukuchi, Y., Houchins, J.P., Tsang, M., Li, D.Y., Kitamura, T., et al. (2009). Roundabout 4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the side population phenotype. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 183–190.
- Shiozawa, Y., Pedersen, E.A., Havens, A.M., Jung, Y., Mishra, A., Joseph, J., Kim, J.K., Patel, L.R., Ying, C., Ziegler, A.M., et al. (2011). Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J. Clin. Invest.* 121, 1298–1312.
- Shyu, J.-F., Shih, C., Tseng, C.-Y., Lin, C.-H., Sun, D.-T., Liu, H.-T., Tsung, H.-C., Chen, T.-H., and Lu, R.-B. (2007). Calcitonin induces podosome disassembly and detachment of osteoclasts by modulating Pyk2 and Src activities. *Bone* 40, 1329–1342.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Lüthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., et al. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309–319.
- Simpson, J.H., Bland, K.S., Fetter, R.D., and Goodman, C.S. (2000). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* 103, 1019–1032.
- Sims, N.A., and Martin, T.J. (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKey Rep.* 3, 481.
- Slováková, J., Speicher, S., Sánchez-Soriano, N., Prokop, A., and Carmena, A. (2012). The actin-binding protein Canoe/AF-6 forms a complex with Robo and is required for Slit-Robo signaling during axon pathfinding at the CNS midline. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 10035–10044.
- Small, E.M., Sutherland, L.B., Rajagopalan, K.N., Wang, S., and Olson, E.N. (2010). MicroRNA-218 regulates vascular patterning by modulation of Slit-Robo signaling. *Circ. Res.* 107, 1336–1344.
- Smith, M.C.P., Luker, K.E., Garbow, J.R., Prior, J.L., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., and Luker, G.D. (2004). CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 64, 8604–8612.
- Smith-Berdan, S., Nguyen, A., Hassanein, D., Zimmer, M., Ugarte, F., Ciriza, J., Li, D., García-Ojeda, M.E., Hinck, L., and Forsberg, E.C. (2011). Robo4 cooperates with CXCR4 to specify hematopoietic stem cell localization to bone marrow niches. *Cell Stem Cell* 8, 72–83.
- Smith-Berdan, S., Schepers, K., Ly, A., Passegué, E., and Forsberg, E.C. (2012). Dynamic expression of the Robo ligand Slit2 in bone marrow cell populations. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 675–682.
- Spiegel, A., Shvitiel, S., Kalinkovich, A., Ludin, A., Netzer, N., Goichberg, P., Azaria, Y., Resnick, I., Hardan, I., Ben-Hur, H., et al. (2007). Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat. Immunol.* 8, 1123–1131.
- Spitzweck, B., Brankatschk, M., and Dickson, B.J. (2010). Distinct protein domains and expression patterns confer divergent axon guidance functions for Drosophila Robo receptors. *Cell* 140, 409–420.
- Steigemann, P., Molitor, A., Fellert, S., Jäckle, H., and Vorbrüggen, G. (2004). Heparan sulfate proteoglycan syndecan promotes axonal and myotube guidance by slit/robo signaling. *Curr. Biol. CB* 14, 225–230.

- Stein, E., and Tessier-Lavigne, M. (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* *291*, 1928–1938.
- Stella, M.C., Trusolino, L., and Comoglio, P.M. (2009). The Slit/Robo system suppresses hepatocyte growth factor-dependent invasion and morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* *20*, 642–657.
- Stine, R.R., Greenspan, L.J., Ramachandran, K.V., and Matunis, E.L. (2014). Coordinate regulation of stem cell competition by Slit-Robo and JAK-STAT signaling in the *Drosophila* testis. *PLoS Genet.* *10*, e1004713.
- Stopeck, A.T., Lipton, A., Body, J.-J., Steger, G.G., Tonkin, K., de Boer, R.H., Lichinitser, M., Fujiwara, Y., Yardley, D.A., Viniestra, M., et al. (2010). Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 5132–5139.
- Suchting, S., Heal, P., Tahtis, K., Stewart, L.M., and Bicknell, R. (2005). Soluble Robo4 receptor inhibits in vivo angiogenesis and endothelial cell migration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 121–123.
- Sugiyama, T., and Nagasawa, T. (2012). Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflamm. Allergy Drug Targets* *11*, 201–206.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* *25*, 977–988.
- Sun, H., Dai, K., Tang, T., and Zhang, X. (2009). Regulation of osteoblast differentiation by slit2 in osteoblastic cells. *Cells Tissues Organs* *190*, 69–80.
- Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., Taichman, R.S., Pienta, K.J., and Wang, J. (2010). CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* *29*, 709–722.
- Sun, Y.-X., Schneider, A., Jung, Y., Wang, J., Dai, J., Wang, J., Cook, K., Osman, N.I., Koh-Paige, A.J., Shim, H., et al. (2005). Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *20*, 318–329.
- Sundaresan, V., Chung, G., Heppell-Parton, A., Xiong, J., Grundy, C., Roberts, I., James, L., Cahn, A., Bench, A., Douglas, J., et al. (1998). Homozygous deletions at 3p12 in breast and lung cancer. *Oncogene* *17*, 1723–1729.
- Suominen, M.I., Rissanen, J.P., Käkönen, R., Fagerlund, K.M., Alhoniemi, E., Mumberg, D., Ziegelbauer, K., Halleen, J.M., Käkönen, S.-M., and Scholz, A. (2013). Survival benefit with radium-223 dichloride in a mouse model of breast cancer bone metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* *105*, 908–916.
- Sutherland, H.J., Lansdorp, P.M., Henkelman, D.H., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 3584–3588.
- Suvannasankha, A., and Chirgwin, J.M. (2014). Role of bone-anabolic agents in the treatment of breast cancer bone metastases. *Breast Cancer Res. BCR* *16*, 484.
- Tabarowski, Z., Gibson-Berry, K., and Felten, S.Y. (1996). Noradrenergic and peptidergic innervation of the mouse femur bone marrow. *Acta Histochem.* *98*, 453–457.
- Taichman, R.S. (2005). Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* *105*, 2631–2639.
- Takayanagi, H. (2010). New immune connections in osteoclast formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1192*, 117–123.
- Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D.V.R., Suzuki, K., et al. (2006). Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* *8*, 615–622.
- Tao, K., Fang, M., Alroy, J., and Sahagian, G.G. (2008). Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer* *8*, 228.
- Tarragona, M., Pavlovic, M., Arnal-Estapé, A., Urosevic, J., Morales, M., Guiu, M., Planet, E., González-Suárez, E., and Gomis, R.R. (2012). Identification of NOG as a specific breast cancer bone metastasis-supporting gene. *J. Biol. Chem.* *287*, 21346–21355.

- Tie, J., Pan, Y., Zhao, L., Wu, K., Liu, J., Sun, S., Guo, X., Wang, B., Gang, Y., Zhang, Y., et al. (2010). MiR-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the Robo1 receptor. *PLoS Genet.* *6*, e1000879.
- Tsai, J.H., Donaher, J.L., Murphy, D.A., Chau, S., and Yang, J. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* *22*, 725–736.
- Tseng, R.-C., Lee, S.-H., Hsu, H.-S., Chen, B.-H., Tsai, W.-C., Tzao, C., and Wang, Y.-C. (2010). SLIT2 attenuation during lung cancer progression deregulates beta-catenin and E-cadherin and associates with poor prognosis. *Cancer Res.* *70*, 543–551.
- Vincent-Salomon, A., and Thiery, J.P. (2003). Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. *Breast Cancer Res. BCR* *5*, 101–106.
- Wagner, E.F., and Karsenty, G. (2001). Genetic control of skeletal development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 527–532.
- Walsh, M.C., and Choi, Y. (2014). Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond. *Front. Immunol.* *5*, 511.
- Wang, B., Xiao, Y., Ding, B.B., Zhang, N., Yuan, X. bin, Gui, L., Qian, K.X., Duan, S., Chen, Z., Rao, Y., et al. (2003). Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* *4*, 19–29.
- Wang, J., Loberg, R., and Taichman, R.S. (2006). The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* *25*, 573–587.
- Wang, K.H., Brose, K., Arnott, D., Kidd, T., Goodman, C.S., Henzel, W., and Tessier-Lavigne, M. (1999). Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* *96*, 771–784.
- Wayburn, B., and Volk, T. (2009). LRT, a tendon-specific leucine-rich repeat protein, promotes muscle-tendon targeting through its interaction with Robo. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 3607–3615.
- Weilbaecher, K.N., Guise, T.A., and McCauley, L.K. (2011). Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 411–425.
- Weisser, N.E., and Hall, J.C. (2009). Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol. Adv.* *27*, 502–520.
- Wen, P., Kong, R., Liu, J., Zhu, L., Chen, X., Li, X., Nie, Y., Wu, K., and Wu, J.Y. (2014). USP33, a new player in lung cancer, mediates Slit-Robo signaling. *Protein Cell* *5*, 704–713.
- Werbowski-Ogilvie, T.E., Seyed Sadr, M., Jabado, N., Angers-Loustau, A., Agar, N.Y.R., Wu, J., Bjerkvig, R., Antel, J.P., Faury, D., Rao, Y., et al. (2006). Inhibition of medulloblastoma cell invasion by Slit. *Oncogene* *25*, 5103–5112.
- Wong, K., Ren, X.R., Huang, Y.Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S.M., Mei, L., et al. (2001). Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* *107*, 209–221.
- Wu, J.Y., Feng, L., Park, H.T., Havlioglu, N., Wen, L., Tang, H., Bacon, K.B., Jiang, Z., Zhang, X., and Rao, Y. (2001). The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. *Nature* *410*, 948–952.
- Xie, Y., Yin, T., Wiegraebe, W., He, X.C., Miller, D., Stark, D., Perko, K., Alexander, R., Schwartz, J., Grindley, J.C., et al. (2009). Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* *457*, 97–101.
- Xu, H.-L., Zhao, X., Zhang, K.-M., Tang, W., and Kokudo, N. (2014). Inhibition of KL-6/MUC1 glycosylation limits aggressive progression of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* *20*, 12171–12181.
- Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M.M., Karlsson, S., Iwama, A., and Nakauchi, H. (2011). Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* *147*, 1146–1158.

- Yang, L., and Bashaw, G.J. (2006). Son of sevenless directly links the Robo receptor to rac activation to control axon repulsion at the midline. *Neuron* *52*, 595–607.
- Yang, L., Li, Q., Wang, Q., Jiang, Z., and Zhang, L. (2012). Silencing of miRNA-218 promotes migration and invasion of breast cancer via Slit2-Robo1 pathway. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* *66*, 535–540.
- Yang, Y., Marcello, M., Endris, V., Saffrich, R., Fischer, R., Trendelenburg, M.F., Sprengel, R., and Rappold, G. (2006). MEGAP impedes cell migration via regulating actin and microtubule dynamics and focal complex formation. *Exp. Cell Res.* *312*, 2379–2393.
- Ye, B.-Q., Geng, Z.H., Ma, L., and Geng, J.-G. (2010). Slit2 regulates attractive eosinophil and repulsive neutrophil chemotaxis through differential srGAP1 expression during lung inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 6294–6305.
- Yiin, J.-J., Hu, B., Jarzynka, M.J., Feng, H., Liu, K.-W., Wu, J.Y., Ma, H.-I., and Cheng, S.-Y. (2009). Slit2 inhibits glioma cell invasion in the brain by suppression of Cdc42 activity. *Neuro-Oncol.* *11*, 779–789.
- Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L.D., and Nishikawa, S. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* *345*, 442–444.
- Yoshikawa, M., Mukai, Y., Okada, Y., Yoshioka, Y., Tsunoda, S.-I., Tsutsumi, Y., Okada, N., Aird, W.C., Doi, T., and Nakagawa, S. (2008). Ligand-independent assembly of purified soluble magic roundabout (Robo4), a tumor-specific endothelial marker. *Protein Expr. Purif.* *61*, 78–82.
- Ypsilanti, A.R., Zagar, Y., and Chédotal, A. (2010). Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 1939–1952.
- Yu, H., Gao, G., Jiang, L., Guo, L., Lin, M., Jiao, X., Jia, W., and Huang, J. (2013). Decreased expression of miR-218 is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *6*, 2904–2911.
- Yu, J., Zhang, X., Kuzontkoski, P.M., Jiang, S., Zhu, W., Li, D.Y., and Groopman, J.E. (2014). Slit2N and Robo4 regulate lymphangiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 pathway. *Cell Commun. Signal. CCS* *12*, 25.
- Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Wu, G., Rao, Y., and Wu, J.Y. (2009a). Midline crossing and Slit responsiveness of commissural axons require USP33. *Nat. Neurosci.* *12*, 1087–1089.
- Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Rao, Y., and Wu, J.Y. (2009b). Deubiquitinating enzyme USP33/VDU1 is required for Slit signaling in inhibiting breast cancer cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 14530–14535.
- Yue, Y., Grossmann, B., Galetzka, D., Zechner, U., and Haaf, T. (2006). Isolation and differential expression of two isoforms of the ROBO2/Robo2 axon guidance receptor gene in humans and mice. *Genomics* *88*, 772–778.
- Zakrys, L., Ward, R.J., Padiani, J.D., Godin, A.G., Graham, G.J., and Milligan, G. (2014). Roundabout 1 exists predominantly as a basal dimeric complex and this is unaffected by binding of the ligand Slit2. *Biochem. J.* *461*, 61–73.
- Zhang, B., Dietrich, U.M., Geng, J.-G., Bicknell, R., and Wang, L. (2009a). Repulsive axon guidance molecule Slit3 is a novel angiogenic factor. *Blood* *114*, 4300–4309.
- Zhang, F., Moniz, H.A., Walcott, B., Moremen, K.W., Linhardt, R.J., and Wang, L. (2013). Characterization of the interaction between Robo1 and heparin and other glycosaminoglycans. *Biochimie* *95*, 2345–2353.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* *425*, 836–841.
- Zhang, X., Fryknäs, M., Hernlund, E., Fayad, W., De Mito, A., Olofsson, M.H., Gogvadze, V., Dang, L., Pählman, S., Schughart, L.A.K., et al. (2014). Induction of mitochondrial dysfunction as a strategy for targeting tumour cells in metabolically compromised microenvironments. *Nat. Commun.* *5*, 3295.
- Zhang, X.H.-F., Wang, Q., Gerald, W., Hudis, C.A., Norton, L., Smid, M., Foekens, J.A., and Massagué, J. (2009b). Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals. *Cancer Cell* *16*, 67–78.

Zhao, M., Mueller, B.M., DiScipio, R.G., and Schraufstatter, I.U. (2008). Akt plays an important role in breast cancer cell chemotaxis to CXCL12. *Breast Cancer Res. Treat.* *110*, 211–222.

Zhao, Y., Bachelier, R., Treilleux, I., Pujuguet, P., Peyruchaud, O., Baron, R., Clément-Lacroix, P., and Clézardin, P. (2007). Tumor alphavbeta3 integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. *Cancer Res.* *67*, 5821–5830.

Zheng, W., Geng, A., Li, P., Wang, Y., and Yuan, X. (2012). Robo4 regulates the radial migration of newborn neurons in developing neocortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *22*, 2587–2601.

Zhou, W.-J., Geng, Z.H., Chi, S., Zhang, W., Niu, X.-F., Lan, S.-J., Ma, L., Yang, X., Wang, L.-J., Ding, Y.-Q., et al. (2011). Slit-Robo signaling induces malignant transformation through Hakai-mediated E-cadherin degradation during colorectal epithelial cell carcinogenesis. *Cell Res.* *21*, 609–626.

Van Zijl, F., Krupitza, G., and Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat. Res.* *728*, 23–34.