



HAL
open science

Le récepteur de guidage axonal ROBO4, acteur majeur de l'ostéotropisme des cellules métastatiques de cancer du sein

Margaux Bernard

► **To cite this version:**

Margaux Bernard. Le récepteur de guidage axonal ROBO4, acteur majeur de l'ostéotropisme des cellules métastatiques de cancer du sein. Cancer. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1186 . tel-02439709

HAL Id: tel-02439709

<https://theses.hal.science/tel-02439709>

Submitted on 14 Jan 2020

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.



N°d'ordre : 2019LYSE1186

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED340
BIOLOGIE MOLECULAIRE INTEGRATIVE ET CELLULAIRE

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie
Discipline : Cancérologie

Soutenue publiquement le 10/10/2019, par :
Margaux Bernard

Le récepteur de guidage axonal ROBO4, acteur majeur de l'ostéotropisme des cellules métastatiques de cancer du sein

Devant le jury composé de :

LAFAGE-PROUST Marie Hélène, PU-PH	Université de Saint-Etienne	Présidente du jury
DUTERQUE-COQUILLAUD Martine, DR CNRS	Université de Lille	Rapporteur
GINESTIER Christophe, CR INSERM	Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
MORET Frédéric, MCU	Université de Lyon	Examineur
CLEZARDIN Philippe, DR INSERM	Université de Lyon	Examineur
DIAZ Chantal, MCU	Université de Lyon	Examineur

Remerciements

Après ces trois années de thèse et la rédaction du manuscrit voici venu le temps de conclure par l'écriture des remerciements.

Je remercie tout d'abord le **Dr. Philippe Clézardin** de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de son laboratoire, pour son soutien financier et son implication scientifique. En plus des congrès où j'ai eu la chance d'aller, vous m'avez également donné l'opportunité de découvrir les laboratoires anglais lors de ma venue à Sheffield (même si la légende dit que vous avez essayé de me semer au détour d'une longue randonnée à la recherche de la cabane de Robin des Bois). Merci pour tout.

Je souhaite également remercier ma directrice de thèse, le **Dr. Chantal Diaz**, qui a cru en moi et m'a énormément soutenue, tant d'un point de vue scientifique qu'humain, durant ces presque quatre années. Merci aussi de m'avoir motivée à faire de l'enseignement, cela a été la découverte d'un métier enrichissant et une expérience qui m'a énormément apportée.

J'adresse également mes plus sincères remerciements à tous les membres de mon jury de thèse. Merci aux **Dr. Martine Duterque-Coquillaud** et **Christophe Ginestier** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, du temps passé à la relecture de ce manuscrit et des conseils prodigués. Je remercie également le **Pr. Marie-Hélène Lafage-Proust**, qui préside ce jury et le **Dr. Frédéric Moret**, examinateur, qui m'ont tous les deux guidés lors de mes comités de suivi de thèse.

La réalisation de ce travail de thèse a été permise grâce à l'aide de nombreux collaborateurs et je remercie toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de l'article. Je tiens également à remercier tous mes prédécesseurs de l'équipe ROBO que je n'ai pas toujours connus mais qui ont contribué à l'avancement du projet et à la genèse de mon hypothèse de travail. Plus particulièrement, j'adresse un immense merci à **François Le Pape**. Ton soutien et ton aide ont largement contribué à l'aboutissement de cette thèse. Tu as été un excellent formateur, tu as supporté toutes mes maladresses et tu m'as

toujours aidée à les réparer (je pense notamment au rack du -80 et à tous ces échantillons ramassés). J'ai adoré commencer ma thèse à tes côtés. A mon tour maintenant de faire face aux maladrances du nouveau « stagiaire », **Loïc Gaweda**. Même si tu n'as jamais été mon stagiaire (ou celui de quiconque dans ce labo) et que tu as passé les six mois de mise à l'épreuve que nous t'avions imposé tu restes mon super stagiaire ! Je n'aurais jamais imaginé travailler avec une personne qui casse plus de choses que moi et qui fait tout autant de boulettes, mais tu m'as montré que dans la vie tout est possible. Merci pour ta bonne humeur, ton humour (pas si foireux) et pour ton aide. Je suis ravie d'avoir partagé un bout de thèse à tes côtés et je te souhaite de bien terminer cette aventure.

Je remercie également **Lamia, Sandra, et Soumaya**, sans qui les protocoles *in vivo* n'auraient pu être réalisés, vous vous êtes toujours démenées pour que tout soit fait dans les temps. Un grand merci à **Martine** pour les nombreux conseils que tu m'as apportés, sans toi le déroulement de ma thèse n'aurait pas été le même, tu as été d'une aide précieuse. Une pensée pour **Sofia**, qui m'a accompagnée en Angleterre. Toi aussi tu auras été d'un immense soutien, toujours prête à me partager tes connaissances, je t'en remercie et je te souhaite de t'épanouir de l'autre côté de l'Atlantique !

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui ont partagé mon quotidien. L'équipe de l'hôpital, vous êtes venues nous envahir avec votre bonne humeur. **Marjorie**, je suis obligée de te remercier d'avoir parlé et de m'avoir montré comment relier ma thèse, mais pas seulement. Ton passage au 2^{ème} nous a apporté un bol d'air frais, toujours souriante et marrante, tu as égayé ma dernière année de thèse. Et **Evelyne**, toujours zen et prête à m'aider ! **Sacha**, je garde en mémoire les pauses et les bouffes qu'on a partagées et qu'on continue de se faire car après tout on est les gr'OS. Je te souhaite de faire un beau bébé en pleine forme. **Geoffrey**, tu m'auras beaucoup fait rire au laboratoire mais aussi à l'extérieur, c'est toujours un plaisir de te croiser. Les garçons et les filles du 6^{ème}, **Léa, Diane, Seb, Benjamin, Marc et Martin**, toujours prêts à boire des verres et à prendre des pauses, surtout l'été ! Et Martin merci de m'avoir supportée lors de nos courses, et de m'avoir poussée à courir ce fameux 10K.

Enfin, il est temps de passer à **ma Paulette**, la plus belle des petites meufs qui existe ! Je pourrais en écrire des choses sur toi. On a démarré cette aventure ensemble en master et voilà cinq ans qu'on se supporte. A tel point, qu'en plus de te voir tous les jours, je passe mes week-ends et mes vacances avec toi (et surtout sur ta belle île). Ce que tu m'as

apporté est indéfinissable et sans toi, cette thèse n'aurait clairement pas été la même. Elle a consolidé notre amitié pour de très longues années. J'appréhende de ne plus t'avoir à mes côtés au quotidien mais j'espère que tu continueras à me faire goûter ton saucisson Corse en me courant après pour que je goutte ton muscat (Corse, encore une fois).

Je remercie également tous les autres membres du laboratoire, **Edith, Caroline, Irma, Olivier P., Jean-Charles, Cyrille,** et **Olivier B.** ainsi que ceux que j'ai malencontreusement pu oublier de citer vous m'avez tous scientifiquement enrichie par vos conseils bienveillants.

Je remercie également tous mes amis qui m'ont soutenue. **La team MPG3**, toujours prêt à faire la fête, vous avez égayé un certain nombre de mes soirées. Un gros clin d'œil à **Alexandra**, mon binôme de rédaction et bien plus. Toi qui passes pour l'ange mais qui es, en fait, le diable (on se souviendra du rosé pour notre soirée écriture terminée aux NS). Ton soutien a été essentiel pour moi, en particulier ces derniers mois et pas uniquement parce que tu m'as chouchoutée avec tes bons plats (et tes bonnes glaces !). **Emilie** la meilleure des colocs du monde, avec qui j'ai partagé un super voyage post écriture (sans oublier **Pauline**, notre super organisatrice). **Fabien** et **Anaïs**, on se rappellera notre séjour Corse avec la visite nocturne des vaches et ce baptême de plongée.

Enfin je remercie les meilleurs amis du monde, mes **zinks** (j'ai osé mettre ce mot dans ma thèse !), ma deuxième famille. Vous m'entourez depuis la seconde, et ce n'est pas près de changer. Une pensée plus particulière à mes **bombes**, mes amours de toujours, vous m'apportez une dose de bonheur quotidienne indescriptible. A vous tous, à toutes nos soirées passées ensemble, aux futurs petits membres, et à nos futurs moments partagés, longues vies ! Merci de faire partie de ma vie et de la rendre aussi fun (parce que vous êtes un peu drôles quand même).

Impossible de conclure ces remerciements, sans parler de **mes parents**. Vous êtes le premier pilier de ma vie, sans vous rien de ceci n'aurait été possible. Aucun mot ne peut décrire l'amour, le respect et la gratitude que j'ai pour vous. Je suis fière de vous avoir pour parents. Et puis il ne faut pas oublier la chose la plus importante que vous m'avez apportée, mon frère, **Thomas**. Je ne sais pas si on peut dire que tes séances de « torture », le brossage de dents avec tes chaussettes sales et mon assiette dans les toilettes quand tu mettais la table m'ont endurcie mais en tout cas, le soutien que tu m'as apporté dans

n'importe quelle situation m'a aidée à me construire. Et toi aussi tu m'as apporté deux merveilles, mes petites nièces **Lou** et **Mila**, deux terreurs qui rendent nos réunions de famille bien plus belles. J'adresse également une pensée à tous mes tontons, tatas, cousins, cousines, à mes grand-mères et à ma Tia qui ont toujours été là pour moi et qui me font passer des moments inoubliables dès qu'on arrive à se voir.

Mes derniers remerciements (et pas des moindres) s'adressent à celui qui partage ma vie depuis quelques années déjà, **mon Dodouille**. Tu es la petite patate qui pue qui arrive à me redonner le sourire même quand le moral est au plus bas, en même temps tu es plutôt rigolo comme copain. Merci de me soutenir, de me supporter (même si tout le monde sait que je suis un véritable petit amour) et de m'aimer. J'ai hâte de poursuivre la suite de nos aventures avec ce beau voyage qui nous attend.

Résumé

Le taux de survie du cancer du sein est en progression constante, toutefois l'apparition de métastases osseuses contribue à la morbidité et à la mortalité des femmes à un stade avancé et les traitements actuels ne sont que palliatifs. Comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la formation de ces métastases est donc essentiel à leur prévention et à leur traitement. Les tumeurs primitives des carcinomes mammaires expriment des gènes qui favorisent l'ostéotropisme et l'ostéomimétisme des cellules tumorales. La lignée cellulaire B02, une sous-population ostéotrope des cellules MDA-MB-231 exprime fortement Roundabout 4 (*ROBO4*), un récepteur membranaire, de la famille des récepteurs de guidage axonal Roundabout. *ROBO4* est impliqué dans l'angiogenèse, l'intégrité des vaisseaux sanguins et le maintien des cellules souches hématopoïétiques dans la niche ostéoblastique. Une étude clinique, réalisée au laboratoire, sur une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein, montre que l'expression de *ROBO4* dans la tumeur primaire est associée à la rechute métastatique osseuse. Afin de comprendre le rôle de *ROBO4* dans la tumorigénèse et la survenue des métastases osseuses, nous avons généré des cellules B02 déplétées en *ROBO4* (B02 KO *ROBO4*) en invalidant le gène par stratégie CRISPR/Cas9. *In vivo*, l'inoculation de B02 KO *ROBO4* dans les modèles expérimentaux murins freine la prise tumorale, la colonisation précoce de la moelle osseuse et la croissance dans l'os, ainsi que la formation des lésions ostéolytiques. De plus, les cellules B02 KO *ROBO4* ne colonisent pas efficacement les niches ostéoblastiques humanisées implantées chez la souris, contrairement à ce qui est observé après inoculation des B02.

In vitro, l'interaction des B02 KO *ROBO4* avec les cellules résidentes de la moelle osseuse est aussi plus faible. Les cellules B02 ou B02 KO *ROBO4* en co-culture en suspension avec les cellules de la moelle osseuse forment des mammosphères hétérotypiques dont la taille est considérablement réduite par l'inhibition de *ROBO4*. L'altération du cytosquelette d'actine des cellules B02 KO *ROBO4* conduit à un défaut de l'agrégation de ces cellules entre elles. Ces résultats suggèrent un rôle de *ROBO4* en tant que molécule d'adhérence qui faciliterait la formation de clusters tumoraux, la cohésion des cellules cancéreuses entre elles mais aussi leur interaction avec les cellules du microenvironnement osseux.

De plus, l'inhibition de *ROBO4*, par un anticorps bloquant anti-*ROBO4*, réduit également la colonisation osseuse par les cellules B02 et MDA-MB-231, la formation de sphéroïdes ainsi que les interactions cellulaires.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que *ROBO4* pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de tumeur primitive du sein et des métastases osseuses.

Mots clés : *ROBO4*, métastases osseuses, cancer du sein, cible thérapeutique, molécule d'adhérence

Abstract

The survival rate of breast cancer is steadily increasing but bone metastasis occurrence contributes to the morbidity and mortality of patients at an advanced stage and current treatments are only palliative. Understanding the molecular mechanisms underlying bone metastasis formation is therefore essential for the treatment and prevention of skeletal lesions. Primary breast carcinoma tumors express genes that promote the osteotropism and osteomimicry of tumor cells. The osteotropic human breast cancer cell line B02, a sub-population of MDA-MB-231 cells expresses Roundabout 4 (ROBO4), an axonal guidance membrane receptor of the Roundabout family. ROBO4 is involved in angiogenesis, blood vessel integrity and maintenance of hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. A clinical study on breast cancer patient cohort shows that the expression of ROBO4 in the primary tumor is associated with metastatic bone relapse. To decipher the role of ROBO4 in tumorogenesis and in bone metastasis occurrence, we have invalidated ROBO4 in B02 to generate KO ROBO4 B02 cells, using the CRISPR/Cas9 strategy. *In vivo*, inoculation of KO ROBO4 B02 cells in murine experimental models inhibits tumor growth, early bone marrow colonization, as well as osteolytic lesions. Moreover, unlike to what observed for B02, KO ROBO4 B02 cells do not efficiently colonize the humanized osteoblastic niches implanted in the mouse.

In vitro, the interaction of KO ROBO4 B02 cells with resident bone marrow cells is also decreased. The B02 or B02 KO ROBO4 cells co-cultured in suspension with bone marrow cells form heterotypic mammospheres. However, their size is substantially reduced in the absence of *ROBO4*. The alteration of KO ROBO4 B02 cells actin cytoskeleton leads to the impairment of tumor cell aggregation. These results suggest a role of ROBO4 as an adherence molecule that facilitates the formation of tumor clusters, cancer cell cohesion among each other, but also their interaction with bone microenvironment cells.

In addition, inhibition of ROBO4 using an anti-ROBO4 blocking antibody also reduces bone colonization of B02 and MDA-MB-231 cells, spheroid formation, and cell interactions.

All these results suggest that ROBO4 could be a new therapeutic target in the treatment of primary breast tumors and bone metastases.

Keywords: ROBO4, bone metastasis, breast cancer, therapeutic target, adherence molecule

Sommaire

Remerciements.....	2
Résumé.....	6
Abstract.....	7
Sommaire	8
Liste des illustrations.....	13
Liste des tableaux	16
Liste des abréviations	17
Avant-propos.....	21
Chapitre 1 : Introduction bibliographique.....	23
I- Le cancer du sein.....	23
1- Généralité du cancer du sein.....	23
1-1- Diversité des cancers du sein.....	24
a- Les différents sous-types histologiques du cancer du sein.....	24
b- Les sous-types moléculaires et l'hétérogénéité inter-tumorale du cancer du sein	26
c- L'hétérogénéité intra-tumorale.....	28
1-2- Les traitements du cancer du sein.....	30
2- Le cancer du sein métastatique.....	31
2-1- Processus métastatique.....	32
a- La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) : phénomène clef de l'envahissement tumoral	32
b- Intravasation et migration des cellules tumorales circulantes (CTC)	36
c- Arrêt et extravasion : de la CTC à la DTC.....	38
d- De la DTC à la macro-métastase.....	39

2-2-	Localisation métastatique préférentielle : théorie du « seed and soil » et le tropisme osseux.....	40
II-	Les métastases osseuses	41
1-	La physiologie du tissu osseux	41
1-1-	L'architecture du tissu osseux	41
1-2-	Microenvironnement osseux.....	42
a-	La matrice osseuse.....	42
b-	Les cellules du remodelage osseux.....	43
1-3-	Niche hématopoïétique.....	51
2-	Le détournement de l'environnement osseux par les cellules tumorales.....	55
2-1-	Établissement de la niche métastatique.....	55
a-	La niche pré-métastatique.....	55
b-	La niche préexistante.....	56
2-2-	Ostéomimétisme et développement de lésions ostéolytiques : le « cercle vicieux des métastases osseuses ».....	57
a-	L'ostéomimétisme.....	57
b-	Le cercle vicieux des métastases osseuses.....	58
2-3-	Traitements des métastases osseuses ostéolytiques.....	62
a-	Les thérapies actuelles.....	63
a-	Les thérapies émergentes.....	64
III-	Le récepteur Roundabout 4.....	66
1-	La famille de récepteurs ROBO	67
1-1-	Structure.....	67
1-2-	Interaction ROBO/SLIT.....	68
1-3-	L'axe SLIT2/ROBO 1 à 3 en cancérologie.....	70
a-	Survie des cellules tumorales.....	71
b-	Implication dans la transition épithélio-mésenchymateuse	72

c-	Régulation de la migration cellulaire et du chimiotactisme	72
d-	Angiogenèse tumorale.....	73
2-	Cas du récepteur ROBO4.....	73
2-1-	Mécanisme de régulation de l'expression de ROBO4	73
a-	Régulation transcriptionnelle	73
b-	Régulation par des micro-ARN (miR).....	75
c-	Épissage alternatif.....	76
d-	La N-Glycosylation	77
e-	Clivage	77
f-	Dimérisation	78
2-2-	ROBO4, un récepteur spécifique des cellules endothéliales.....	78
a-	ROBO4 favorise la migration des cellules endothéliales.....	78
b-	ROBO4 permet le maintien de l'intégrité vasculaire.....	80
c-	ROBO4 régule la production de l'interleukine 6 (IL-6) par les cellules endothéliales.....	84
2-3-	Implication de ROBO4 dans le maintien de la niche hématopoïétique.....	85
2-4-	ROBO4 et cancer	87
a-	Angiogenèse tumorale.....	87
b-	Rôle de ROBO4 dans les cellules tumorales.....	89
	Chapitre 2 : Travail expérimental.....	91
I-	Introduction et hypothèse de travail.....	91
II-	Matériels et méthodes.....	95
1-	Biologie cellulaire.....	95
2-	Biologie moléculaire	100
3-	Expérimentation animale	102
	Micro-métastases dans la moelle osseuse ex vivo	103
4-	Analyse statistique	105

III- Résultats.....	106
1- Invalidation du gène ROBO4 dans une lignée humaine de cancer du sein triple négative et ostéotropique	106
1-1- Génération des lignées cellulaires B02 CRISPR ROBO4 et B02 CRISPR CTL	106
1-2- Caractérisation <i>in vitro</i> des lignées B02 parentale et génétiquement modifiées	108
2- Rôle du récepteur ROBO4 dans la formation de tumeurs primaires et secondaires <i>in vivo</i>	115
2-1- Tumorigenèse et invasion locale	115
2-2- Implication du récepteur ROBO4 dans la formation de métastases osseuses	117
2-3- ROBO4 est impliqué dans les phases précoces de formation de micro-métastases osseuses	121
2-4- L'expression de ROBO4 par les cellules B02 est nécessaire à la colonisation d'os ectopique humanisée dans des souris immunodéficientes.....	124
a- Mise au point du modèle expérimental	124
b- Les cellules tumorales B02 colonisent l'implant ectopique humanisé	124
2-5- L'anticorps bloquant anti-ROBO4 affecte la colonisation osseuse	129
a- Colonisation de la niche osseuse	129
b- Colonisation métastatique par les cellules MDA-MB-231	131
3- Étude de l'interaction des cellules tumorales B02 avec des composants du microenvironnement osseux : implication du récepteur ROBO4 dans ces interactions	132
3-1- Interaction des cellules B02 avec les composants de la matrice extracellulaire osseuse	133
3-2- Interaction des cellules B02 avec les cellules de la niche osseuse.....	135
3-3- ROBO4 est impliqué dans la cohésion des cellules tumorales entre elles	139

4-	ROBO4 intervient dans l'agrégation cellulaire	140
4-1-	ROBO4 est impliqué dans l'intégrité du cytosquelette d'actine des cellules B02	141
4-2-	L'agrégation des cellules tumorales entre-elles est médiée par ROBO4..	143
4-3-	ROBO4 module l'expression de gènes codant les molécules d'adhésion cellulaire de la famille CAM	145
5-	Développement de nouveaux outils thérapeutiques ciblant le récepteur ROBO4	147
5-1-	Production d'anticorps anti ROBO4	147
5-2-	Tests fonctionnels avec les anticorps générés.....	147
Chapitre 3 : Discussion & perspectives		150
Publications & communications scientifiques		163
Références bibliographiques.....		164

Liste des illustrations

Figure 1 : Schéma simplifié de la glande mammaire humaine.	24
Figure 2 : Classification histologique des adénocarcinomes mammaires.	25
Figure 3 : Modèles suggérés pour expliquer l'hétérogénéité intra-tumorale.	29
Figure 4: Processus métastatique.....	32
Figure 5 : Structure d'un os long.....	42
Figure 6 : L'ostéoblastogenèse.....	45
Figure 7 : L'ostéoclastogenèse.....	46
Figure 8 : Schéma de la résorption osseuse.	47
Figure 9 : Le remodelage osseux.....	48
Figure 10 : Action des facteurs systémiques et locaux sur les acteurs de la résorption osseuse.	51
Figure 11 : Niche hématopoïétique.....	52
Figure 12 : Rôle du récepteur ROBO4 dans le maintien des CSH dans la moelle osseuse.. ..	54
Figure 13 : Les étapes de la colonisation osseuse par les cellules tumorales mammaires.. ..	56
Figure 14: Activation des ostéoclastes médiée par les cellules et l'environnement tumoraux.....	59
Figure 15 : Inhibition de la différenciation des ostéoblastes médiée par les cellules et l'environnement tumoraux.	60
Figure 16 : Visualisation de métastases ostéolytiques et ostéocondensantes en histologie et en radiographie.	61
Figure 17: Cercle vicieux des métastases osseuses ostéolytiques.	62
Figure 18 : Thérapies actuelles et émergentes ciblant la résorption osseuse.	65
Figure 19 : Marquages d'immunohistochimies d'interneurone d'embryons de drosophiles en fonction de l'expression de ROBO.....	66
Figure 20 : Structure des récepteurs ROBO.....	68
Figure 21 : Interaction des récepteurs ROBO 1 et 2 avec leurs ligands SLIT 1 à 3.	69
Figure 22 : Séquence promotrice du gène ROBO4.....	74

Figure 23 : Régulation de la méthylation du promoteur proximal de ROBO4.....	75
Figure 24 : Régulation de la transcription et de la traduction de ROBO4 par les micro-ARN.	76
Figure 25 : Rôle de ROBO4 dans la migration des cellules endothéliales et la néoangiogenèse.....	80
Figure 26 : Rôle de ROBO4 dans le maintien de l'intégrité vasculaire.....	82
Figure 27 : Régulation de l'angiogenèse induite par la voie VEGF/VEGFR2 par ROBO4.	83
Figure 28 : Boucle de régulation de la production de l'IL-6 entre les monocytes et les cellules endothéliales.....	85
Figure 29 : Inhibition de la voie du VEGF par ROBO4 dans les gliomes.....	88
Figure 30 : Association de l'expression de ROBO4 avec la rechute clinique du cancer du sein.....	93
Figure 31 : Présence et rôle pro-métastatique du récepteur ROBO4 dans les cellules humaines de cancer du sein.....	94
Figure 32: Représentation schématique du système CRISPR-Cas9 utilisé pour l'inactivation du gène ROBO4.....	107
Figure 33 : Carte de restriction du vecteur lentiCRISPR V2 utilisé pour la transduction des cellules B02.....	108
Figure 34 : Caractérisation moléculaire des lignées : population totale transduite, KO ROBO4.1 et .2 comparées aux B02 parentales.....	110
Figure 35: Conséquences de l'inhibition de ROBO4 sur l'expression de gènes associés au récepteur.....	112
Figure 36 : Caractérisation fonctionnelle des lignées B02 parentale, B02 CTL et B02 KO ROBO4.1.....	114
Figure 37 : ROBO4 est impliqué dans la formation de tumeurs mammaires primaires <i>in vivo</i>	116
Figure 38 : ROBO4 est impliqué dans la formation de lésions ostéolytiques.....	119
Figure 39 : Expression relative de l'IL-6 dans les cellules métastatiques B02 exposées ou non au TNF- α	120
Figure 40 : ROBO4 est essentiel à la formation de micro-métastases osseuses.....	123
Figure 41 : Implantation de la niche osseuse humanisée <i>in vivo</i> chez la souris Balb/c NOD/SCID.....	125

Figure 42 : Validation du modèle de niche osseuse humanisée en tant qu'os dynamique et attractif pour les cellules métastatiques.....	127
Figure 43 : ROBO4 est impliqué dans la colonisation d'os ectopique humanisée par les cellules B02..	128
Figure 44 : L'inhibition de ROBO4 dans les cellules B02 par utilisation d'un anticorps bloquant diminue la colonisation de la niche osseuse humanisée.....	130
Figure 45 : L'inhibition de ROBO4 dans les cellules MDA-MB-231 par utilisation d'un anticorps bloquant diminue la dissémination osseuse.....	132
Figure 46 : ROBO4 pourrait jouer un rôle dans l'attachement des cellules B02 aux protéines matricielles osseuses.....	134
Figure 47 : Impact de la délétion de ROBO4 dans les cellules B02 sur leur adhérence aux cellules de la moelle osseuse..	136
Figure 48 : Impact de la délétion de ROBO4 sur la capacité des cellules B02 à former des sphéroïdes en co-culture avec des cellules de la moelle osseuse.....	137
Figure 49: Expression relative de <i>NOGGIN</i> , <i>NANOG</i> et <i>OCT4</i> dans les cellules métastatiques B02.	138
Figure 50 : Implication du récepteur ROBO4 dans la cohésion des cellules tumorales entre elles.....	140
Figure 51 : ROBO4 est impliqué dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette d'actine des cellules B02.....	142
Figure 52 : L'interaction ROBO4-ROBO4 participe à la cohésion des cellules tumorales entre-elles.....	144
Figure 53 : Expression relative de <i>VCAM</i> et <i>ICAM</i> dans les cellules métastatiques B02 stimulées ou non par le TNF- α	146
Figure 54 : Tests fonctionnels avec les anticorps humains générés, dirigés contre ROBO4.	149
Figure 55 : Schéma hypothétique du rôle de la signalisation ROBO4 dans la formation de métastases osseuses.....	161
Figure 56 : Schéma hypothétique de la signalisation de ROBO4 induisant la transcription de l'IL-6, VCAM1, ICAM1 dans les cellules B02.....	162

Liste des tableaux

Tableau 1 : Le grade du cancer du sein en fonction des critères d'Elston et Ellis.....	26
Tableau 2 : Les différents sous-types de cancer du sein.....	28
Tableau 3 : Les gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse, leurs cibles et voies de signalisation activatrices.....	35
Tableau 4 : Facteurs impliqués dans les différentes phases du remodelage osseux	49

Liste des abréviations

ABC : ATP-Binding Cassette
ADAMTS1 : ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 motif
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ALP : ALcaline Phosphatase
ANXA2 : Annexin A2
AP : Activator Protein
ARF6 : ADP-ribosylation factor 6
ARNg : ARN guide
ARNm : Acide Ribonucléique Messenger
ATF4 : Activating Transcription Factor 4
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BMU : Bone Multicellular Unit
BrdU : Bromodésoxyuridine
BSA : Bovine Serum Albumine
BV/TV : Bone Volume/Tissu Volume
CAF : Cancer Associated Fibroblasts
CAM : Cell Adhesion Molecule
CAR : CXCL12 Abundant Reticular cells
CaSR : Calcium-Sensing Receptor
CCL2 : C-C motif Chemokine Ligand 2
CDC42 : Cell Division Cycle 42
ColIA1 : collagen type I alpha1
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSH : Cellules souches hématopoïétiques
CSM : Cellules Souches Mésoenchymateuses
CTC : Cellules Tumoraes Circulantes
CTGF : Connective Tissue Growth Factor
CXCL12 : CXC motif Chemokine Ligand 12
CXCR4 : CXC chemokine Receptors 4

Dkk1 : Dickkopf-related protein 1
DTC : Cellules Tumorales Dormantes
EGFR : Epidermal Growth Factor Recepteur
ER : Estrogen Receptor
ETS : E26 Transformation-Specific
FAK : Focal Adhesion Kinase
FRA-1 : Fos Related Antigen 1
G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GABP : GA-Binding Protein
GC : Glucocorticoïdes
GIT1 : Arf GTPase activating protein
GM-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor
GSK-3 β : Glycogen synthase kinase 3 β
HEK : Human Embryonic Kidney cell
HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2
HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
HUAEC : Human Umbilical Artery Endothelial Cells
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM1 : Intercellular Cell Adhesion Molecule 1
IGF1 : Insulin Growth Factor 1
IL : Interleukine
ITGA5 : Intégrine α 5
Lepr : leptin Receptor
LIMK1 : LIM domain Kinase 1
LOX : Lysil Oxydase
LPS : Lypopolysacharride
M-CSF : Macrophe Colony Stimulating Factor
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1
MEC : Matrice Extra-Cellulaire
MENA : Mammalian-enabled protein
miR : micro-ARN
MMP : Métalloprotéinase

MS4A1 : Membrane Spanning 4-Domains A1
NF κ B : Nuclear Factor-Kappa B
NFATc1 : Nuclear Factor of Activated T Cells 1
NHEJ : Non Homologous End Joining
OCN : ostéocalcine
OCT4 : Octamer-binding Transcription factor 4
OPG : Ostéoprotogérine
OSX : Osterix
PAM : Protospacer Adjacent Motif
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PDX : Patient-derived xenograft
PFA : Paraformaldehyde
PHOSPHO1 : Phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase 1
Pi : Phosphate Inositol
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PPi : PyroPhosphate Inositol
PR : Progesterone Receptor
PRX1 : Paired related homeobox 1
PTH : Parathormone
PTHrP : PTH related protein
Rab11 : Ras-related protein Rab-11
Rac1 : Rac Family Small GTPase 1
RANK : Receptor Activator of NF κ B
RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand
RhoA : Ras homolog protein family member A
ROBO4 : Roundabout 4
ROR2 : Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2
RUNX2 : Runt-Related Transcription factor 2
SCF : Stem Cell Factor
SFK : Src-Family-Kinase
shARN : short hairpin RNA
siARN : small interfering RNA
SNS : Système Nerveux Sympathique

SOST : Sclérostine
SP : Side-Population
SP1 : Specific Protein 1
SRE : Skeletal Related Event
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF- β : Transforming Growth Factor - β
TME : Transition Mésenchymo-Epithéliale
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
TRAF7 : TNF Receptor Associated Factor 7
TRAP : Tartrate-resistant acid phosphatase
UNC5b : Unc-5 Netrin Receptor B
USP33 : Ubiquitin Specific Peptidase33
UTR : Untranslated region
VCAM1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
WASP : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
ZEB : Zinc finger E-box-binding homeobox
ZO-1 : Zonula Occludens-1

Avant-propos

Avec près de 60 000 nouveaux cas détectés chaque année, le cancer du sein est le plus répandu chez la femme et est majoritairement diagnostiqué chez des patientes âgées de 50 à 75 ans. Même si le taux de mortalité associé ne cesse de diminuer depuis 15 ans et que plus de 87% des patientes sont en vie 5 ans après le diagnostic, les tumeurs mammaires représentent encore 18,2% des décès féminins par cancer.

Les cancers du sein, tout comme les cancers de la prostate ou les mélanomes, sont dits ostéophiles. Ceci signifie qu'au cours de l'évolution pathologique de la maladie, des métastases osseuses sont fréquemment identifiées.

L'os est un tissu intervenant dans les fonctions locomotrices du squelette, mais son rôle dans le maintien de la charpente corporelle lui permet également de protéger les organes vitaux. De plus chez l'adulte, la moelle osseuse, composante des os longs de l'organisme, devient le siège de l'hématopoïèse.

Afin de préserver ses propriétés l'os est en constant renouvellement. Cette structure dynamique est composée de cellules formatrices (les ostéoblastes) et de cellules destructrices (les ostéoclastes) de l'os, dont l'activation est finement régulée pour maintenir un équilibre du remodelage osseux. Certaines pathologies sont la résultante d'une dérégulation de ce processus : une activation excessive de la dégradation osseuse est responsable de l'ostéoporose tandis qu'une formation osseuse massive donne lieu à de l'ostéopétrose.

Lorsque les cellules cancéreuses colonisent l'os, elles détournent l'environnement secondaire à leur avantage. Dans le cas des métastases osseuses associées au cancer du sein, les cellules tumorales sécrètent des facteurs permettant la sur-activation des ostéoclastes ainsi que l'inhibition des ostéoblastes. En parallèle, la dégradation de la matrice osseuse provoque la libération de facteurs pro-tumoraux stimulant la croissance des cellules cancéreuses. La formation de plages d'ostéolyses résultantes est responsable de la survenue de fractures pathologiques ainsi que d'un dérèglement métabolique chez la patiente. Afin de limiter la dégradation osseuse, des thérapies qui ciblent la différenciation (Dénosumab) ou l'activité (Bisphosphonate) des ostéoclastes sont

prescrites en clinique. En revanche, leur utilisation ne permet pas la disparition des lésions ostéolytiques existantes et aucun autre traitement n'est à ce jour disponible sur le marché. De ce fait, la compréhension de chaque étape de la cascade métastatique constitue un véritable enjeu de santé publique et est essentielle au développement de nouvelles thérapies ciblées.

Dans ce contexte, de précédents travaux réalisés au laboratoire ont mis en évidence une signature génétique osseuse dans les cellules ostéotropiques B02, dérivées de la lignée de cancer du sein, MDA-MB-231. L'analyse transcriptomique comparative entre ces deux populations cellulaires a révélé la surexpression de *ROBO4* dans les cellules B02.

ROBO4 appartient à la famille de récepteurs de guidage axonal Roundabout malgré des différences structurales et fonctionnelles avec les autres membres de celle-ci. En effet, il a principalement été décrit pour son rôle dans l'angiogenèse développementale et pathologique. Certaines études ont également démontré l'expression de *ROBO4* dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH). La présence de *ROBO4* à la surface de ces cellules permet leur ancrage au sein de la moelle osseuse. De façon intéressante plusieurs mécanismes suggèrent que les cellules tumorales colonisent la niche hématopoïétique en mimant les moyens d'interactions des CSH avec les composants cellulaires de l'environnement osseux. Ces données nous ont conduits à émettre l'hypothèse que *ROBO4* interviendrait dans l'ancrage des cellules tumorales dans la moelle osseuse.

Des études précédemment réalisées dans notre laboratoire semblent aller dans ce sens, étant donné qu'une étude clinique menée sur 254 patientes souffrant d'un cancer du sein montre que l'expression de *ROBO4* est significativement corrélée à la rechute métastatique osseuse. De plus, dans un modèle murin expérimental de métastases osseuses, l'inhibition de *ROBO4* dans les cellules tumorales, injectées au sein de la cavité tibiale, par un anticorps bloquant réduit leur ancrage dans la moelle osseuse.

Mon projet de doctorat se place dans la continuité de ces travaux. Dans ce manuscrit, ce travail sera tout d'abord replacé dans son contexte bibliographique en présentant l'état des connaissances actuelles sur le cancer du sein, la cascade métastatique, l'environnement osseux ainsi que son détournement par les cellules tumorales puis sur le récepteur *ROBO4*. Dans un deuxième temps, les résultats obtenus lors de mon doctorat et les perspectives qui en découlent seront exposés.

Chapitre 1 : Introduction

bibliographique

I- Le cancer du sein

Le cancer est la seconde cause de mortalité dans le monde avec 8,8 millions de décès en 2015 (d'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé). En France métropolitaine, 399 500 nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués en 2017. Chez l'homme les cancers de la prostate, du poumon et du côlon-rectum sont les plus fréquents. Chez la femme, 58 968 nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués en 2017, ce qui le place en tête des cancers incidents devant ceux du poumon et du côlon-rectum. Malgré une forte survie à 5 ans, de 87% en 2010 et en constante augmentation, il reste la première cause de mortalité par cancer chez la femme (18,2%). Le cancer du sein chez l'homme représente 1% des cas et est souvent, de mauvais pronostic. (Ces données sont issues du site de l'Institut National du Cancer <https://www.e-cancer.fr/>).

1- Généralité du cancer du sein

Les avancées scientifiques de ces dernières années ont permis un véritable déclin de la mortalité par cancer du sein entre 2002 et 2012 en Europe. En effet, pour 100 000 cas, 17,9 décès étaient dénombrés en 2002 contre 15,2 en 2012 et 13,4 prédis pour l'année 2020 (Carioli et al., 2017). Ces progrès sont expliqués par l'amélioration des thérapies et des méthodes de diagnostic, notamment de la mammographie (Berry et al., 2005).

Il existe plusieurs types de classification des tumeurs mammaires, basées 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- Diversité des cancers du sein

a- Les différents sous-types histologiques du cancer du sein

La glande mammaire est composée de plusieurs lobules desquels s'échappent des canaux. Ces derniers se rejoignent pour former un canal principal, appelé sinus galactophore, qui se poursuit jusqu'au mamelon (Hassiotou and Geddes, 2013) (Figure 1).

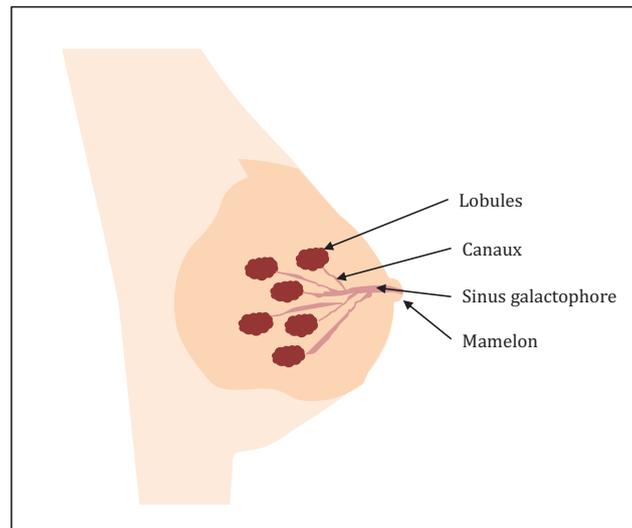


Figure 1 : Schéma simplifié de la glande mammaire humaine. Depuis les lobules, partent des ramifications, les canaux, qui se rejoignent en un canal unique, le sinus galactophore qui se poursuit jusqu'à la glande mammaire.

La majorité des cancers du sein (95%) sont des adénocarcinomes c'est à dire des tumeurs épithéliales. Actuellement deux sous types sont majoritairement décrits :

- Les adénocarcinomes lobulaires, peu fréquents, ils prennent genèse au sein des lobules.
- Les cancers canauxaux qui sont les plus communs et qui touchent le canal galactophore.

Dans les deux cas, ils peuvent être *in situ*, c'est à dire localisés dans le lobule ou le canal, ou infiltrants avec envahissement des tissus voisins. Même s'ils existent d'autres types de carcinomes mammaires infiltrants, comme par exemple les carcinomes tubulaires ou médullaires, les tumeurs canauxaux invasives représentent près de 80% d'entre eux (Malhotra et al., 2010) (Figure 2).

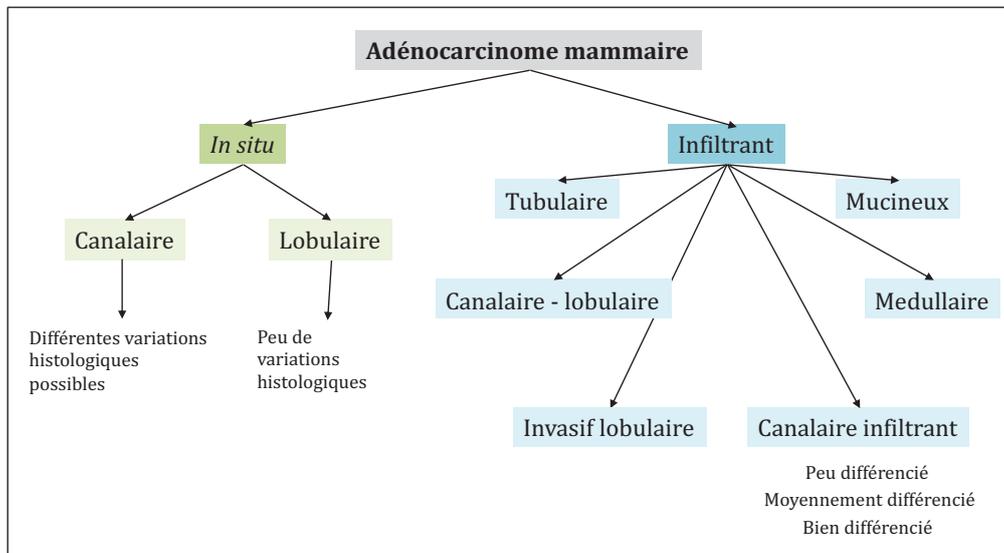


Figure 2: Classification histologique des adénocarcinomes mammaires. Les tumeurs mammaires peuvent être *in situ* ou infiltrantes. Les cancers *in situ* sont majoritairement canaux mais peuvent aussi être lobulaires. Il existe plusieurs sous-types de tumeurs invasives, mais les adénocarcinomes canaux infiltrants représentent 80% d'entre eux (Malhotra et al., 2010).

Le grade histologique des tumeurs canaux invasives peut être caractérisé selon les critères morfo-anatomiques (Elston and Ellis, 1991):

- La formation des tubules (pourcentage de la tumeur formant des structures canaux normales) ;
- Le pléomorphisme nucléaire (taille, régularité et uniformité) ;
- Le compte mitotique (nombre de cellules en mitose dans 10 champs microscopiques).

Un score de 1 à 3 est attribué à chacun de ces critères (graduation d'Elston et Ellis). L'addition des scores donne lieu à un résultat final qui déterminera le grade. Un score de 3 à 5 est attribué aux tumeurs de grade I bien différenciées, et de bon pronostic. Les tumeurs modérément différenciées sont de grade II et ont un score de 6-7. Enfin, les tumeurs de grade III ont un score de 8-9. Elles sont peu différenciées et de mauvais pronostic (Tableau 1).

Caractères	Score
Formation de tubules: - Majorité de tumeur (>75%) - Degré modéré (10-75%) - Peu ou pas de tumeur (<10%)	1 2 3
Pléomorphisme nucléaire: - Petit, régulier et uniforme - Plus gros et de forme variable - Très gros et variable	1 2 3
Comptage mitotique avec un Leitz Ortholux (diffère selon le microscope): - 0 à 9 - 10 à 19 - >20	1 2 3

Tableau 1 : Le grade du cancer du sein en fonction des critères d'Elston et Ellis.

Pour l'ensemble des carcinomes mammaires invasifs, mais surtout pour les canaux, une caractérisation moléculaire en fonction de l'expression des récepteurs à la progestérone (PR), à l'œstrogène (ER) et du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique (HER2) est recommandée.

b- Les sous-types moléculaires et l'hétérogénéité inter-tumorale du cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène. Des mutations différentes donnent lieu à un pronostic et une réponse au traitement spécifique au sous-type considéré. L'essor des techniques de séquençage a permis ces dernières années, de faire une classification moléculaire des tumeurs mammaires. Cinq sous-types ont été mis en évidence et sont les suivants (Eroles et al., 2012):

- Luminal A : Ils représentent 50 à 60% des cancers du sein. Ces sont des cancers hormonaux dépendants à statut ER et /ou PR positif et HER2 négatif avec une faible capacité proliférative (analysée par marquage immuno-histochimique du Ki67).
- Luminal B : Plus agressif que le sous-type précédent (ils sont plus prolifératifs), ils sont diagnostiqués chez 10 à 20% des patientes atteintes d'une tumeur mammaire.

Leur statut hormonal est ER et /ou PR positif et HER2 positif ou négatif (il existe donc deux sous-types dans cette catégorie).

- HER2+ : Avec un statut hormonal HER2+ et ER et/ou PR -, ces tumeurs dont la capacité proliférative est très importante, représentent 15 à 20% des cancers du sein et sont de mauvais pronostics. A noter que seulement 70% d'entre eux expriment la protéine HER2.
- Basal-like : Ce sont des tumeurs triples négatives (HER2- ; ER- ; PR-) qui expriment les gènes normalement exprimés par les cellules myoépithéliales mammaires et les cellules de l'épithélium luminal, mais de façon significativement réduite. Ils sont diagnostiqués dans 10 à 20% des tumeurs.
- Claudin-low : Comme la classe précédente, ces tumeurs (12 à 14%) ont un statut hormonal de triple négatif (HER2- ; ER- ; PR-). Avec une faible expression des gènes impliqués dans les jonctions serrées et cellulaires ainsi qu'une forte expression des gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), elles sont caractérisées par une forte infiltration du système immunitaire.

Cependant même s'il est possible d'attribuer un sous-type hormonal à une tumeur donnée, l'avènement des techniques de séquençage a montré qu'il existe une grande variabilité inter-tumorale et que d'autres mutations sont également corrélées avec un sous type moléculaire et donc, avec l'agressivité du cancer. Par exemple, l'équipe du Dr. Sorlie a montré que le gène TP53 (Tumor Protein 53) est muté chez seulement 16% des cancers de type luminal A tandis que 82% des tumeurs dites basal-like présentent cette mutation (Sorlie et al., 2001).

En fonction du sous-type moléculaire de cancer du sein, les sites métastatiques préférentiels sont différents. En effet les cancers luminaux vont préférentiellement métastaser aux os, les HER2+ au foie et les cancers triples négatifs au cerveau (Tableau 2) (Smid et al., 2008).

Type de cancer	Fréquence	Statut hormonal	Sites métastatiques
Luminal A	50 à 60%	ER/PR+ HER2-	Os: 31% Cerveau: 7,1% Foie: 22,2% Poumons: 6,7%
Luminal B	10 à 20%	ER+ HER2 +/-	Os: 36,6% Cerveau: 7,1% Foie: 11,1% Poumons: 36,7%
HER2+	15 à 20%	ER-HER2+	Os: 19,7% Cerveau: 21,4% Foie: 33,3% Poumons: 13,3%
Triple négatif	10 à 20% pour basal-like 12 à 14% pour claudin low	ER- PR- HER2-	Os: 7% Cerveau: 57,1% Foie: 22,2% Poumons: 40%

Tableau 2 : Les différents sous-types de cancer du sein

c- L'hétérogénéité intra-tumorale

Outre les différences inter-tumorales observées, les progrès en séquençage ont également permis de démontrer l'importante hétérogénéité intra-tumorale au sein même d'une tumeur. En effet, des groupes de cellules tumorales avec des mutations similaires au sein d'une même population mais distinctes entre deux populations, composent la tumeur.

Pour expliquer cette diversité cellulaire, les chercheurs ont émis deux hypothèses. La première présente un modèle stochastique d'évolution tumorale. Ce dernier suggère qu'une cellule devenue tumorale par le biais de mutations est capable de se renouveler pour donner des cellules clonales. Au fur et à mesure des divisions les cellules filles subissent elles-mêmes des mutations les rendant différentes de la cellule initiale. Ici, l'acquisition de mutations au cours des divisions cellulaires permet l'enrichissement de la population tumorale en termes de population cellulaire (Figure 3A) (Nowell, 1976). En revanche, ce modèle laisse aussi sous-entendre qu'un groupe cellulaire avec une mutation dominante (par exemple une capacité de prolifération exacerbée) est capable d'en remplacer un autre (Nowell, 1976). La seconde hypothèse fait intervenir le concept de cellules souches cancéreuses (CSC). Ces cellules possèdent les caractéristiques des cellules souches saines, à savoir les capacités d'auto-renouvellement illimitées et de différenciation afin de donner n'importe quel type cellulaire. Une CSC dans ce cas, aura en

plus le rôle de cellule initiatrice de la tumeur. Dans ce modèle seules les CSC se divisent de façon à donner une cellule fille différenciée et à renouveler le stock de CSC (Figure 3B). C'est au cours du temps que sera alors acquise l'hétérogénéité cellulaire (Reya et al., 2001).

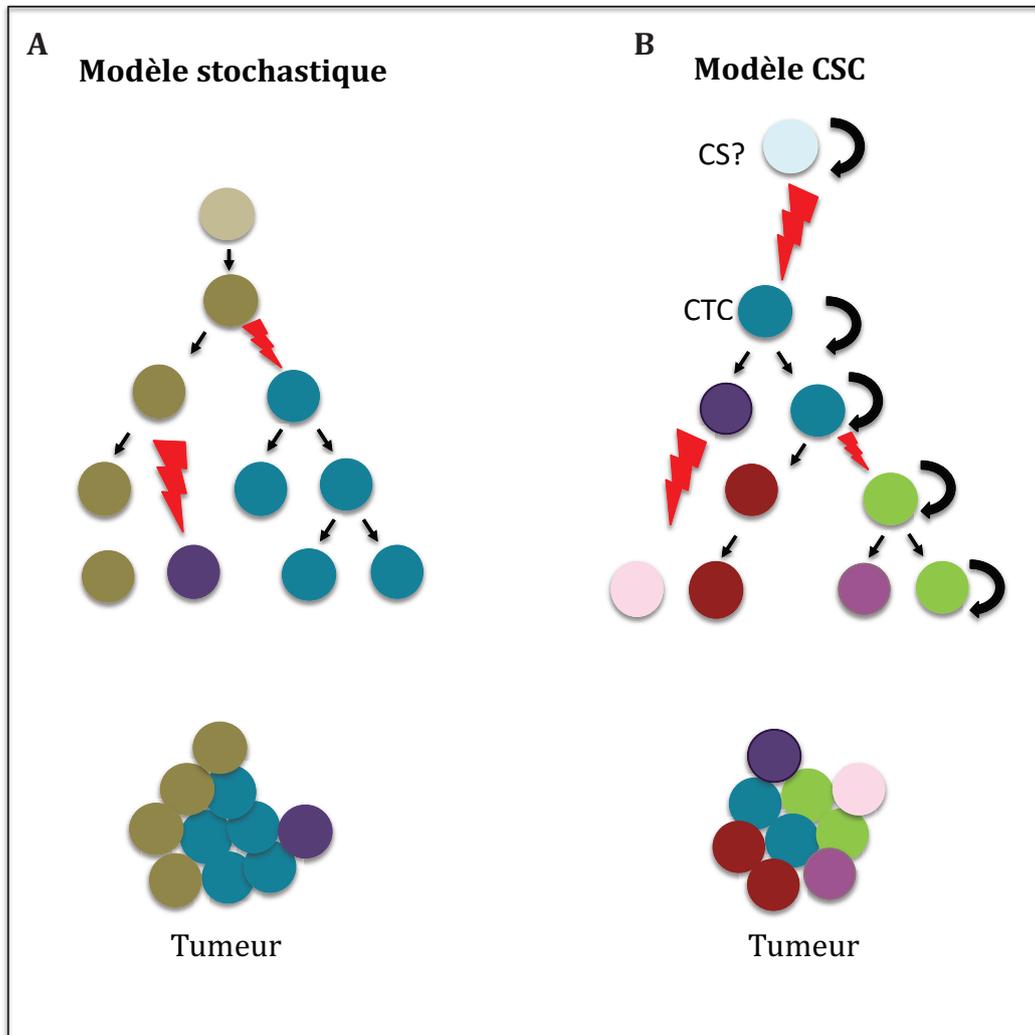


Figure 3 : Modèles suggérés pour expliquer l'hétérogénéité intra-tumorale. (A) Le modèle stochastique présente des cellules tumorales possédant la capacité de se multiplier de façon clonale. Lors de la division d'éventuelles mutations peuvent se produire, venant diversifier la population cellulaire. (B) Le modèle CSC : une CSC possède une capacité de division illimitée. En plus de maintenir le pool de cellules souches, les CSC donneront des cellules filles différenciées et génétiquement différentes qui augmenteront l'hétérogénéité tumorale. En parallèle, des mutations peuvent s'accumuler donnant lieu à différentes populations de CSC. Ce dernier modèle permet l'obtention d'une hétérogénéité tumorale plus importante et perdurable.

Dans le cas du cancer du sein, la greffe de tumeurs humaines dans des modèles de souris immunodéprimées (PDX : Patient-Derived Xenografts) ont permis de montrer l'importance des CSC pour la formation tumorale. En effet, les tumeurs des patientes qui

présentent le plus de CSC sont celles qui se greffent le mieux et sont également les plus susceptibles de former des métastases. De plus l'organisation hiérarchique des modèles PDX est similaire à celle observée dans la tumeur primaire témoignant de la capacité d'auto-renouveau et de différenciation (Charafe-Jauffret et al., 2013).

1-2- Les traitements du cancer du sein

La première ligne de traitement des cancers du sein est la chirurgie. Depuis quelques années les innovations ont permis aux patientes atteintes d'un cancer détecté précocement d'être traitées par chirurgie conservatrice couplée à de l'irradiation par radiothérapie ou à une oncothérapie adjuvante (Aristokleous and Saddiq, 2019). Cela consiste à enlever la tumeur en conservant le maximum de tissu sain afin de reconstruire le sein. Lorsque la patiente a développé un cancer du sein à un stade avancé la mastectomie complète est préconisée, c'est à dire que le sein entier est enlevé ainsi que les ganglions lymphatiques axillaires associés en général (Cadona, 2017). La suite de la stratégie thérapeutique adoptée sera déterminée en fonction de l'âge de la patiente, de son statut pré ou post ménopause et surtout du type histo-moléculaire de cancer du sein. En effet, les tumeurs lumineuses A sont traitées systématiquement par une thérapie endocrine tandis que la stratégie employée pour le traitement de cancers lumineux B sera différente en fonction du statut HER2. Dans le cas de tumeurs lumineuses B HER2-, le traitement est une thérapie endocrine et une chimiothérapie tandis que pour les HER2+, il y aura en plus un traitement anti-HER2. Pour les cancers HER2+ non lumineux, là encore un anti-HER2 sera prescrit en parallèle d'une chimiothérapie. Enfin, les cancers triples négatifs, seront traités par chimiothérapie (Goldhirsch et al., 2011).

Les progrès de la recherche au cours de ces dernières décennies, ont permis de développer une médecine personnalisée proposant des thérapies ciblées dont les activités anti-tumorales semblent particulièrement convaincantes. Par exemple, une autorisation de mise sur le marché temporaire pour le Palbociclib a été obtenue en France. Par combinaison avec du fulvestrant ou avec un inhibiteur de l'aromatase, cet inhibiteur des CDK4/6 (cycline dépendante des kinase), impliqué dans l'activation du cycle cellulaire est utilisé pour le traitement du cancer du sein localement avancé/métastatique, positif aux récepteurs hormonaux et négatif au récepteur du facteur de croissance épidermique humain-2. D'autres molécules ciblant spécifiquement la survie cellulaire et la croissance

exacerbées sont également sur le marché ou en essai thérapeutique. Par exemple de nombreux anti-PARP (poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase) qui inhibent l'activité réparatrice des dommages à l'ADN de cet enzyme, dans le traitement de cancer du sein métastatique muté BRCA spécifiquement, ont déjà montré leur efficacité (Nur Husna et al., 2018).

Malheureusement, lors d'une première ligne de thérapie, les cellules sont exposées à une pression de sélection. De ce fait lorsqu'elles survivent aux traitements initiaux, les cellules acquièrent des capacités de résistance accrues et seront plus à même de métastaser. L'échappement thérapeutique et la rechute métastatique peuvent également être corrélés à la proportion de CSC composant la tumeur primaire (Charafe-Jauffret et al., 2013). En 2008, malgré les avancées de la détection et des traitements de la maladie, encore 30% des patientes atteintes d'une tumeur précoce ont rechuté, avec une atteinte métastatique dans la majorité des cas (Gonzalez-Angulo et al., 2007).

Malgré le bon pronostic vital pour les patientes atteintes d'un cancer du sein localisé, la survie moyenne observée aujourd'hui chez les patientes avec des sites de métastases détectés est seulement de 2 à 3 ans (Kotsakis et al., 2019).

La compréhension du processus conduisant à la colonisation tumorale d'organes secondaires est donc un véritable enjeu de santé publique. C'est pourquoi mon travail de thèse a porté sur le cancer du sein triple négatif métastatique.

2- Le cancer du sein métastatique

La dissémination métastatique est un processus multi-étapes et complexe. Après l'envahissement et l'invasion locale des tissus environnants, les cellules tumorales s'échappent de la tumeur primaire et rejoignent la circulation sanguine. Elles vont devoir rentrer et sortir des vaisseaux par les processus d'intravasation et d'extravasation avant de s'arrêter, survivre et coloniser un organe secondaire spécifique (Figure 4). Ceci est rendu possible grâce à différentes altérations génétiques et épigénétiques des cellules cancéreuses mais aussi au microenvironnement tumoral. Actuellement les métastases sont incurables, ce qui constitue la principale cause de mortalité par cancer.

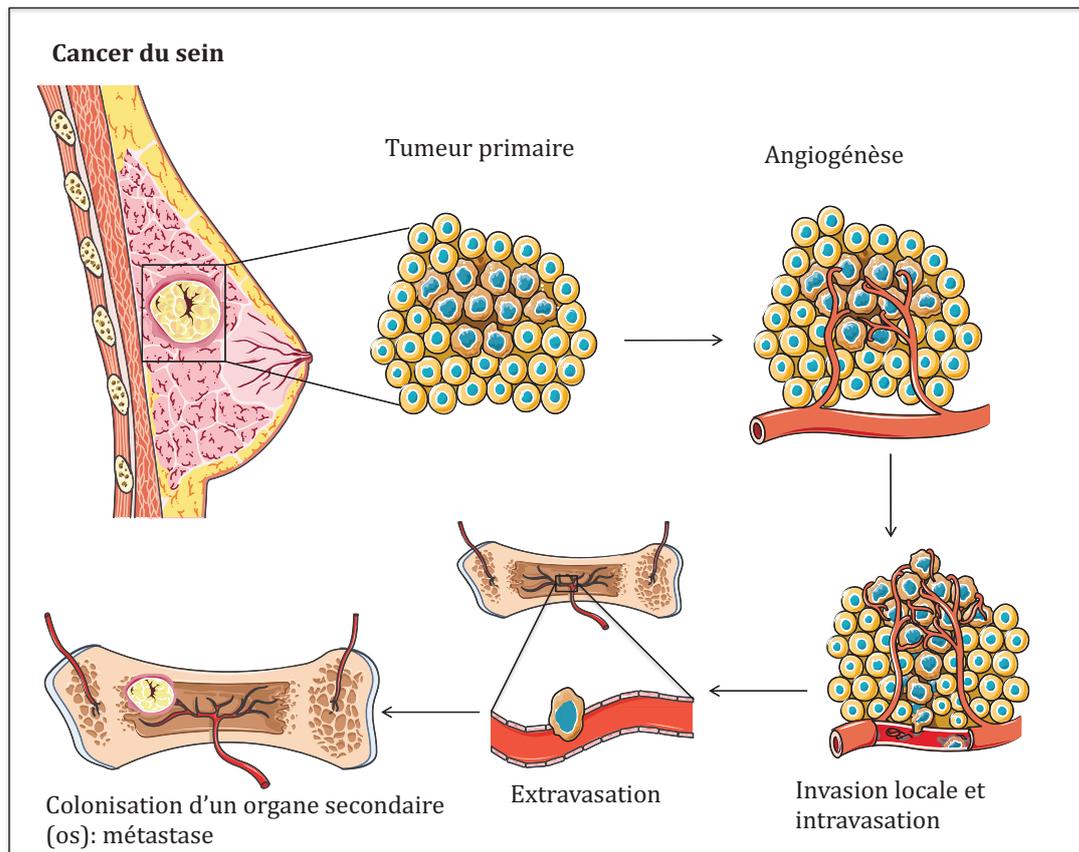


Figure 4: Processus métastatique. Après l'envahissement local du tissu, les cellules tumorales quittent la tumeur primaire, rejoignent la circulation sanguine par intravasation et en sortent par extravasation. Une fois l'organe secondaire atteint, ces cellules doivent survivre et s'adapter au nouvel environnement afin d'y former une tumeur secondaire.

2-1- Processus métastatique

a- La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) : phénomène clef de l'envahissement tumoral

La TEM est un processus complexe très bien décrit en biologie développementale car elle permet les rapides changements morphologiques des embryons métazoaires. De façon physiologique, ce processus a aussi lieu chez l'adulte, dans la cicatrisation ou la régénération tissulaire. Elle est également reconnue comme nécessaire à l'initiation du processus métastatique de cancers épithéliaux qui verront leurs cellules adopter un phénotype mésenchymateux à l'issue de cette transition. De ce fait, les transitions épithélio-mésenchymateuses ont été classifiées en trois types distincts (Kalluri and Weinberg, 2009) :

- La TEM de type 1 est développementale, elle prend lieu pendant l'implantation, l'embryogénèse et l'organogénèse,
- La TEM de type 2 est associée au processus de fibrose et de régénération tissulaire,
- La TEM de type 3, se déroule dans la progression tumorale et métastatique. C'est sur celle-ci que nous allons nous focaliser pour la suite.

Dans la progression tumorale, le processus de TEM permet aux cellules cancéreuses de se désolidariser les unes des autres et d'acquérir des capacités migratoires et invasives. Les cellules passent alors d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux. En d'autres termes les cellules tumorales qui subissent la TEM acquièrent une signature génique de cellules souches cancéreuses (CSC). Ceci est rendu possible grâce à l'activation ou la réactivation de gènes embryonnaires, principalement les *SNAILS* (*SNAIL 1* et *2*), les zinc-finger E-box-binding (*ZEB1* et *2*) et les basic helix-loop-helix (*TWIST*). Ces facteurs de transcription qui jouent un rôle central dans le processus de TEM sont exprimés de façon précoce par les cellules tumorales. Ils agissent conjointement, et parfois même participent à leur régulation transcriptionnelle ; en effet les *SNAIL* régulent positivement l'expression de *TWIST* et des facteurs *ZEB* (De Craene et al., 2005; Guaita et al., 2002). L'activation de ces facteurs de transcription conduit principalement à l'inhibition de la E-cadhérine, protéine épithéliale présente au niveau des jonctions adhérentes. Pour ce faire ils se fixent sur le promoteur du gène *CDH1* (qui code pour la E-cadhérine) afin d'inhiber son expression (Aigner et al., 2007; Cano et al., 2000; Vesuna et al., 2008). La β -caténine membranaire ne peut plus se fixer sur la E-cadhérine, ce qui augmente sa translocation dans le noyau où elle agit comme facteur de croissance et permet un rétrocontrôle positif de l'expression des *SNAIL* et des *ZEB* (Sanchez-Tillo et al., 2011; Wang et al., 2014). En parallèle, ces 3 facteurs de transcription induisent également l'expression de la N-cadhérine et de la vimentine, qui sont des marqueurs mésenchymateux. De plus, ils participent à la régulation négative de tous les autres types de jonctions cellulaires, comme les jonctions serrées, par inhibition de la claudine, de ZO-1 (Zonula Occludens-1) et de l'occludine ; mais aussi des gap jonctions, desmosomes et hémidesmosomes (Huang et al., 2012). Ceci a pour conséquence la perte de la polarité apico-basale des cellules épithéliales.

A l'inverse, la régulation positive d'autres gènes mésenchymateux permet aux cellules de dégrader la matrice extracellulaire, par exemple. En effet les familles *ZEB* et *SNAIL*

permettent la synthèse de métalloprotéinases (MMP), telles que MMP-2 et MMP-9, hautement responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) environnante. Une récente étude a d'ailleurs montré que la régulation positive de SNAIL par une cytokine pro-inflammatoire, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), induit la TEM et promeut la migration des cellules tumorales mammaires humaines MCF-7 *via* la stimulation de la sécrétion de MMP-2 et 9 par ces dernières (Li et al., 2017). En plus de la dégradation de la MEC, les cellules qui ont perdu leurs jonctions subissent une modification de leurs cytosquelettes en partie grâce à l'action des Rho-GTPases RhoA (Ras homolog protein family member A), Rac1 (Rac Family Small GTPase 1) et CDC42 (Cell Division Cycle 42). RhoA permet la polymérisation de l'actine sous forme de fibres de stress (Bhowmick et al., 2001) tandis que Rac1 et CDC42 vont surtout promouvoir la formation de filopodes et lamellipodes (Fife et al., 2014). Ces éléments de protrusion du cytosquelette augmentent la motilité cellulaire et ont une action protéolytique sur la MEC (McNiven, 2013). Ainsi les cellules tumorales vont pouvoir envahir les tissus voisins et la circulation sanguine.

L'expression de ces facteurs de croissance est contrôlée par de multiples voies de signalisation cellulaire récapitulées dans le tableau 3, non exhaustif. Cependant la voie du TGF- β (Transforming Growth Factor- β) semble être l'une des principales voies d'activation de la TEM. Son activation permet, entre autres, la transcription des facteurs ZEB et SNAIL.

De plus, même si les ZEB, les SNAIL et TWIST sont les facteurs prépondérants dans le processus de TEM, d'autres facteurs sont impliqués et sont répertoriés dans le tableau 3. Ils vont majoritairement participer à la répression de la E-cadhérine.

En dehors de l'expression de gènes induisant la TEM par les cellules tumorales elles-mêmes, le microenvironnement tumoral participe également à l'acquisition du phénotype mésenchymateux des cellules cancéreuses. Le microenvironnement tumoral mammaire est composé de cellules endothéliales, de fibroblastes associés à la tumeur (CAF : Cancer Associated Fibroblasts), de cellules de l'immunité, d'adipocytes, de cellules mésenchymateuses et de cellules souches mésenchymateuses. L'inflammation joue un rôle important dans l'induction de la TEM. Les cytokines sécrétées par les macrophages associés à la tumeur, telles que l'IL-1 (Interleukine-1) ou le TNF- α (Tumor Necrosis

Factor- α) promeuvent la TEM des cellules tumorales. En effet des études ont mis en évidence que le TNF- α sécrété par les macrophages active la voie NF κ B (Nuclear Factor-Kappa B) tumorale et induit la TEM des MCF-7 (Dong et al., 2007). Il permet également la signalisation du TGF- β et le processus de TEM dans des cellules de carcinome du côlon (Bates and Mercurio, 2003).

Facteur de transcription	Eléments négativement régulés	Eléments positivement régulés	Voies de signalisation régulatrices
SNAIL1 et SNAIL2	E-cadherine, claudines, occludine, Crumbs3, PALS1, PATJ, cytokératines, desmoplakine et plakophiline	Fibronectine, N-cadherine, collagène, MMP15, MMP2, MMP9, TWIST, ID1, ID2, ZEB1 et ZEB2	TGF β -SMAD3, WNT- β -caténine, Notch, PI3K-AKT, NF- κ B, EGF et FGF
TWIST1	E-cadherine, claudines, occludine, desmoplakine et plakoglobine	Fibronectine, N-cadherine et intégrine α 5	MAPK
ZEB1 et ZEB2	E-cadherine, ZO1, Crumbs3 et plakophiline	N-cadherine et MMP	TGF β -SMAD3, WNT- β -caténine et RAS-MAPK
FOXD3	Inconnu	Inconnu	Intégrine β 1 and laminine
FOXC2	E-cadherine	Fibronectine, vimentine, N-cadherine et α SMA	TGF β -SMAD3
FOXF1	E-cadherine, claudine 1, occludine, desmogleine 1 β , desmogleine 2, desmocolline 2 et desmoplakine	Fibronectine et N-cadherine	Inconnu
FOXQ1	E-cadherine	Fibronectine, N-cadherine et vimentine	Inconnu
FOXO3A	E-cadherine	SNAIL1	AKT
FOXA1	E-cadherine	Fibronectine, vimentine et SNAIL1	TGF β , HGF et AKT
FOXA2	E-cadherine et ZO1	Fibronectine, vimentine, N-cadherine, SNAIL1 et SNAIL2	TGF β , HGF et AKT
Serpent, GATA4 et GATA6	E-cadherine, Crumbs et claudines	N-cadherine et MMP1	Inconnu
HMGA2	E-cadherine	SNAIL1, SNAIL2 et TWIST	TGF β -SMAD3
SOX9	Inconnu	SNAIL2	BMP et PKA
KLF8	E-cadherine	MMP9	Inconnu
CBFA-KAP1	Inconnu	FSP1	Inconnu
ZNF703	E-cadherine	Vimentine, N-cadherine, SNAIL1 et cytokératine	RHO-GTPase
PRX1	E-cadherine	Vimentine et laminine	BMP2 et TGF β

Tableau 3 : Les gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse, leurs cibles et voies de signalisation activatrices. Ce tableau contient une liste non exhaustive des acteurs de la TEM. Tableau modifié d'après Lamouille et Al., Nature, 2014.

L'hypoxie générée par la croissance tumorale démesurée joue également en faveur de la transition. La réponse à l'hypoxie est essentiellement régulée par HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha). Il a été récemment démontré que la forte expression de *HIF-1 α* dans les tissus de carcinomes hépatocellulaires est corrélée à un haut niveau d'expression de *SNAIL1* grâce à sa régulation transcriptionnelle positive par HIF (Zhang et al., 2013). La transition épithélio-mésenchymateuse est donc un processus complexe, multi-étapes et régulé par l'ensemble de l'environnement tumoral qui donne lieu à une redondance de la signalisation cellulaire mise en œuvre dans l'acquisition du phénotype mésenchymateux.

Un nouveau degré de complexité s'ajoute avec l'émergence du concept qu'il existe différents stades de TEM : la TEM complète ou la TEM partielle. En d'autres termes, les cellules de carcinome ont un phénotype soit épithélial, soit mésenchymateux, soit « hybride ». En effet, l'équipe du Dr. Blanpain a montré l'existence de différents stades intermédiaires de TEM qui influencent les propriétés invasives et métastatiques des cellules tumorales. Ces stades de transition hybrides permettent aux cellules d'accroître leur capacité à migrer et survivre dans la circulation sanguine mais aussi à coloniser et former des métastases pulmonaires (Pastushenko et al., 2018).

b- Intravasation et migration des cellules tumorales circulantes (CTC)

L'intravasation est une étape déterminante du processus métastatique. Elle consiste en l'entrée des cellules tumorales localement invasives dans la lumière d'un vaisseau lymphatique ou sanguin. La dissémination par les conduits lymphatiques a largement été observée en clinique et constitue un marqueur de mauvais pronostic (Schoppmann et al., 2004), cependant la circulation sanguine reste la voie majeure de dispersion des cellules tumorales. La TEM précédemment décrite induit des changements moléculaires au sein de la cellule tumorale qui lui permet de passer au travers de la barrière formée par les cellules endothéliales et les péricytes.

Outre les capacités intrinsèques acquises par les cellules cancéreuses, l'hypoxie générée dans le microenvironnement tumoral, induit la sécrétion de HIF1- α qui stimule la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). A travers ce mécanisme, appelé néoangiogenèse tumorale, la cellule cancéreuse promeut la formation de nouveaux

vaisseaux sanguins au sein de la tumeur (Manalo, 2005). A l'inverse des vaisseaux présents dans les tissus sains, le réseau sanguin tumoral est désorganisé, irrégulier, anarchique et composé de capillaires sinusoïdes avec une paroi anormale, incomplète, morcelée en constante reconfiguration (Brix et al., 2004). La néovascularisation tumorale représente donc un double bénéfice pour la dissémination métastatique ; premièrement les cellules cancéreuses se trouvent à proximité des vaisseaux sanguins, deuxièmement la membrane basale incomplète des capillaires va faciliter leur intravasation.

Une fois dans la circulation sanguine, les cellules cancéreuses sont appelées cellules tumorales circulantes ou CTC. La survie dans le sang est un véritable challenge pour elles. En effet, les CTC ont perdu leur adhérence à la MEC, normalement essentielle à la survie cellulaire et doivent donc résister aux programmes de mort cellulaire, ici l'anoïkis, qui est une forme d'apoptose (Kim et al., 2012). Les dommages causés par les forces de cisaillement hémodynamiques et la surveillance du système immunitaire doivent également être contrecarrés par les CTC. L'un des moyens employés pour échapper à l'ensemble de ces phénomènes est la formation d'embolies avec les éléments figurés du sang plaquettaires grâce à l'expression de P et L sélectines (Buergy et al., 2012).

De plus, en fonction des différentes caractéristiques intrinsèques acquises lors de la TEM et surtout de leur état de transition (complet ou hybride), les cellules cancéreuses vont mettre en place des processus d'invasion distincts : la migration solitaire *versus* la migration collective (VanderVorst et al., 2019). En effet, plus la cellule présente des caractéristiques mésenchymateuses plus elle a tendance à migrer seule. A l'inverse, les cellules ayant un état épithélial/mésenchymateux intermédiaire migrent en cluster. Ces cellules n'auront pas tout à fait perdu la capacité de rester jointives car certaines protéines jonctionnelles sont encore détectées, telles la claudin-7 et la E-cadhérine par exemple, mais elles sont stockées dans le compartiment intracellulaire. Ceci s'explique par la présence de Rab 11 (Ras-related protein Rab-11) dans les cellules en EMT partielle, qui permet l'internalisation et le stockage des protéines jonctionnelles dans des vésicules d'endocytose (Aiello et al., 2018). Plusieurs études ont montré que la présence de clusters de CTC était de plus mauvais pronostic clinique que la présence de CTC solitaires.

c- Arrêt et extravasation : de la CTC à la DTC

Après leur arrivée au niveau de l'organe distant, les CTC doivent ressortir des capillaires par un processus appelé extravasation. Deux phénomènes sont décrits concernant l'arrêt et l'invasion des CTC au niveau de l'organe secondaire.

D'une part, l'arrêt des CTC peut avoir lieu de manière passive, mécanique lors du passage dans un vaisseau capillaire de petit calibre. En effet, les CTC en clusters ou avec les agrégats plaquettaires forment des micro-embolies parfois plus larges que le diamètre des vaisseaux. Ces embolies peuvent alors provoquer la rupture des parois du capillaire, permettant aux cellules tumorales d'être directement en contact avec le parenchyme tissulaire de l'organe en question, ce qui facilite leur invasion (Al-Mehdi et al., 2000).

D'autre part, les CTC peuvent également atteindre le site secondaire par tropisme. Ceci a déjà été démontré notamment avec l'axe CXCR4/CXCL12 (CXCR4 chemokine receptors 4 / CXCL12 motif Chemokine Ligand 12). Une étude a mis en évidence le rôle central de CXCR4 dans la dissémination pour plus de 75% des tumeurs solides, incluant les tumeurs mammaires. Son ligand *CXCL12* est aussi surexprimé dans les organes connus comme étant des sites métastatiques préférentiels : le foie, les poumons et l'os (Dubrovskaya et al., 2013). Pour parvenir à coloniser un nouvel organe, le processus d'extravasation mis en place par les cellules cancéreuses diffère de celui précédemment décrit : il dépend du microenvironnement du site métastatique. Contrairement au réseau sanguin tumoral anarchique, les capillaires présents dans les tissus secondaires sains, sont fonctionnels et donc imperméables. Ceci rend l'extravasation plus difficile que l'intravasation pour les cellules qui miment alors le mécanisme de sortie leucocytaire. Ce mécanisme fait intervenir les sélectines P-, E- et L. En particulier, l'adhésion des cellules cancéreuses à l'endothélium par l'intermédiaire de la E-sélectine, initie l'étape de roulement. Les cellules tumorales arrêtent leur migration grâce à leurs intégrines membranaires capables d'adhérer à l'endothélium activé et initient leur extravasation par diapédèse trans-endothéliale *via* l'activation des petites GTPases de la famille Rho (Gout et al., 2008). Le site métastatique influence également l'efficacité de l'extravasation tumorale. Par exemple, les CTC qui s'apprêtent à coloniser les poumons se trouvent face à un endothélium complètement imperméable tandis que les capillaires fenestrés de la moelle osseuse sont plus perméables et représentent un obstacle mineur à la colonisation de l'organe (Itkin et al., 2016).

Malgré toutes les stratégies développées par les cellules cancéreuses pour coloniser un organe secondaire, le processus métastatique est relativement inefficace. De ce fait, les lésions métastatiques peuvent n'apparaître que plusieurs années après invasion de l'organe. Pendant ce temps, les cellules tumorales restent en dormance et forment uniquement des micro-colonies métastatiques. Elles sont alors nommées cellules tumorales dormantes ou DTC.

d- De la DTC à la macro-métastase

La dormance des cellules tumorales peut être expliquée par deux mécanismes. Premièrement les DTC sont dans un état de quiescence. La TEM qu'elles ont subie les bloque dans un état mésenchymateux qui leur fait perdre leur capacité proliférative dans ce nouvel environnement (Cameron et al., 2000). Une autre explication est qu'il s'établit un équilibre entre prolifération et apoptose résultant à la fois, de la surveillance du système immunitaire et de la dormance angiogénique qui limite l'accès aux nutriments et à l'oxygène (Farrar et al., 1999; Holmgren et al., 1995).

La sortie de la dormance est un phénomène encore mal décrit en raison des limitations techniques pour détecter et suivre une cellule quiescente jusqu'à sa réactivation. Néanmoins, contrairement aux CTC, les cellules tumorales métastatiques présentent une signature épithéliale marquée entre autres, par la réexpression de la E-cadhérine (Chao et al., 2010). De plus, les cellules mésenchymateuses possèdent une capacité proliférative bien moindre que les cellules épithéliales. Ces observations ont conduit au concept de transition mésenchymo-épithéliale (TME), dans lequel on considère que les DTC restent en état de dormance jusqu'à ce qu'elles initient la TME leur permettant de proliférer à nouveau pour former des macro-métastases. L'expression des gènes induisant l'EMT doit donc être réprimée. Par exemple, l'utilisation d'un système inductible pour *TWIST1* dans des modèles murins de carcinomes épidermoïdes confirme que l'expression de *TWIST1* est nécessaire aux étapes précoces d'invasion précédemment décrites. Cependant la perte de l'expression de *TWIST1* par les cellules au niveau de l'organe distant est associée à une augmentation de la prolifération des cellules et à la formation de macro-métastases (Tsai et al., 2012). De même la répression du facteur d'induction de la TEM, *PRX1* (Paired

related homeobox 1) est nécessaire à la formation de métastases de cellules de carcinome mammaire humain, les BT-59 (Ocaña et al., 2012).

2-2- Localisation métastatique préférentielle : théorie du « seed and soil » et le tropisme osseux

La théorie du « seed and soil » a été créée par un chirurgien anglais du XIX^{ème} siècle, Stephen Paget (Ribatti et al., 2006). En 1889, il émet l'hypothèse que la colonisation d'un organe secondaire n'est pas un phénomène du hasard. D'après lui, les cellules tumorales métastatiques (« the seed ») présenteraient une affinité particulière pour un organe secondaire et un microenvironnement spécifique (« the soil », qui fournit un avantage de croissance aux « the seed »). Depuis d'autres études ont conforté sa théorie en identifiant une signature génétique particulière en fonction de la localisation de la tumeur secondaire, ainsi qu'un adressage particulier des CTC, influencé par la sécrétion de molécules chimiotactiques par le site distant.

Une grande majorité des patientes à un stade avancé de cancer du sein développent des métastases osseuses. Récemment, l'équipe du Dr. Marc J. Van de Vijver a montré que 71,5% des patientes métastatiques présentent des lésions osseuses. De plus, ces travaux rapportent l'expression, dans la tumeur primaire, de 15 gènes spécifiquement associés à la rechute osseuse (Savci-Heijink et al., 2016). Une autre étude a également démontré que certains gènes, comme *CXCR4*, *IL-11*, *MMP-1* et *CTGF* (Connective Tissue Growth Factor), impliqués dans la physiologie osseuse, coopèrent afin de promouvoir l'adressage spécifique des cellules dans ce tissu (Kang et al., 2003). Même si la survenue de lésions osseuses implique toutes les étapes précédemment citées, d'autres mécanismes spécifiques tels que l'établissement d'une niche pré-métastatique ou l'ostéomimétisme sont également mis en jeu.

II- Les métastases osseuses

Afin de mieux comprendre les processus impliqués dans le développement des lésions osseuses, il est essentiel de rappeler l'organisation et la physiologie de cet organe particulier.

1- La physiologie du tissu osseux

Le corps humain adulte est composé de 213 os, hors os sésamoïdes. Le squelette, en plus de jouer un rôle locomoteur évident, présente également un rôle structural en maintenant la charpente corporelle et protecteur des organes internes. Il est aussi un réservoir de cytokines, de facteurs de croissance et de minéraux. Ceci est rendu possible grâce à 4 catégories d'os, en constant renouvellement : les os plats, les os courts, les os irréguliers et enfin les os longs (Clarke, 2008). Certains os, même à l'âge adulte conservent une fonction d'hématopoïèse. C'est notamment le cas des vertèbres, des crêtes iliaques et d'une partie du fémur et de l'humérus (Nather et al., 2005). Lors de cette thèse nous sommes intéressés plus particulièrement aux os longs comprenant entre autres, la fibule, le fémur et le tibia.

1-1- L'architecture du tissu osseux

L'os long est composé d'os cortical ou compact, lisse et résistant qui entoure un os dit trabéculaire ou spongieux, poreux et de faible résistance. Il est recouvert par une membrane richement vascularisée et innervée, appelée périoste qui permet sa croissance en épaisseur. Chaque os long peut être divisé en 3 parties anatomiquement différentes : l'épiphyse, la métaphyse et la diaphyse (Nather et al., 2005). Au sein de la région diaphysaire, siège la moelle osseuse. Dans la métaphyse se trouve la plaque de croissance, qui permet à l'os long de croître en direction de la diaphyse durant l'enfance. La surface interne de l'os cortical, de l'os trabéculaire et de la paroi des vaisseaux sanguins est également recouverte d'une fine couche membranaire, l'endoste. Cette membrane est en

contact avec la vascularisation et l'espace médullaire, est le lieu où siège des principales cellules impliquées dans physiologie osseuses, les ostéoblastes et ostéoclastes (Figure 5).

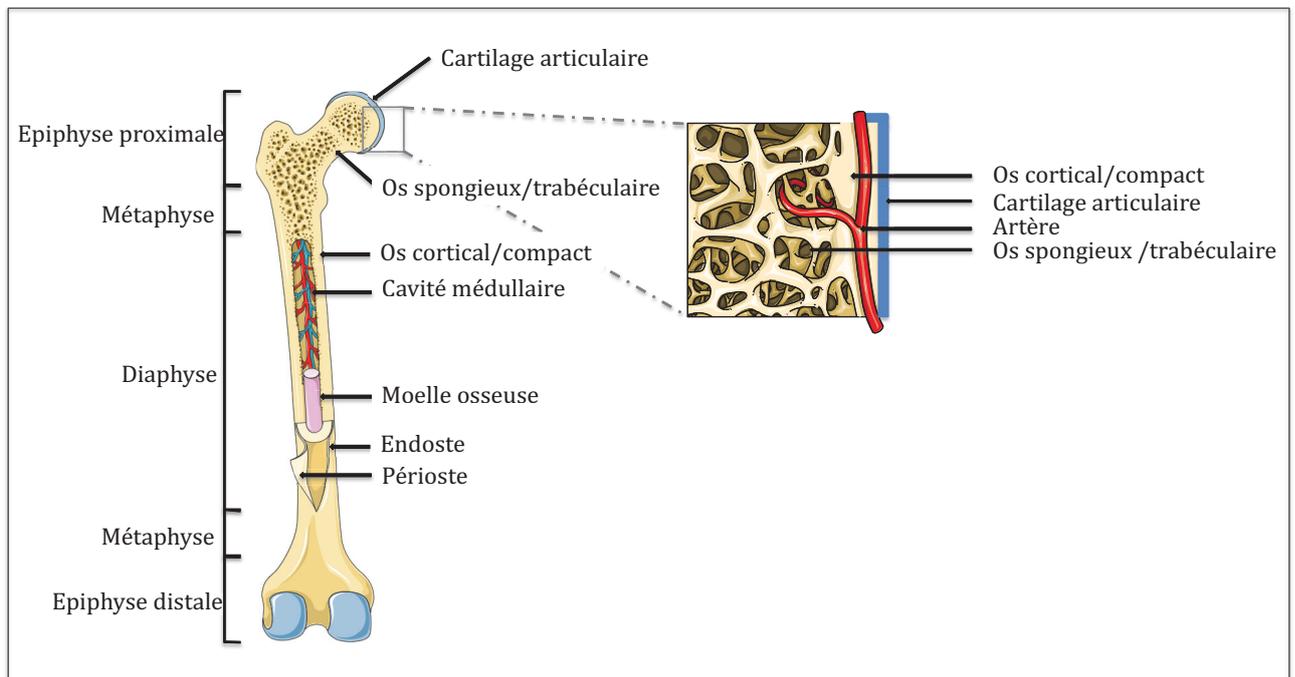


Figure 5 : Structure d'un os long

1-2- Microenvironnement osseux

a- La matrice osseuse

La matrice osseuse organique est composée à 90% de collagène fibrillaire de type I, une glycoprotéine fibreuse et rigide responsable de la résistance osseuse. Les autres protéines, non-collagéniques, sont de types protéoglycanes ou glycoprotéines. La majorité des glycoprotéines de la matrice osseuse contiennent un domaine RGD (c'est à dire la succession d'acides aminés Arg-Gly-Asp), comme par exemple la fibronectine, qui permet notamment la liaison des cellules à la matrice *via* leur intégrine membranaire (Flores et al., 1992; Robey et al., 2009).

L'hydroxyapatite de calcium est le composant minéral majoritaire et contribue à la rigidité osseuse mais on trouve également du magnésium, des carbonates ainsi que des phosphates acides (Kini and Nandeesh, 2012).

b- Les cellules du remodelage osseux

L'os est un organe dynamique en constant renouvellement. Il existe donc un processus complexe de remodelage osseux dont les acteurs cellulaires principaux sont les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes. Pour que l'homéostasie osseuse soit respectée, l'équilibre entre formation et dégradation doit être maintenu. Plusieurs facteurs systémiques et de croissance agissent conjointement dans ce but.

Les ostéoblastes

De forme cuboïde, les ostéoblastes qui sont des cellules polarisées situées tout le long de la surface osseuse, représentent 4 à 6% des cellules du microenvironnement osseux. Ils sont connus comme étant les principaux acteurs de la formation osseuse. Ces cellules sont dérivées des CSM (Cellules Souches Mésenchymateuses), qui sont également les précurseurs des chondrocytes, des adipocytes et des myocytes. De ce fait, la différenciation des ostéoprogéniteurs dans le lignage ostéoblastique nécessite l'expression de gènes codant des facteurs de transcription spécifiques, comme *RUNX2* (Runt-Related Transcription factor 2, également connu sous la nomenclature *Cbfa1*) qui est le facteur clé de la transition en pré-ostéoblastes. En effet, la mutation du gène *RUNX2* est létale pour la souris, à cause de l'absence d'ostéoblaste entraînant un retard majeur de l'ossification (Komori et al., 1997). *RUNX2* induit l'expression de gènes associés à une signature ostéoblastique, tels que l'*ALP* (alcaline phosphatase), l'*OCN* (ostéocalcine), ou encore *Col1A1* qui code pour la chaîne $\alpha 1$ du collagène I (Phimphilai et al., 2006; Zaidi et al., 2001). La forte expression de l'*ALP* est corrélée au stade pré-ostéoblastique, où les cellules sont très prolifératives.

L'expression de *RUNX2* est contrôlée par de multiples voies de signalisation cellulaire. Les BMP (Bone Morphogenetic Protein) appartiennent à la superfamille du TGF- β . Dans le cas de l'ostéoblastogenèse, la liaison de BMP2 à son récepteur permet la phosphorylation du facteur de transcription Smad qui, une fois transporté dans le noyau, induit l'expression de *RUNX2*. Par la suite, l'interaction entre Smad et *RUNX2* est nécessaire à l'expression de l'*ALP* (Phimphilai et al., 2006). L'activation de la voie Wnt/ β -caténine induit également l'expression de *RUNX2* (Gaur et al., 2005).

Pour que le pré-ostéoblaste continue sa différenciation en ostéoblaste immature, l'expression d'*OSX* (osterix), un facteur en aval de *RUNX2*, est également requise (Nakashima et al., 2002; Nishio et al., 2006). *OSX* permet à l'ostéoblaste mature de sécréter du collagène de type I et d'autres protéines matricielles (ostéopontine et sialoprotéines). De plus, il induit également un rétrocontrôle négatif de la voie Wnt/ β -caténine, et de ce fait, de la prolifération cellulaire notamment par l'induction de *Dkk1* (Dickkopf-related protein 1), un inhibiteur de la voie Wnt (Zhang et al., 2008).

Enfin le facteur *ATF4* (Activating Transcription Factor 4), en aval de *RUNX2*, contrôle la différenciation en ostéoblaste mature, notamment en augmentant la synthèse de l'OCN. Ce stade de transition est également marqué par la synthèse de *RANKL* (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand) par les ostéoblastes, médiée par *ATF4* (Yu et al., 2013). Pour résumé, au cours des différents stades de la différenciation ostéoblastique l'expression contrôlée des gènes est essentielle à la formation de la matrice osseuse organique (Figure 6).

D'autres part l'ostéoblaste est également la cellule responsable de la minéralisation osseuse, car il permet la formation des cristaux d'hydroxyapatite composés de calcium et de phosphate.

L'homéostasie entre le *Pi* (phosphate inositol) et *PPi* (pyrophosphate inositol) est le déterminant principal de la formation des cristaux et donc de la minéralisation (Hessle et al., 2002). Cette homéostasie est majoritairement régulée par l'activité phosphatase de l'ALP qui induit l'hydrolyse du *PPi* en *Pi*, permettant l'enrichissement des vésicules matricielles de calcium en phosphate (Garimella et al., 2006). Le rôle central de l'ALP dans la minéralisation osseuse a été conforté par une étude montrant que la perte d'expression en ALP induit une hypominéralisation chez la souris (Anderson et al., 2004). En parallèle, d'autres enzymes synthétisées par les ostéoblastes, comme *PHOSPHO1* (phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase 1), participe également à la libération de *Pi* et en conséquent, au maintien de la minéralisation osseuse (Houston et al., 2004).

Une fois la formation osseuse accomplie, l'ostéoblaste peut soit entrer en apoptose, soit effectuer une dernière transition pour devenir une cellule bordante ou un ostéocyte.

Les cellules bordantes et les ostéocytes

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes matures en quiescence (Figure 6). Bien que leur fonction soit encore très mal connue, certaines études leur proposent un rôle dans l'activation des ostéoclastes par la sécrétion d'OPG (ostéoprotogérine) et de RANKL. Très récemment, l'équipe du Dr. Kalajzic, a décrit les cellules bordantes comme le principal réservoir d'ostéoblastes à l'âge adulte. En effet, elles sont capables de se ré-activer en ostéoblastes après un stimulus anabolique ou en condition de stress (Matic et al., 2016).

Les ostéocytes, quant à eux, représentent 90 à 95% des cellules osseuses. Ils sont localisés dans les lacunes d'os minéralisé et ont une morphologie dendritique. Ces cellules sont actuellement considérées comme le véritable chef d'orchestre du remodelage osseux. En effet, elles sécrètent SOST (sclérostine) qui inhibent les ostéoblastes, et activent les ostéoclastes *via* la sécrétion du facteur RANKL (Poole et al., 2005; Zhao et al., 2002) (Figure 6).

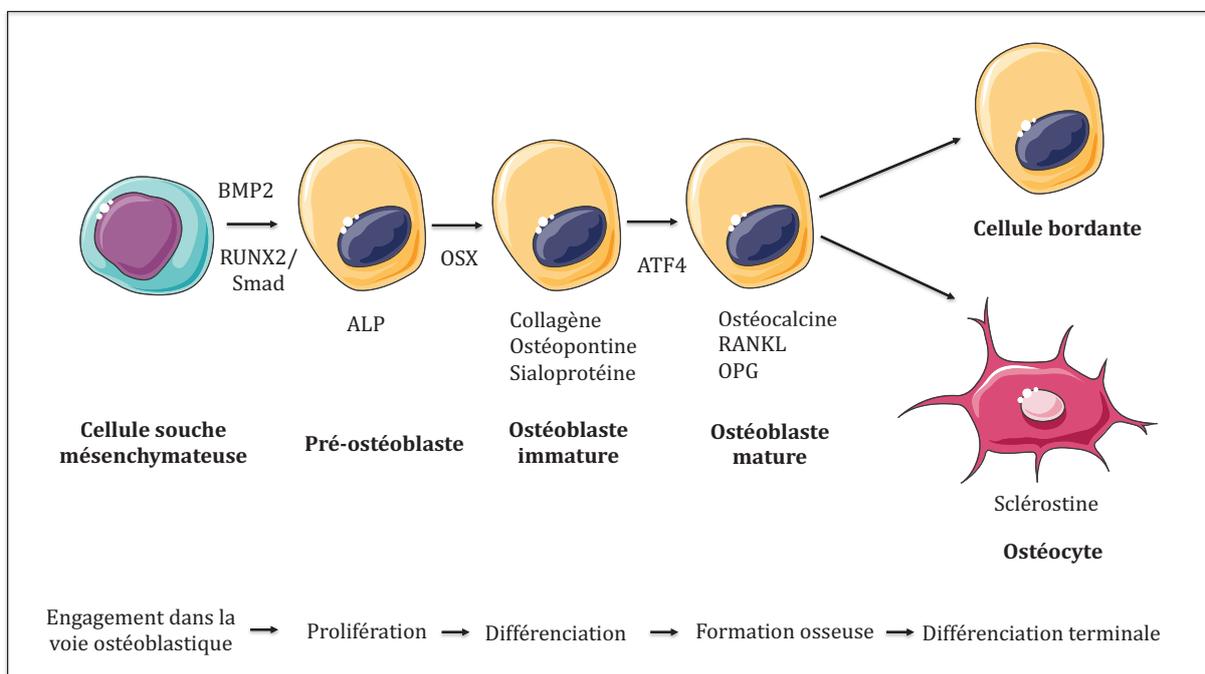


Figure 6 : L'ostéoblastogenèse. Schéma de la différenciation d'un ostéoblaste depuis la cellule souche mésenchymateuse jusqu'à l'ostéocyte ou la cellule bordante. Les gènes principaux de la différenciation sont indiqués ainsi que les marqueurs protéiques présents dans les cellules à chaque étape.

Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules polarisées et multinucléées issues de la fusion de macrophages. Ils ont donc pour précurseur les cellules circulantes de la lignée monocytaire. Le microenvironnement osseux influence leur transition vers l'état de pré-ostéoclaste. En effet, par la sécrétion de M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), les ostéoblastes induisent la prolifération et la survie des progéniteurs ainsi que la stimulation de l'expression *RANK* (Receptor Activator of NFκB) (Arai et al., 1999; Hattersley et al., 1991). De plus les ostéocytes, les ostéoblastes et les cellules stromales sécrètent du RANKL qui va alors pouvoir se lier à son récepteur RANK. La signalisation RANK/RANKL permet l'induction et l'activation du facteur de transcription NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T Cells 1) qui interagit avec cFos (Takayanagi et al., 2002). Cette étape est essentielle à la différenciation et à l'activité ostéoclastique car elle stimule la synthèse des enzymes TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase), de la cathepsine K ainsi que de MMP9 (Sundaram et al., 2007). Cependant les cellules stromales et les ostéoblastes sécrètent aussi des facteurs de régulation négatives de la différenciation ostéoclastique, principalement l'OPG (ostéoprotogérine) qui en liant à RANKL, inhibe l'activation de son récepteur RANK (Lacey et al., 1998) (Figure 7). On parle de l'axe OPG/RANK/RANKL.

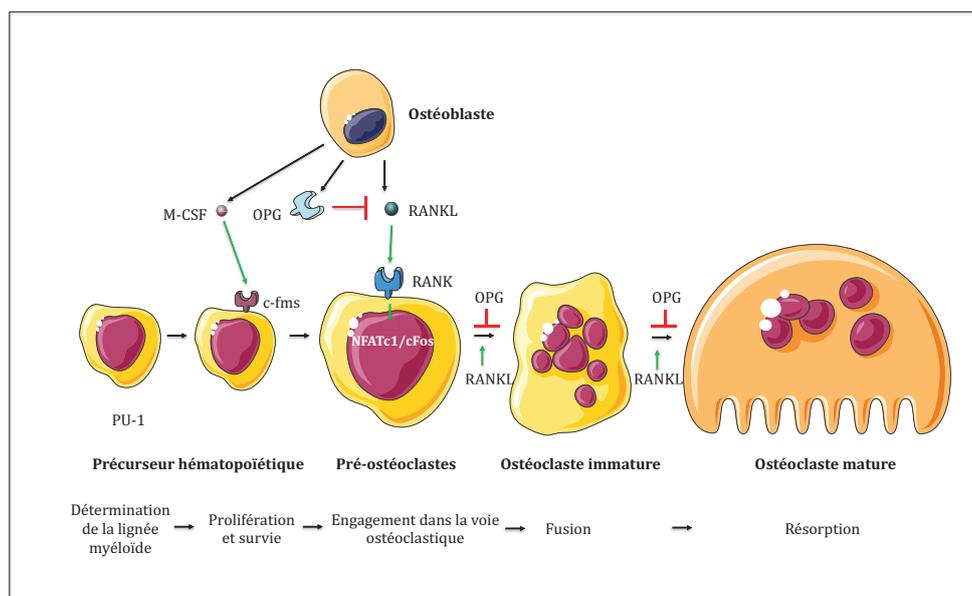


Figure 7: L'ostéoclastogénèse. Schéma de la différenciation d'un ostéoclaste depuis le précurseur hématopoïétique. Les gènes principaux de la différenciation sont indiqués ainsi que les marqueurs protéiques présents dans les cellules à chaque étape.

Sous l'influence de RANKL, les ostéoclastes subissent une réorganisation de leur cytosquelette d'actine leur permettant de migrer vers le site de résorption osseuse (Saltel et al., 2008). Ils forment alors un « joint » avec la surface osseuse, grâce à l'intégrine $\alpha\nu\beta_3$, de façon à établir une zone d'étanchéité. A ce stade les ostéoclastes relarguent des vésicules de protons entraînant une acidification du milieu et la dégradation des composants minéraux. Par la suite les enzymes TRAP, MMP9 et cathepsine K dégradent la matrice organique (Delaisé et al., 2003; Halleen et al., 1999). Il en résulte la formation d'une lacune acide, contenant les débris osseux qui est appelée lacune d'Howship (Cappariello et al., 2014). L'étape terminale de la dégradation osseuse est l'élimination des débris par un système de transport vésiculaire transcytotique puis la libération dans l'espace extracellulaire (Salo, 1997) (Figure 8). Une fois la résorption accomplie l'ostéoclaste rentre dans un processus de mort cellulaire par apoptose, ou retourne à l'état de pré-ostéoclaste.

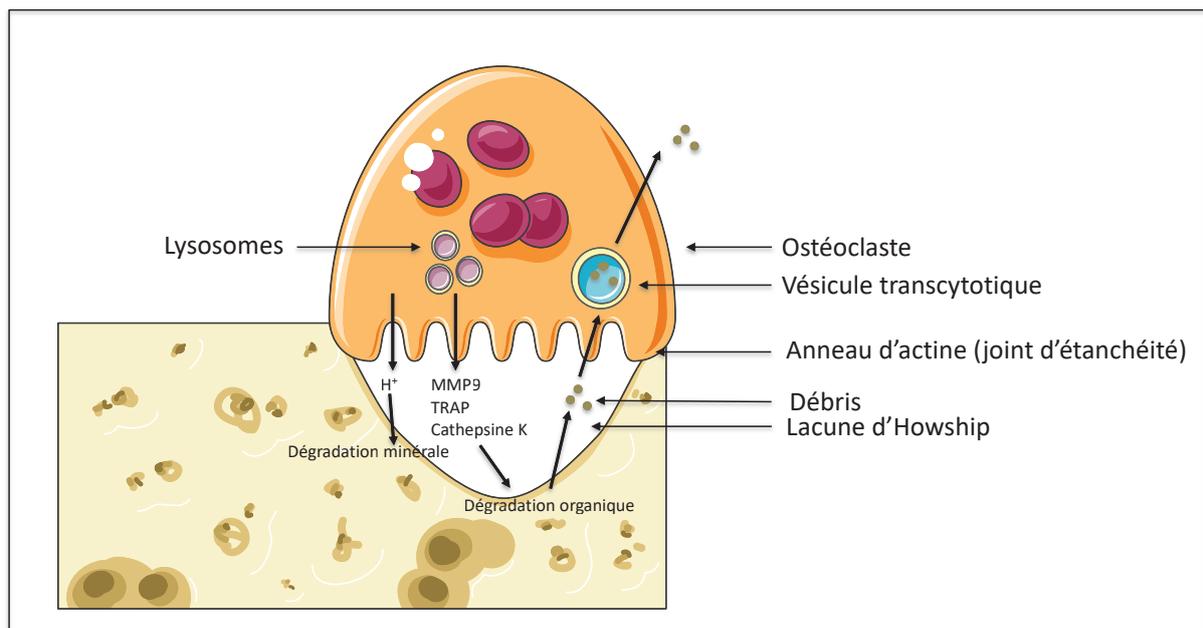


Figure 8 : Schéma de la résorption osseuse. L'ostéoclaste adhère à la matrice osseuse en formant un anneau d'actine, délimitant une zone d'étanchéité, appelée lacune d'Howship. Par la suite il libère des protons entraînant l'acidification du milieu et la déminéralisation osseuse. Enfin, des lysosomes contenant les enzymes MMP9, TRAP et cathepsine K sont expulsés et la dégradation de la matrice organique commence. Les débris issus de la résorption sont endocytés puis relargués dans le domaine extracellulaire.

Le cycle de remodelage osseux

Les ostéoblastes et ostéoclastes forment des clusters de cellules dans une structure anatomique temporaire appelée BMU (Bone Multicellular Unit). Des ostéocytes et des cellules bordantes sont également présents dans ce complexe. Le processus de remodelage osseux dure plusieurs semaines pendant lesquelles 4 phases vont se succéder : l'activation des ostéoclastes et la résorption osseuse, la phase d'inversement qui comprend l'inactivation des ostéoclastes et la différenciation des ostéoblastes, la formation par les ostéoblastes et enfin la phase de terminaison avec l'inactivation des cellules formatrices de l'os (Figure 9) (Florencio-Silva et al., 2015).

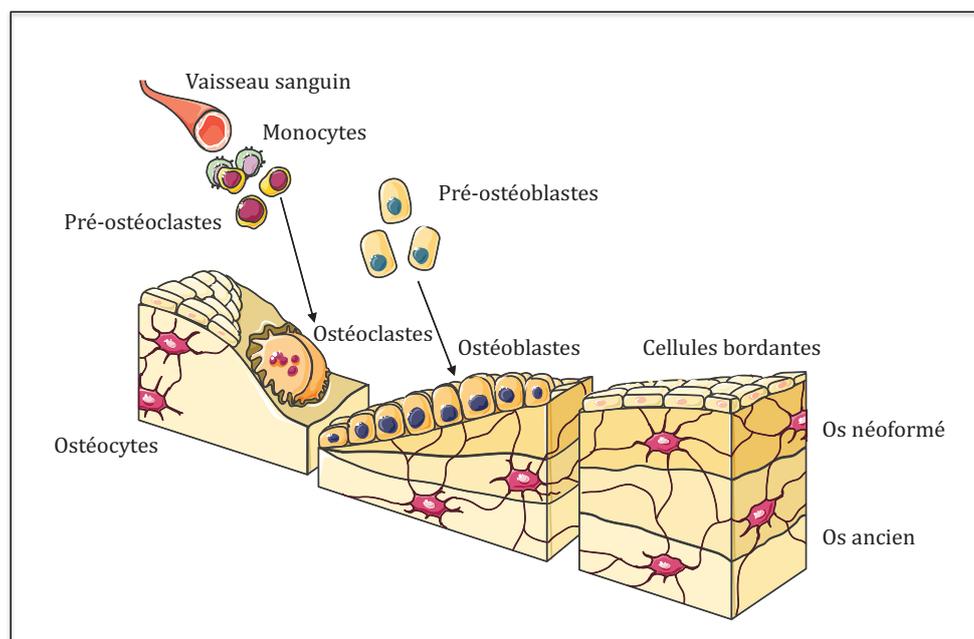


Figure 9 : Le remodelage osseux. Il commence par l'activation et la différenciation des ostéoclastes qui résorberont alors la matrice osseuse. Par la suite, un processus d'inversion avec l'inactivation des ostéoclastes et l'activation des ostéoblastes se produit. Il s'en suit de la néoformation d'os avant une étape de terminaison et la différenciation terminale des ostéoblastes.

Chacune de ces étapes est finement régulée par des facteurs locaux ou systémiques présentés dans le Tableau 4.

Phase du remodelage	Facteurs régulateurs
Activation	Régulation positive: PTH, IGF-1, IL-1, IL-6, TNF- α Régulation négative: oestrogènes
Résorption osseuse	Régulation positive: RANKL, M-CSF, intégrine $\alpha\beta 3$, IL-1 α , IL-1 α , TNF- α , glucocorticoïdes Régulation négative: OPG, oestrogènes, calcitonine, TGF- β , IGF
Inversement Formation osseuse	TGF- β , IGF, BMP Régulation positive: WNT, BMP, IGF, PTH, vitamine D, Runx2, TGF- β , éphrine B2 Régulation négative: glucocorticoïdes, pyrophosphate
Terminaison	Sclérostine, TGF- β , vitamine D

Tableau 4 : Facteurs impliqués dans les différentes phases du remodelage osseux

- Régulations systémiques (Figure 10)
 - La parathormone, PTH : C'est une hormone sécrétée par les glandes parathyroïdes et qui a pour fonction principale la régulation de l'homéostasie calcique. Les ostéoblastes présentent à leur surface le récepteur à la PTH. Une dualité dans le rôle de cette hormone est décrite. En effet, elle stimule la production de RANKL et inhibe la sécrétion de l'OPG par les ostéoblastes ce qui favorise donc la dégradation osseuse (Lee and Lorenzo, 1999). En parallèle, la PTH induit la survie, la prolifération ainsi que la différenciation des ostéoblastes et active les cellules bordantes (Dobnig and Turner, 1995). Ceci est possible car elle entraîne la sécrétion de Wnt10b par les lymphocytes T et de ce fait, active la signalisation Wnt/ β -caténine, essentielle à l'ostéoblastogenèse (Bedi et al., 2012).
 - La vitamine 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (forme active de la vitamine D) : Elle promeut l'activation des ostéoclastes ainsi que la transition des ostéoblastes en ostéocytes et donc la dégradation osseuse. La conversion de la vitamine D en sa forme active requiert la synthèse, par les ostéoblastes, de l'enzyme CYP27B1 dont la présence est maximale juste avant la phase de minéralisation (Atkins et al., 2007).
 - La calcitonine : Les ostéoclastes sont pourvus du récepteur à la calcitonine. Cette hormone inhibe directement l'activité des ostéoclastes en altérant la formation de la zone d'étanchéité (Chambers et al., 1986). En parallèle elle induit la sécrétion de BMP2 par les ostéoclastes, ce qui stimule l'ostéoblastogenèse (Okubo et al., 2000).

- Les oestrogènes : Ils induisent la formation osseuse *via* la stimulation de la prolifération des ostéoblastes et répriment l'activité des ostéoclastes en bloquant la signalisation induite par RANKL et donc leur différenciation (Shevde et al., 2000). Ils modulent également la sécrétion de cytokines pro-ostéoclastiques, telles que les IL-1 et 6 et le TNF- α (*via* leur action sur les lymphocytes T) (Pacifici, 2009).
 - Les glucocorticoïdes, GC : ils stimulent la résorption osseuse. En effet, la liaison des GC à leur récepteur présent sur les ostéoblastes inhibe la synthèse de RUNX2, et par conséquent affecte leur prolifération et leur différenciation (Pereira et al., 2001). En parallèle ils inhibent la sécrétion d'OPG et stimulent celle de RANKL, ce qui leur confère un rôle pro-ostéoclastique (91).
- Régulation locale (Figure 10)

Tous les facteurs décrits précédemment comme acteur de l'ostéoblastogenèse et de l'ostéoclastogenèse participent à la régulation locale du remodelage osseux.

- Le TGF- β : Il est présent sous forme latente dans la matrice osseuse. L'activité de résorption permet son activation en TGF- β 1, ainsi que sa sécrétion par l'ostéoclaste. L'action du TGF- β reste encore très controversée. En effet, le TGF- β 1 permet le recrutement (par chimiotactisme) d'ostéoprogéniteurs dans la lacune d'Howship, mais également leur prolifération (Tang et al., 2009). A l'inverse, la délétion du TGF- β 1 induit le blocage de l'apoptose des ostéoblastes lors de leur transition en ostéocytes (Karsdal et al., 2002). De même, *in vitro* un traitement continu de TGF- β 1 bloque la minéralisation osseuse et module également l'activité des ostéoclastes de façon graduelle. A faible concentration, le TGF- β 1 stimule le recrutement et la différenciation des macrophages tandis qu'à concentration élevée il favorise la sécrétion d'OPG et inhibe celle de RANKL par les ostéoblastes. En résumé le TGF- β est essentiel au couplage entre résorption et formation osseuse (Wu et al., 2016).
- IGF1 (Insulin Growth Factor 1) : C'est le facteur de croissance le plus abondant dans la matrice osseuse. Sa sécrétion est entre autres, induite par la PTH. Tout comme le TGF- β , son activité est importante dans le couplage résorption/formation. Tandis qu'il stimule l'ostéoblastogenèse, la survie et la

fonction des ostéoblastes, il induit également la résorption osseuse *via* la régulation de la production de RANKL (Wang et al., 2006; Xian et al., 2012).

- Les systèmes de guidage axonal Ephrines/Eph : Les ostéoblastes et ostéoclastes en contact vont directement s'autoréguler. En effet les ostéoblastes présentent le récepteur EphB4 auquel se lie son ligand l'Ephrine B2 présent sur les ostéoclastes, ce qui active l'ostéoblastogenèse et bloque l'activité de NFATc1 dans l'ostéoclaste (Zhao et al., 2006). A l'inverse, la liaison de l'Ephrine A2 pré-ostéoclastique à son récepteur ostéoblastique EphA2 inhibe la différenciation des cellules formatrices de l'os mais active la différenciation du pré-ostéoclaste (Irie et al., 2009).

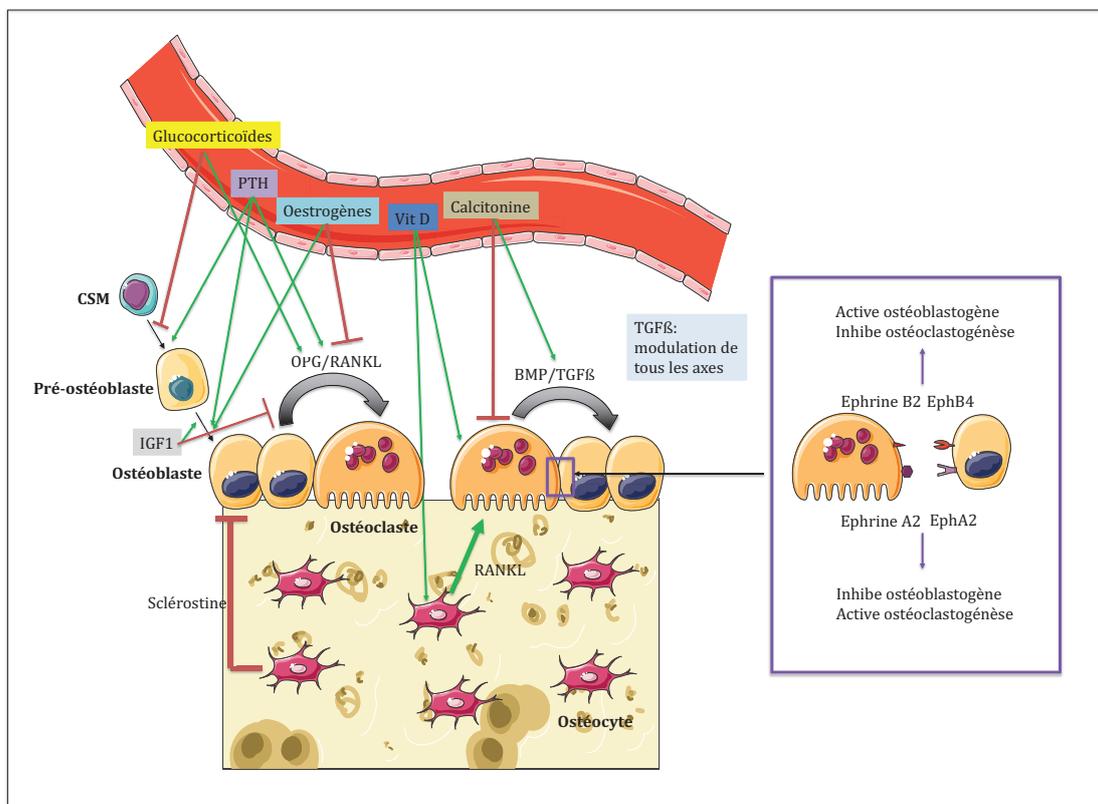


Figure 10 : Action des facteurs systémiques et locaux sur les acteurs de la résorption osseuse.

1-3- Niche hématopoïétique

Chez les vertébrés, à l'exception des poissons, l'os est le siège de l'hématopoïèse adulte. La moelle osseuse est donc le réservoir de CSH. L'ensemble des composants cellulaires de l'os coopère afin de maintenir l'auto-renouveaulement, la quiescence, la différenciation, la survie et la localisation des progéniteurs hématopoïétiques dans une surface anatomique

précise. En 1978, Schofield, fut le premier à faire émerger le concept de niche hématopoïétique (Schofield, 1978). Depuis de nombreuses études se sont intéressées au microenvironnement hématopoïétique et ont permis la description de plusieurs niches, la niche endostéale et la niche vasculaire.

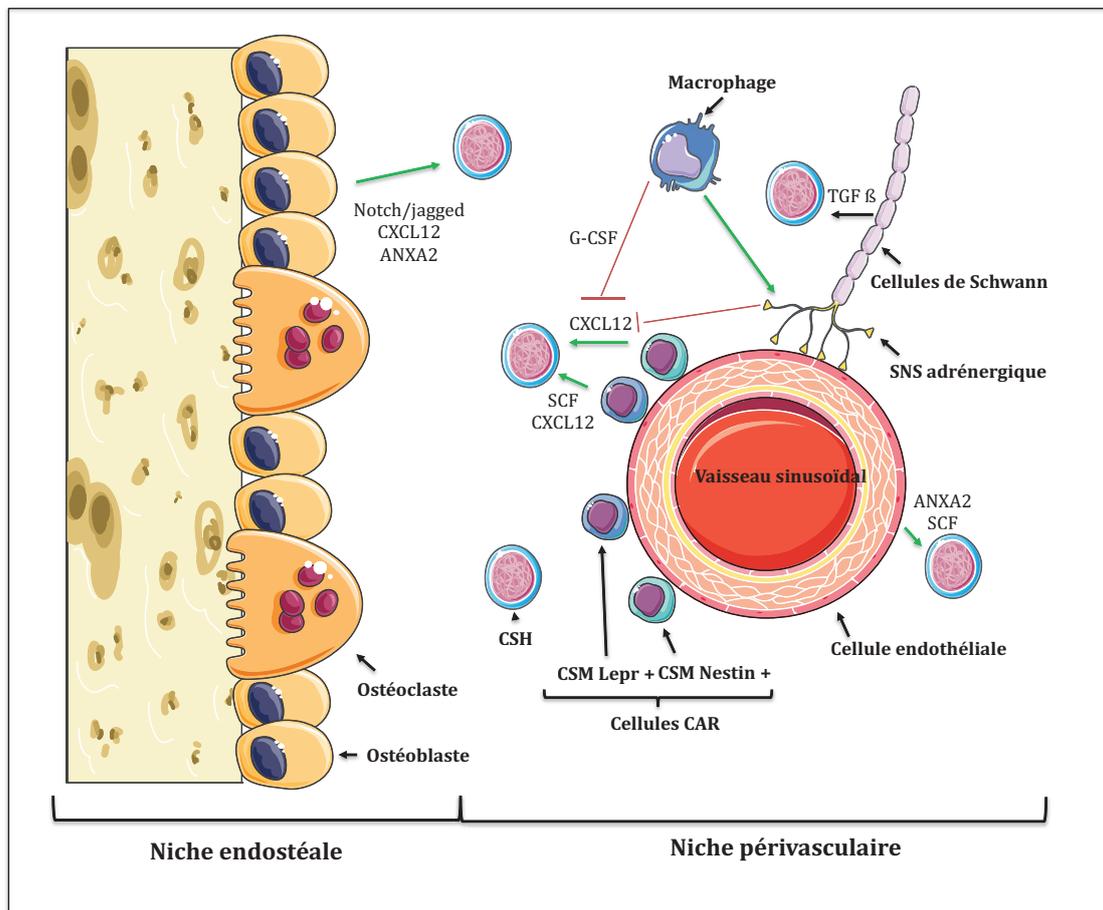


Figure 11 : Niche hématopoïétique. L'homéostasie hématopoïétique est régulée par la niche endostéale via la signalisation NOTCH/Jagged1, l'ANXA2 ou la sécrétion de CXCL12. Dans la niche périvasculaire, les cellules endothéliales et les CSM expriment l'ANXA2 et sécrètent du CXCL12 et du SCF, nécessaires à la quiescence des CSH. Les cellules de Schwann, via la sécrétion de TGF-β participent également à la maintenance des CSH. En parallèle le SNS et les macrophages modulent le taux de CXCL12 pour permettre leur mobilisation.

La niche endostéale

Les ostéoblastes résident principalement au niveau de l'endoste et co-localisent avec les CSH immatures (Lord et al., 1975). Rapidement, l'importance des ostéoblastes dans le maintien des CSH a été démontrée. Par exemple, l'ANXA2 (Annexin A2) est présente à la surface des ostéoblastes. Chez la souris déficiente en ANXA2, la capacité des CSH à adhérer

aux ostéoblastes et à coloniser la niche endostéale est fortement altérée (Jung et al., 2007). De plus *in vivo*, l'activation constitutive du récepteur à la PTH dans les ostéoblastes, augmente le nombre de cellules formatrices de l'os et stimule l'expression de jagged 1. Les CSH présentent à leur surface le récepteur NOTCH qui interagit avec jagged 1 et induit leur prolifération (Calvi et al., 2003). A l'inverse, l'ablation des ostéoblastes de la moelle osseuse de souris engendre la perte de CSH immatures (Bowers et al., 2015). Paradoxalement, l'activation constitutive de la signalisation de la PTH dans les ostéocytes engendre une expansion du nombre et de la fonction des ostéoblastes, sans pour autant affecter le taux de CSH dans un premier temps, avant de le diminuer sur le long terme (Calvi et al., 2012). De ce fait, le rôle des ostéoblastes dans la régulation directe de la niche est aujourd'hui très controversé et le maintien des CSH est probablement soutenu par d'autres populations cellulaires comme par exemple les CSM.

La niche vasculaire

La niche périvasculaire est composée d'une multitude de cellules qui jouent toutes un rôle dans l'homéostasie hématopoïétique. On y retrouve des CSM périvasculaires, associées aux vaisseaux sinusoïdaux, initialement décrites comme des cellules CAR (CXCL12 Abundant Reticular cells), qui sont une source majeure de CXCL12. L'interaction du récepteur CXCR4 présent à la surface des CSH avec son ligand CXCL12, permet leur maintien dans la niche hématopoïétique (Broxmeyer et al., 2007). De même le récepteur ROBO4 (Roundabout 4) est présent à la surface des CSH. *In vivo*, la délétion de ROBO4 entraîne un défaut d'implantation des CSH au sein de la moelle osseuse sans impacter leur différenciation. En revanche, pour contrecarrer la perte de ROBO4, les CSH surexpriment *CXCR4*, ce qui démontre une coopération entre les deux récepteurs pour maintenir la colonisation de la moelle osseuse (Smith-Berdan et al., 2011). De plus, *ROBO4* également exprimé par les cellules endothéliales, stabilise la vasculature ce qui permet le maintien des précurseurs hématopoïétique dans la niche hématopoïétique (Smith-Berdan et al., 2015).

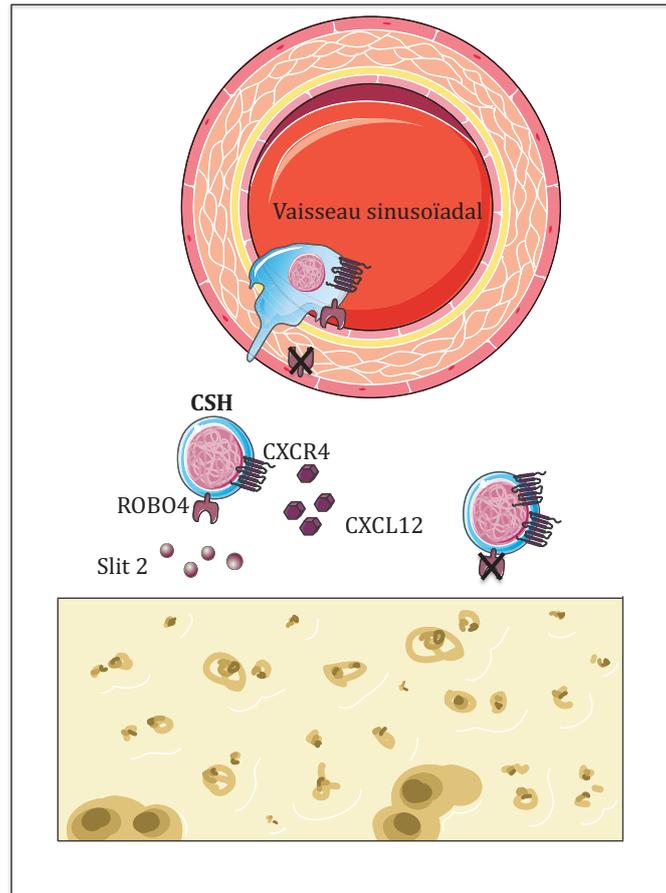


Figure 12 : Rôle du récepteur ROBO4 dans le maintien des CSH dans la moelle osseuse. La présence de ROBO4 à la surface des CSH permet leur ancrage dans la niche. La déplétion de ce récepteur est en partie compensée par la surexpression de *CXCR4* dans la cellule. De plus les cellules endothéliales expriment ROBO4 ce qui permet la stabilisation du vaisseau sanguin. La déplétion de ROBO4 dans ces cellules empêche l'extravasation des CSH et leur colonisation de la moelle osseuse.

Les CSM forment une population cellulaire très hétérogène dans laquelle on retrouve en particulier les CSM Nestin⁺ ou Lepr⁺ (récepteur à la leptine). L'ablation de CSM Nestin⁺ entraîne la perte des CSH et de leur fonction dans la moelle mais augmente le nombre de CSH dans la rate. Ceci suggère que ces cellules régulent la fonction et la maintenance des CSH dans la niche. De plus, les CSM Lepr⁺ sécrètent du SCF (Stem Cell Factor) qui participe également à la maintenance des CSH dans la moelle osseuse. De façon intéressante, la sécrétion de SCF par les CSM nestin⁺ n'est pas requise pour le maintien des CSH (Ding et al., 2012), alors que la sécrétion de SCF par les cellules endothéliales conduit au maintien des précurseurs hématopoïétiques. Les cellules endothéliales participent également au maintien des CSH grâce à la présence de l'ANXA2 à leur surface qui leur permet d'interagir avec elles (Jung et al., 2007).

Enfin les macrophages et le SNS (système nerveux sympathique) régulent la synthèse de CXCL12 par les CSM et permettent donc la mobilisation des CSH dans la circulation. En effet les macrophages sécrètent du G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) qui induit le clivage de CXCL12 ainsi que la stimulation du SNS (Katayama et al., 2006). Le SNS *via* ses fibres adrénergiques, régule la sécrétion de CXCL12 selon un rythme circadien (Méndez-Ferrer et al., 2008). En parallèle les cellules de Schwann non-myélinisantes sécrètent du TGF- β et induisent la quiescence des CSH (Yamazaki et al., 2011).

2- Le détournement de l'environnement osseux par les cellules tumorales

2-1- Établissement de la niche métastatique

La niche métastatique correspond à un environnement propice à la croissance tumorale. Les cellules cancéreuses, depuis la tumeur primaire, vont préparer le « terrain » à distance pour faciliter leur colonisation en créant une niche pré-métastatique. En parallèle les caractéristiques de la niche existante facilitent aussi leur survie dans l'environnement hôte (Figure 13).

a- La niche pré-métastatique

Le concept de niche pré-métastatique désigne la préparation à distance, à la venue des cellules tumorales, de futurs foyers métastatiques grâce à des facteurs sécrétés depuis la tumeur primaire. Dans le cas de l'os, la plupart des études démontrent une convergence vers la sécrétion de facteurs endocrines comme par exemple la PTHrP (PTH related protein). En effet les cellules du cancer de la prostate, par exemple, sécrètent de la PTHrP qui stimule l'expression de CCL2 (C-C motif Chemokine Ligand 2) par les ostéoblastes et les cellules endothéliales. De ce fait, CCL2 va indirectement promouvoir la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et activer la résorption osseuse pour favoriser la colonisation métastatique (Li et al., 2009).

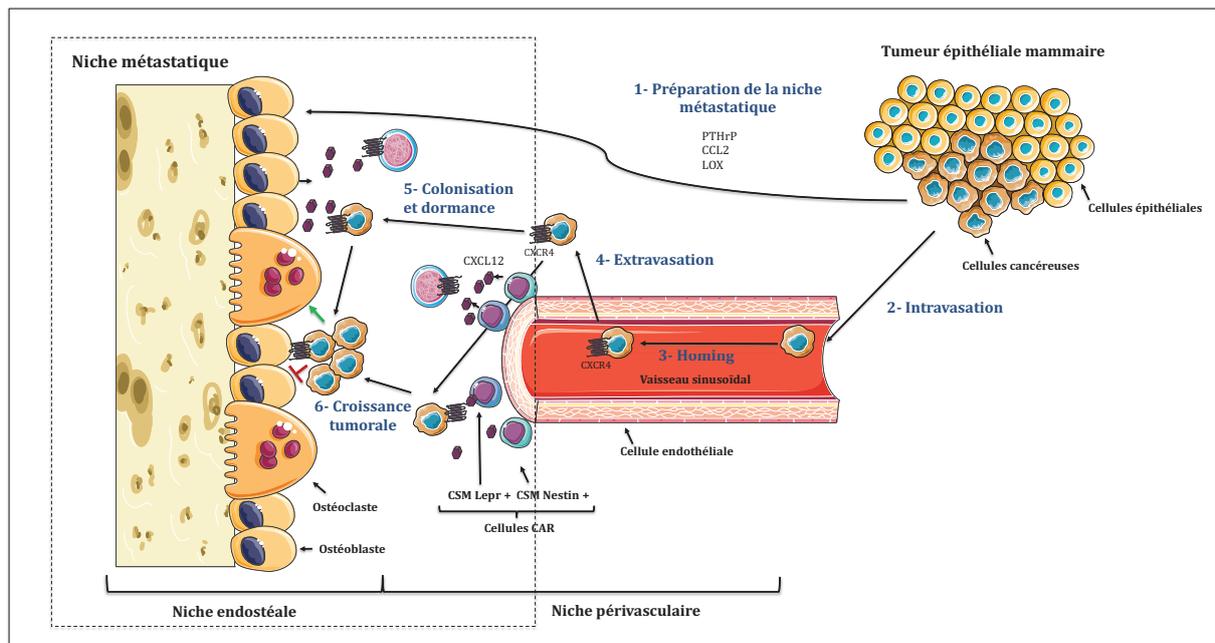


Figure 13 : Les étapes de la colonisation osseuse par les cellules tumorales mammaires. 1- Les cellules sécrètent à distance des facteurs permettant l'établissement d'une niche pré-métastatique. 2 à 4 : Les cellules tumorales sont attirées dans l'environnement osseux par chimiotactisme grâce à l'axe CXCR4/CXCL12. 5 : Elles s'implantent dans l'environnement osseux et restent en dormance un certain temps. 6 : Les cellules métastatiques ont acquis un phénotype « osteoblast-like » ce qui leur permet d'activer les ostéoclastes, d'inhiber les ostéoblastes, et de stimuler la croissance tumorale.

D'autres facteurs stimulent également la colonisation métastatique en amont, comme par exemple la LOX (Lysyl Oxydase). Le Dr. Janine Erler a démontré que suite à l'injection orthotopique de cellules 4T1 (lignée cellulaire triple négative de cancer du sein murin) qui expriment fortement la *LOX*, des lésions osseuses sont observables avant même la formation de métastases. La LOX sécrétée lorsque la tumeur est en condition hypoxique, active l'ostéoclastogénèse. La dégradation osseuse pré-métastatique stimule la colonisation et la formation de métastases par les cellules tumorales (Cox et al., 2015). La LOX induit aussi la réticulation du collagène, dépendante des MMP ce qui promeut l'ancrage des cellules métastatiques dans la niche pré-métastatique (Erler et al., 2009) (Figure 13).

b- La niche préexistante

Les cellules métastatiques détournent les niches physiologiques de l'environnement secondaire, en particulier celles impliquées dans le maintien de cellules souches chez l'adulte, en la faveur de formation tumorale. Ceci fait de l'os et de la niche hématopoïétique

un environnement propice à la croissance métastatique. Récemment une étude a démontré que les cellules cancéreuses mammaires miment les moyens d'attachement des ostéoblastes dans la niche endostéale pour adhérer à la matrice osseuse (Figure 13). En effet la surexpression de *RUNX2* par les cellules MDA-MB-231 et T47D induit la synthèse de l'ITGA5 (intégrine $\alpha 5$) qui permet l'ancrage des cellules métastatiques sur les ostéoblastes mais également sur les protéines matricielles (Li et al., 2016). Cependant une autre étude a montré que les cellules de cancer du sein à leur arrivée dans l'os, vont préférentiellement se loger au niveau de la niche périvasculaire sinusoïdale pour y rester en dormance. Elles s'en éloignent une fois leur capacité proliférative acquise (Price et al., 2016). La niche hématopoïétique constitue donc un soutien à la croissance tumorale.

2-2- Ostéomimétisme et développement de lésions ostéolytiques : le « cercle vicieux des métastases osseuses »

a- L'ostéomimétisme

L'ostéomimétisme est défini par l'habilité de la cellule tumorale qui métastase spécifiquement à l'os, à acquérir un profil génique similaire aux ostéoblastes, plus favorable à sa survie dans l'environnement osseux.

Bellahcène et *al.* ont mis en évidence que des sous-clones ostéotropiques de la lignée MDA-MB-231, les cellules B02, présentent une signature génique osseuse, de 31 gènes exprimés pendant la différenciation ostéoblastique (Bellahcène et al., 2007). Le phénotype « osteoblastic-like » s'acquiert dès le processus de l'EMT. La synthèse de *RUNX2* par les cellules tumorales mammaires est activée par le BMP2 sécrété par les CAF. Comme cité précédemment, *RUNX2* est un gène majeur de la différenciation ostéoblastique qui active la transcription de nombreux gènes osseux, comme par exemple le *Col1A1* et permet donc l'ancrage et la survie des cellules tumorales dans la moelle osseuse (Tan et al., 2016). De plus la sous expression de *RUNX2* prévient l'induction d'un phénotype ostéoblastique dans les lignées de cancer du sein, ce qui inhibe la formation de tumeurs osseuses.

b- Le cercle vicieux des métastases osseuses

En plus de promouvoir la survie dans l'os, l'ostéomimétisme favorise également la formation de métastases par détournement du cycle de remodelage osseux.

Activation des ostéoclastes

L'axe de régulation de l'ostéoclastogenèse, composé de la triade OPG/RANKL/RANK est fortement affecté par les cellules métastatiques et est donc le médiateur principal de la formation de lésions osseuses. L'une des premières évidences de la dérégulation de cet axe a été apportée expérimentalement. Alors que les cellules MDA-MB-231 en culture homotypique n'expriment pas *RANKL*, la co-culture de ces cellules avec des ostéoblastes *in vitro*, induit l'augmentation de sécrétion de RANKL et une diminution de synthèse de l'OPG par les cellules stromales. De plus la mise en culture de moelle osseuse de souris avec du milieu conditionné de MDA-MB-231 induit une augmentation du nombre d'ostéoclaste (Park et al., 2003a). Ceci signifie que les cellules tumorales sécrètent des facteurs modulant les fonctions de l'ostéoblaste. En effet, les cellules tumorales sécrètent de la PTHrP, qui module la production de RANKL et d'OPG par les ostéoblastes en faveur de l'activation ostéoclastique. *In vivo*, cela se traduit par une augmentation des lésions osseuses chez la souris (Thomas et al., 1999). Ces résultats sont confirmés dans un modèle murin de métastases osseuses, où le traitement des souris par un anticorps anti-PTHrP précédant l'injection intracardiaque de cellules MDA-MB-231 entrave la formation de lésions osseuses (Guisse et al., 1996).

Le TGF- β présent dans la matrice osseuse à l'état latent est activé par la résorption osseuse et stimule ainsi la synthèse de PTHrP dans les cellules MDA-MB-231 (Yin et al., 1999).

La formation de métastases osseuses induit une inflammation chronique de l'environnement osseux et donc la libération de cytokines pro-inflammatoires, par les cellules immunitaires, qui sont physiologiquement impliquées dans l'ostéoclastogenèse. Le TNF- α et les interleukines IL-1 β , IL-6, et IL-8 vont promouvoir l'activation des ostéoclastes, soit directement, ou *via* l'augmentation de la production de RANKL par les ostéoblastes (Bendre et al., 2003; Steeve et al., 2004).

Les MMP tumorales, mais aussi celles produites par le microenvironnement osseux, jouent également un rôle essentiel dans l'activation des ostéoclastes. En effet, l'un de leur principal rôle est d'activer les facteurs de croissance physiologiquement présents dans la matrice osseuse. Par exemple, ADAMTS1 (ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 motif), en coopération avec MMP1, permet la solubilisation des ligands de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Recepteur) produits par les ostéoblastes. La signalisation de l'EGFR engendre une diminution de synthèse de l'OPG et par conséquent une activation des ostéoclastes (Lu et al., 2009). De la même façon, *MMP7* exprimée par les ostéoclastes présents à l'interface tumeur/os, induit la solubilisation de RANKL et par conséquent active les ostéoclastes (Lynch et al., 2005). Pour terminer, plusieurs MMP clivent le TGF- β latent et le rendent actif (Dallas et al., 2002).

De plus une grande partie des cellules métastatiques mammaires présentent à leur surface le récepteur CaSR (Calcium-Sensing Receptor). Or, la résorption osseuse en augmentant la concentration calcique du milieu, engendre l'activation de CaSR et la synthèse de PTHrP et donc stimule la prolifération des cellules tumorales. En effet, *in vivo*, la sous expression de *CaSR* diminue l'expression de la *PTHrP* dans la tumeur ainsi que la prolifération des cellules (Kim et al., 2016) (Figure 14).

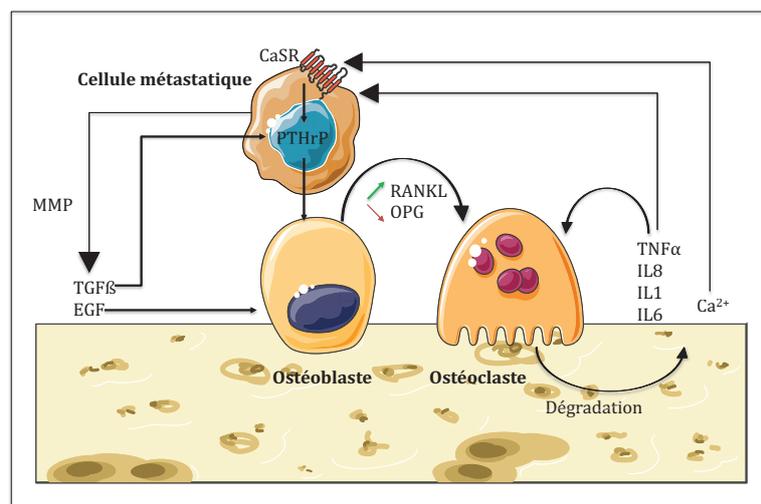


Figure 14: Activation des ostéoclastes médiée par les cellules et l'environnement tumoraux. Les cellules tumorales sécrètent de la PTHrP qui stimule la production de RANKL par les ostéoblastes. Les MMP tumorales activent le TGF- β , la solubilisation de l'EGF et donc stimulent la synthèse de PTHrP ostéoblastique et tumorale. En parallèle, la résorption osseuse induit la libération de calcium et augmente la synthèse de PTHrP tumorale. De plus l'environnement inflammatoire engendre la production de cytokines pro-ostéoclastiques

Inhibition des ostéoblastes

Non seulement les cellules cancéreuses mammaires activent les ostéoclastes et la résorption osseuse, mais elles modulent également l'activité des ostéoblastes par inhibition de leur différenciation.

L'activine A est une cytokine de la superfamille du TGF- β abondamment présente dans l'environnement osseux, notamment lors de la phase de résorption. L'activine A n'a pas d'effet sur l'ostéoclastogénèse mais le traitement d'ostéoblastes par la cytokine inhibe leur différenciation. De plus, son inhibition permet une augmentation de la formation et de la minéralisation osseuse en condition métastatique *in vivo* et *in vitro* (Chantry et al., 2010). Les cellules MDA-MB-231 inhibent également la différenciation ostéoblastique grâce à la sécrétion de SOST induite par l'axe RUNX2/Cbfb β (Mendoza-Villanueva et al., 2011). SOST est inhibiteur de la voie Wnt dont l'activation est nécessaire à l'ostéoblastogénèse. En parallèle, les cellules tumorales mammaires, en particulier une sous population ostéotropiques de la lignée MDA-MB-231, produisent également Dkk1, un autre régulateur négatif de la voie Wnt (Bu et al., 2008) (Figure 15). En plus de réprimer la différenciation des ostéoblastes, ces deux facteurs modulent aussi le rapport RANKL/OPG en faveur de l'activation ostéoclastique.

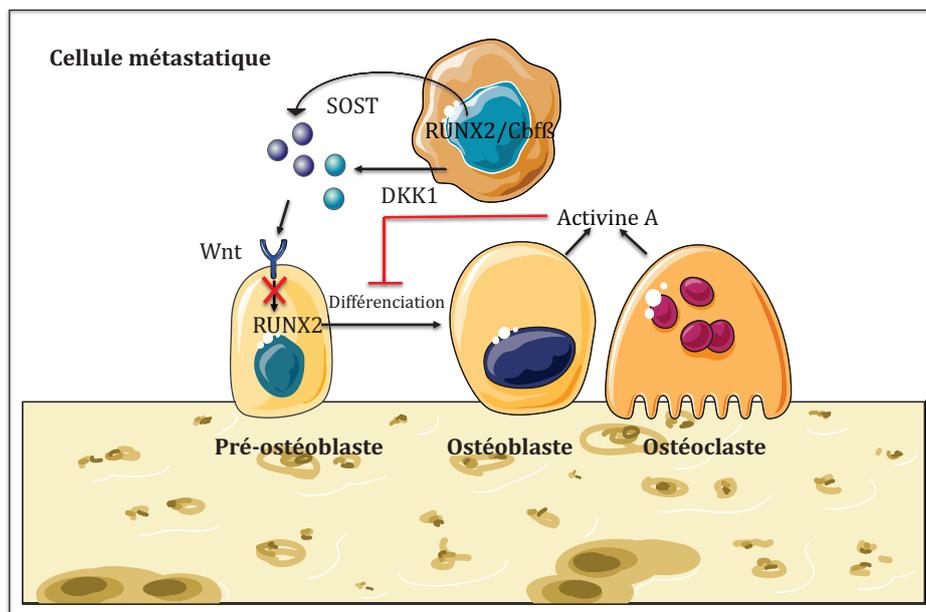


Figure 15 : Inhibition de la différenciation des ostéoblastes médiée par les cellules et l'environnement tumoraux. Les cellules tumorales sécrètent SOST et DKK1 qui vont inhiber la signalisation Wnt du pré-ostéoblaste. L'activine A relarguée par les ostéoblastes et les ostéoclastes interfère également avec la différenciation de l'ostéoblaste.

Le cercle vicieux des métastases osseuses ostéolytiques

La conséquence de l'activation accrue de l'ostéoclastogenèse et l'inhibition de l'ostéoblastogenèse est un cycle de remodelage osseux complètement dérégulé. Il en résulte un important déséquilibre entre formation et résorption osseuse donnant lieu à une dégradation massive de l'os et d'importantes plages de lyse. De ce fait ce type de métastases est dit ostéolytique. Lorsque la formation osseuse est plus importante que la résorption, comme pour la majorité des cancers de la prostate, les métastases résultantes sont ostéocondensantes ou ostéoblastiques (Figure 16).

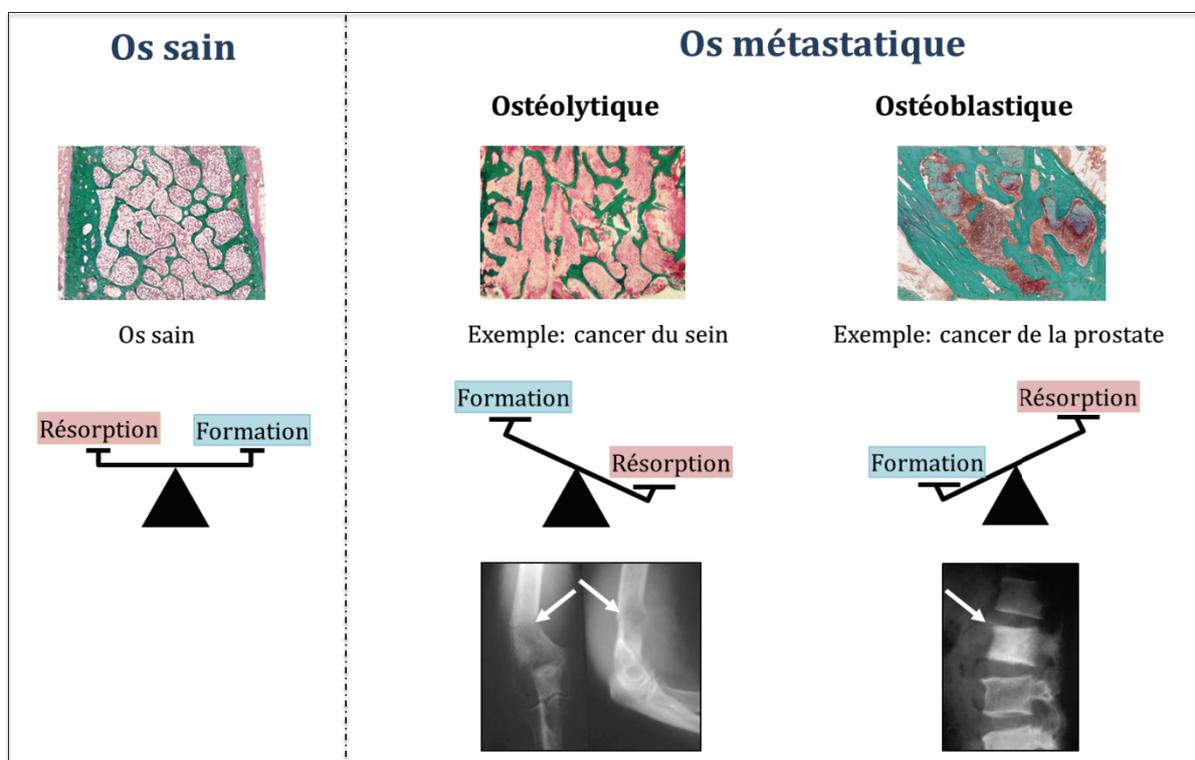


Figure 16 : Visualisation de métastases ostéolytiques et ostéocondensantes en histologie et en radiographie. Une coloration au trichrome de Goldner permet de visualiser la matrice minéralisée en vert, les cellules de la moelle en rouge et celles de la tumeur en rose. Sur les radiographies, les flèches blanches désignent les plages d'ostéolyse ou les zones d'ostéoformation.

La destruction osseuse permet la libération de nombreux facteurs emprisonnés dans la matrice osseuse qui stimulent la croissance tumorale et la formation de métastases. Il y a donc un véritable entretien mutuel entre formation tumorale et résorption osseuse, appelé « cercle vicieux » (Figure 17).

2-3- Traitements des métastases osseuses ostéolytiques

La qualité de vie des patientes présentant des métastases osseuses est fortement affectée. Elles sont la cause de dérèglements métaboliques, notamment une hypercalcémie chez 19% des patientes sans traitement, ainsi que de complications liées à l'atteinte squelettique (fractures, compression médullaire et fortes douleurs) (Coleman et al., 1998). Les traitements actuellement sur le marché permettent de traiter ces symptômes sans pour autant induire l'élimination totale de la métastase.

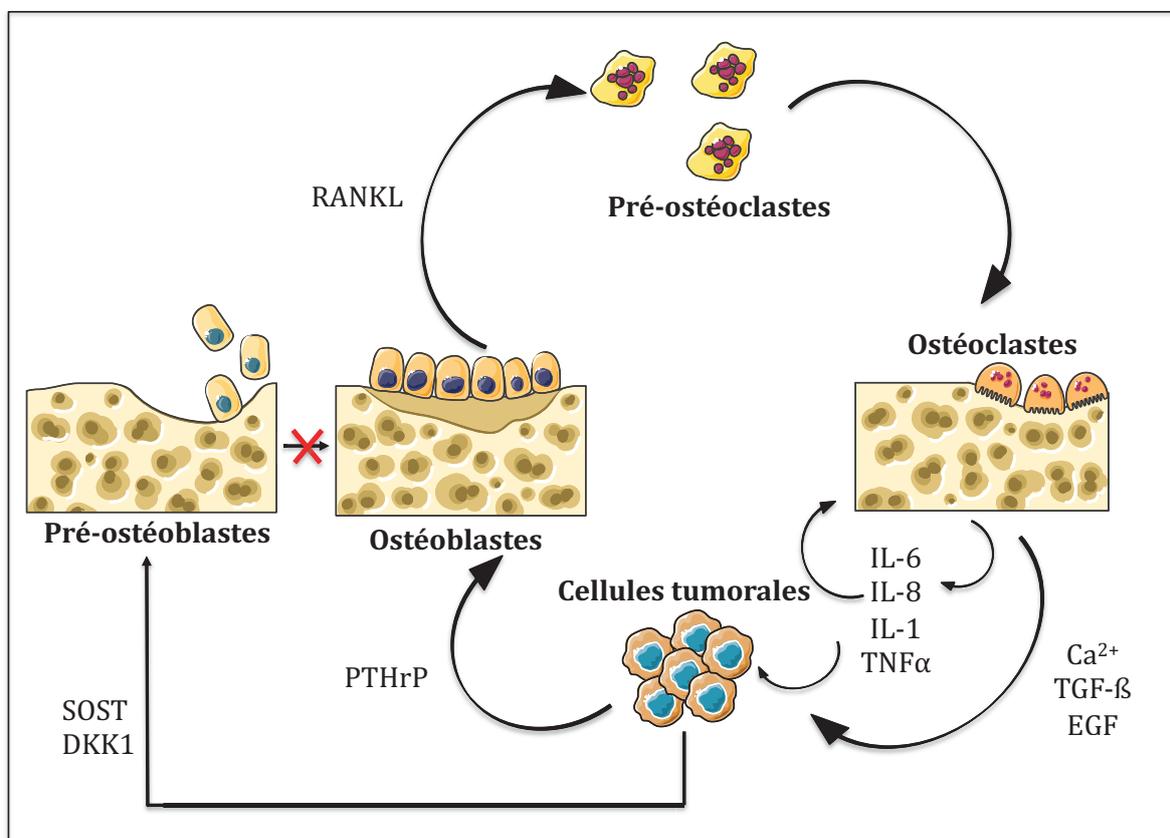


Figure 17: Cercle vicieux des métastases osseuses ostéolytiques. Les cellules tumorales sécrètent des facteurs de stimulation des ostéoclastes et des inhibiteurs des ostéoblastes alors que la résorption osseuse libère de la matrice des facteurs de croissance favorables aux cellules tumorales.

Ces thérapies ciblent l'activation accrue des ostéoclastes de façon à retarder la dégradation osseuse. Cependant, la formation de métastases osseuses résulte également de l'inhibition des ostéoblastes et est régulée par un ensemble de facteurs propres à l'environnement osseux.

La prise en compte de ces différentes composantes a permis l'émergence de nouvelles pistes thérapeutiques.

a- Les thérapies actuelles

Les bisphosphonates

Les bisphosphonates de nouvelle génération, comme par exemple le Zolédronate, sont des analogues du pyrophosphate. De ce fait, ils présentent une affinité particulière pour la matrice osseuse en cours de remodelage, où ils se lient aux cristaux d'hydroxyapatite. Les bisphosphonates médient l'apoptose des ostéoclastes *via* l'inhibition de la farnésyl pyrophosphate synthase, une enzyme clé de la voie du mélanovate. Ceci entraîne la modification post-traductionnelle de protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine de l'ostéoclaste qui ne peut plus adhérer à la membrane et entre en apoptose (van Beek et al., 1999) (Figure 18). Une revue récente sur 34 essais cliniques randomisés de cancers du sein montre que l'utilisation du bisphosphonate réduit le risque de SRE (Skeletal Related Event) comparé à l'absence de traitement ou une thérapie sans bisphosphonate. Cependant la survie des patientes n'est pas améliorée (O'Carrigan et al., 2017). Plus récemment un essai clinique de phase III avec des patientes de la cohorte AZURE atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce, n'a pas montré l'efficacité du Zolédronate en tant que thérapie adjuvante. Cependant cette étude a mis en évidence une diminution de l'incidence de métastases osseuses (Coleman et al., 2014). Un nouvel essai clinique de phase III (NCT00127205) est actuellement en cours pour déterminer l'efficacité du Zolédronate comparé à d'autres bisphosphonates, en thérapie néoadjuvante de cancers du sein traités chirurgicalement, sur la rechute osseuse.

Dénosumab

Le Dénosumab, un anticorps monoclonal humanisé (AMG162/Xgeva) dirigé contre RANKL, inhibe la résorption osseuse (Bekker et al., 2004) (Figure 18). Une étude clinique comparative de l'effet du Zolédronate *versus* Dénosumab a montré que l'anticorps anti-RANKL permet une réduction plus importante du SRE, sans amélioration de la survie comparé au bisphosphonate. Un essai clinique de phase III est actuellement en cours, et

s'intéresse à l'efficacité d'un traitement préventif de Dénosumab sur la rechute osseuse, chez des patientes atteintes d'un cancer du sein en rémission et sans métastase détectée (NCT01077154).

Malgré tous les bénéfices apportés par ces traitements, ils engendrent de nombreux effets secondaires, principalement une ostéonécrose de la mâchoire et de l'hypocalcémie (Stopeck et al., 2010).

a- Les thérapies émergentes

Inhibiteur de la cathepsine K

L'Odanacatib est un inhibiteur spécifique de la cathepsine K (Figure 18). *In vitro*, il permet l'inhibition de l'ostéolyse en interférant avec le trafic vésiculaire sans impacter l'ostéoclastogenèse (Leung et al., 2011). Malgré une étude clinique de phase II prometteuse, l'enrôlement des patientes pour la phase III a été stoppé pour cause de risques cardiovasculaires majeurs (Jensen et al., 2010; Mullard, 2016).

Inhibiteur de Src

Le Dasatinib est un inhibiteur de plusieurs tyrosine kinases, incluant Src (Figure 18). Ce traitement, déjà mis sur le marché en tant que thérapie de leucémies lymphoblastiques aiguës ou myéloïdes chroniques, n'a pas montré d'effet bénéfique lors d'un essai clinique de phase II sur l'ostéolyse et la survie des patientes (Schott et al., 2016). Cependant les résultats d'un essai de phase I/II récent montre que son utilisation couplée au Zolédronate conduit à une réponse osseuse bénéfique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein hormono-sensible (Mitri et al., 2016).

L'ensemble de ces données montre que les traitements actuels permettent uniquement l'amélioration de la qualité de vie des patientes. Les essais cliniques menés récemment dans le traitement des métastases osseuses n'ont pas permis l'émergence de nouvelles thérapies curatives. Cependant les lésions osseuses sont la conséquence de multiples dérégulations du microenvironnement tumoral, créant plusieurs ouvertures

thérapeutiques. Par exemple, l'administration d'un anticorps monoclonal dirigé contre Dkk1 a été testée en essai clinique de phase II en combinaison avec du Zolédronate en thérapie de myélomes multiples récidivant (NCT00741377) (Fulciniti et al., 2009). Cibler cet inhibiteur de la voie Wnt pourrait être intéressant afin de restaurer l'activité ostéoblastique et la formation osseuse dans le cas de métastases ostéolytiques.

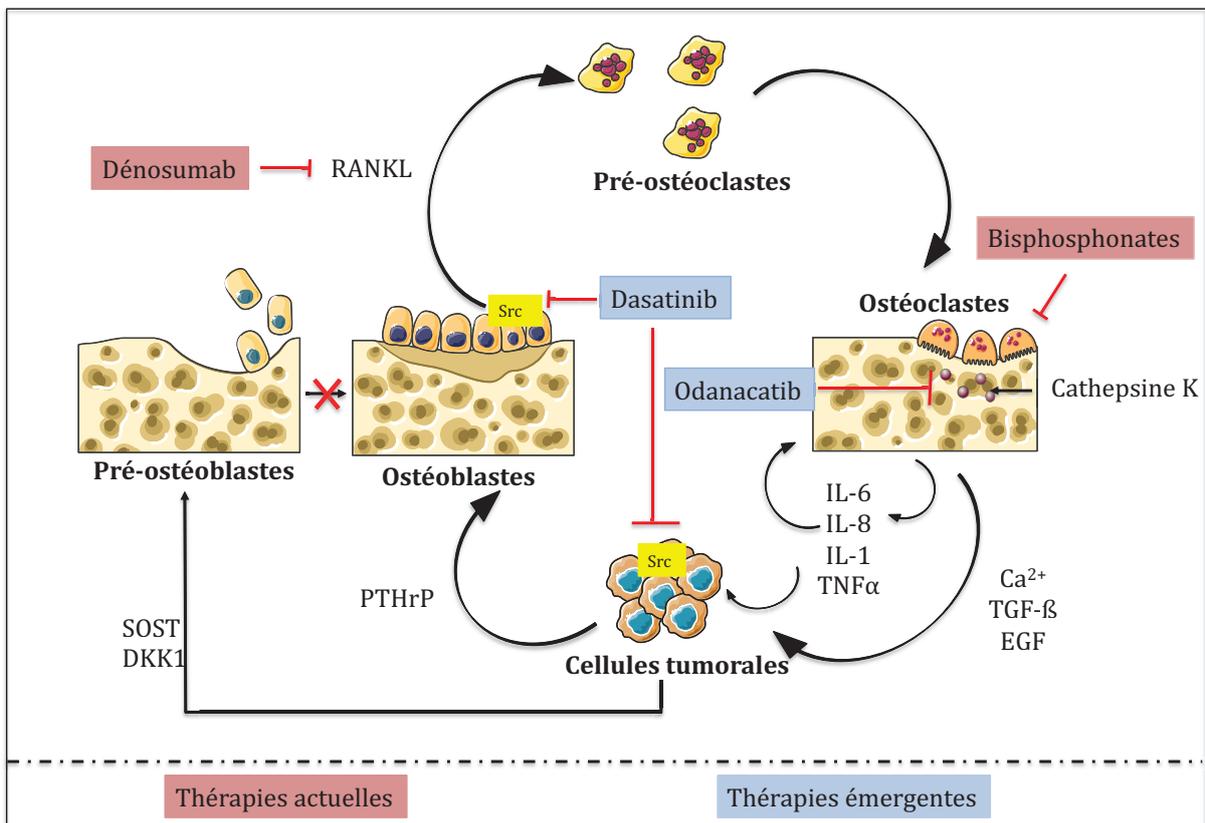


Figure 18 : Thérapies actuelles et émergentes ciblant la résorption osseuse.

III- Le récepteur Roundabout 4

Au cours du développement du système nerveux central, les neurones vont émettre des prolongements appelés axones qui migrent de façon à établir de multiples connexions pour aboutir à un réseau neuronal complexe. La croissance axonale est un processus hautement stéréotypé et ordonné, orchestré par des molécules sécrétées dans l'environnement neural. Par le biais de récepteurs présents sur les axones, ces molécules vont soit attirer, soit repulser ces neurones (on parlera de chimioattraction ou chimiorépulsion respectivement). Ce mécanisme de guidage axonal a été particulièrement bien étudié dans la traversée de la ligne médiane du cerveau par les axones commissuraux. C'est dans ce cadre que les récepteurs ROBO ont été décrit pour la première fois en 1993 chez la drosophile. Par marquage d'immunohistochimie, il a été démontré que les axones d'interneurones de drosophiles ne traversent pas la ligne médiane. En revanche la mutation du récepteur entraîne une traversée anarchique en forme de rond, ce pourquoi il a été nommé Roundabout (Figure 19) (Seeger et al., 1993).

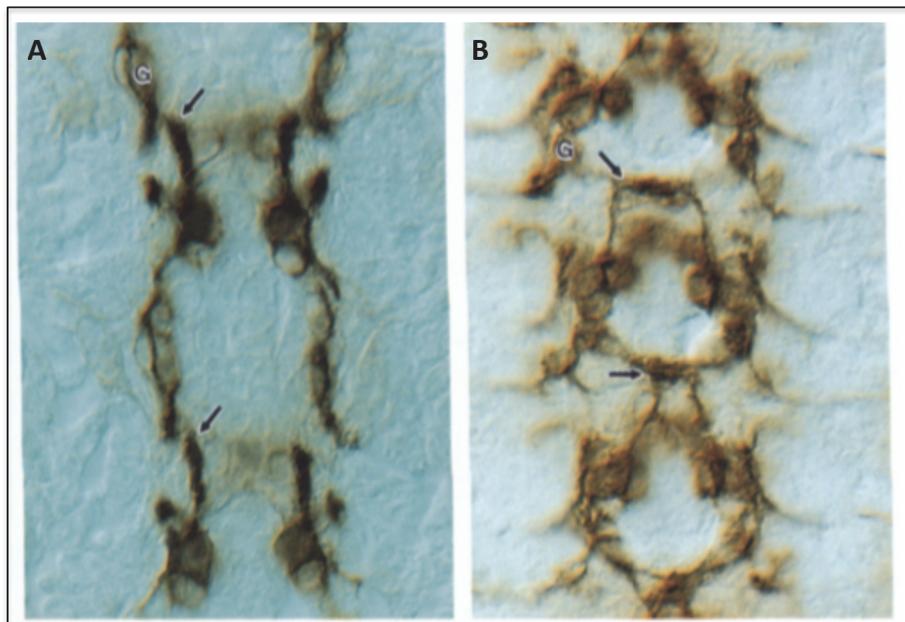


Figure 19 : Marquages d'immunohistochimies d'interneurone d'embryons de drosophiles en fonction de l'expression de ROBO. (A) Chez la drosophile de type sauvage, les axones ne traversent pas la ligne médiane. (B) Croissance anormale « en ronde » des axones chez la drosophile dont le récepteur ROBO a été muté. Modifié d'après Mark Seeger et *al.*, Neuron, 1993.

Depuis, les avancées scientifiques ont permis de décrire d'autres fonctions de la voie des récepteurs ROBO et de leurs ligands SLIT principalement dans l'angiogenèse et en oncologie.

1- La famille de récepteurs ROBO

La famille de récepteurs Roundabout est hautement conservée dans l'évolution. Sax-3 est l'orthologue de ROBO chez *C.elegans* (Zallen et al., 1998) et trois membres de la famille ont été décrits chez les vertébrés (ROBO 1 à 3) (Chédotal, 2007). Un quatrième membre a récemment été identifié chez les mammifères et nommé initialement « Magic Roundabout » puis plus simplement, ROBO4 (Huminiecki et al., 2002).

1-1- Structure

Les récepteurs ROBO appartiennent à la superfamille des molécules d'adhésion à domaines immunoglobulines. Chez l'homme, au niveau génomique, les gènes *ROBO1* et *2* sont localisés sur le chromosome 3 tandis que *ROBO3* et *4* le sont sur le chromosome 11. L'archétype d'un récepteur ROBO contient 5 domaines extracellulaires immunoglobulines (Ig 1 à 5), suivis de 3 domaines fibronectine de type III (FNIII), une région transmembranaire et enfin 4 domaines cytoplasmiques conservés riche en proline (CC0 à CC3). Chez les mammifères, ROBO3 et ROBO4, diffèrent avec l'absence de CC1 pour ROBO3. ROBO4 est caractérisé par la présence des domaines IgG 1 et 2, 2 domaines FNIII ainsi que de CC0 et CC2 (Figure 20) (Ysilanti and Chédotal, 2014).

La séquence nucléotidique du transcrit *ROBO4* décrite dans les banques de données NCBI code pour une protéine de masse moléculaire prédite de 107 KDa (NM_019055). Cependant les récents travaux de thèse de François Le Pape, dans notre laboratoire, ont mis en évidence que la protéine produite est une isoforme glycosylée d'une masse moléculaire de 160 KDa. De plus, les cellules métastatiques de cancer du sein présentent un variant spécifique de ROBO4 de masse moléculaire plus faible dans lequel la séquence

codée par l'exon 1 et une partie de l'exon 2 est absente. Ce variant ne possède donc pas de peptide signal. De ce fait, seul le domaine Ig2 est présent dans la partie extracellulaire de cette isoforme (Figure 20). La caractérisation du transcrit générant cette forme particulière de ROBO4 est l'objet du travail de doctorat de Loïc Gaweda.

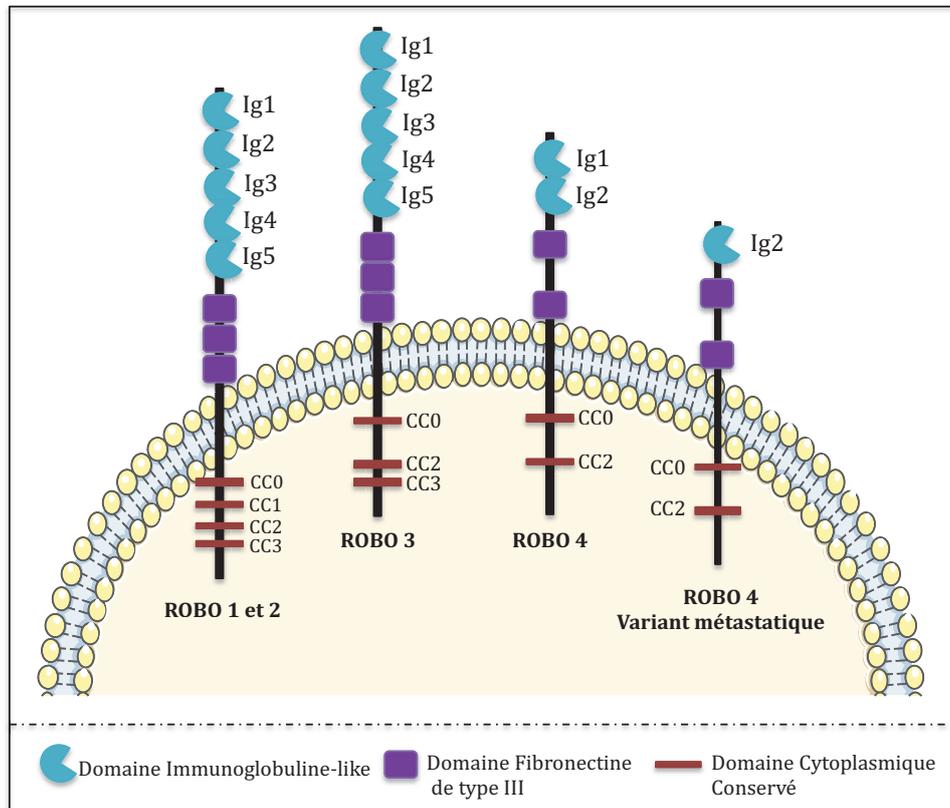


Figure 20 : Structure des récepteurs ROBO. Les récepteurs ROBO1 et 2 sont composés de 4 domaines cytoplasmiques conservés, de 3 domaines fibronectines de type III en enfin de 5 domaines immunoglobulines. ROBO3 et ROBO4 sont différents : ROBO3 ne possède que 3 domaines cytoplasmiques conservés et ROBO4 2 domaines immunoglobulines, 2 domaines fibronectines de types III et 2 domaines cytoplasmiques conservés. Le variant métastatique de ROBO4 identifié ne contient qu'un seul domaine immunoglobuline.

1-2- Interaction ROBO/SLIT

Les récepteurs ROBO sont connus pour médier la répulsion des axones grâce à leurs interactions avec les ligands SLIT. La famille de glycoprotéines sécrétées SLIT est composée de 3 membres (SLIT 1 à 3) présents chez tous les vertébrés, mammifères compris. Leur structure a été conservée pendant l'évolution avec plus de 40% d'homologie de séquences entre la drosophile et les mammifères pour chacun des membres. De plus les protéines SLIT d'une même espèce possèdent 60 à 66% d'homologie

entre elles. Chez l'homme, elles sont composées d'un peptide signal dans la partie N-terminale, suivis de 4 domaines de répétitions riches en leucine (LRR 1 à 4), 9 domaines EGF-like, 1 domaine laminine G et enfin une région riche en cystéine côté C-terminal (Figure 21) (Brose et al., 1999).

La stabilisation du complexe ROBO/SLIT nécessite l'intervention d'autres protéines. En effet, des études de chromatographie ont montré la formation d'une triade SLIT/ROBO avec des molécules d'héparane sulfate (Figure 21). Un traitement par l'héparinase qui provoque la dégradation de l'héparane sulfate, abolit l'activité de répulsion exercée par SLIT *in vitro* (Hussain et al., 2006). Ces résultats démontrent l'importance de l'héparane sulfate dans la signalisation ROBO/SLIT.

Une étude de cristallographie a permis la caractérisation de la liaison directe SLIT/ROBO faisant intervenir le second domaine LRR de SLIT et le premier domaine Ig de ROBO (Figure 21) (Morlot et al., 2007).

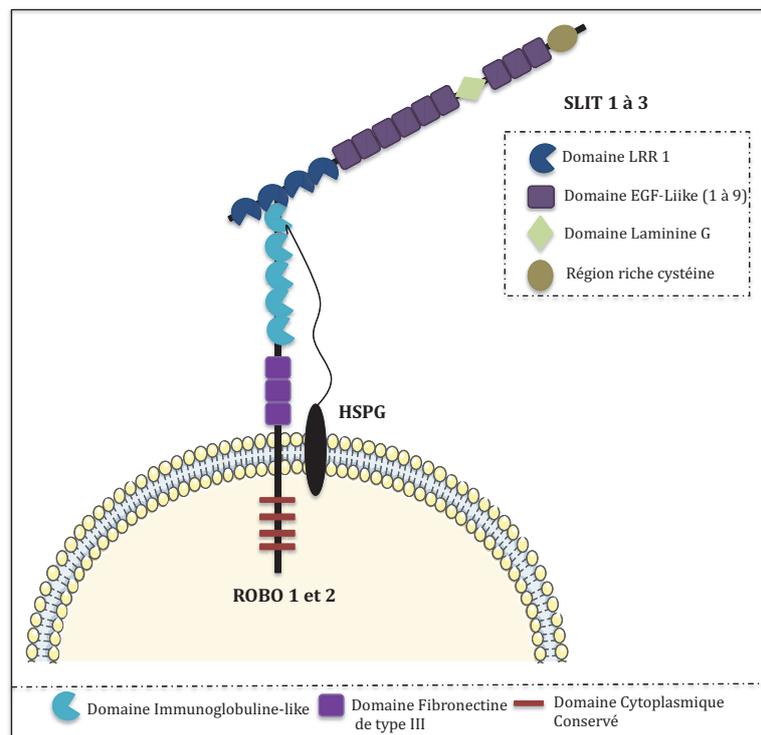


Figure 21 : Interaction des récepteurs ROBO 1 et 2 avec leurs ligands SLIT 1 à 3. La liaison est produite par l'interaction du domaine Ig1 des récepteurs ROBO avec le domaine LRR 2 des ligands SLIT. De plus, elle est stabilisée par une molécule d'héparane sulfate HSPG.

Ces données remettent en cause l'affinité de ROBO3 et ROBO4 pour les ligands SLIT. Bien que ROBO3A et B présentent 70 à 77% d'homologie de séquence sur le domaine Ig1 avec ROBO1 et 2, ils sont caractérisés par une perte des résidus spécifiques impliqués dans la liaison avec SLIT (Zelina et al., 2014). Concernant le récepteur ROBO4, son interaction avec les ligands SLIT reste encore vivement controversée. A ce jour, une seule étude a montré une interaction entre ROBO4 et SLIT2 par immunoprécipitation après transfection de formes étiquetées dans des cellules HEK (Human Embryonic Kidney cells) (Park et al., 2003b). Cependant cette expérience n'a jamais été reproduite en immunoprécipitation et des expériences de BiaCore semblent indiquer que ROBO4 et SLIT n'interagissent pas directement (Suchting et al., 2005). De plus les domaines Ig1 de ROBO4 et de ROBO1, nécessaires à l'interaction avec SLIT, n'ont que 42% d'homologie entre eux et les acides aminés essentiels à cette interaction ne sont pas présents (Yadav and Narayan, 2014). Une autre étude indique également que ROBO4 est incapable de lier l'héparane sulfate (Fukuhara et al., 2008). En revanche de nombreux travaux, notamment ceux menées sur des cellules endothéliales dans lesquelles ROBO4 est présent en grande quantité, démontrent que l'activité inhibitrice de SLIT2 sur l'angiogenèse est médiée par ce récepteur. Ceci suggère l'intervention d'un co-récepteur. Par exemple, dans les cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), ROBO1 et ROBO4 ont été co-immunoprécipités. La sous expression de *ROBO4* ou *ROBO1* dans ces cellules par stratégie de siARN (Small interfering RNA) abolit dans les deux cas la formation de filopodes par les cellules HUVEC (Sheldon et al., 2009). Une autre étude montre également l'interaction ROBO1/ROBO4 mais de surcroît, SLIT2 est également co-immunoprécipité avec ce complexe (Chen et al., 2016). Ces données convergent vers une coopération des deux récepteurs dans la régulation de la voie de signalisation SLIT/ROBO. Concernant le nouveau variant de ROBO4 que nous avons détecté dans les cellules métastatiques, il n'interagirait pas directement avec SLIT2 du fait qu'il ne possède pas le domaine Ig1.

1-3- L'axe SLIT2/ROBO 1 à 3 en cancérologie

Dans la majorité des cancers, l'axe SLIT/ROBO exerce un rôle de suppresseur de tumeur. De ce fait, dans de nombreuses tumeurs, ROBO1 à 3, ainsi que leurs ligands SLIT 1 à 3 sont réprimés. Cette sous expression est majoritairement attribuée à une hyperméthylation des promoteurs de ces gènes (Dallol et al., 2003; Narayan et al., 2006).

L'altération de l'expression de SLIT2, ROBO1 et 2 peut également résulter de délétions chromosomiques. En clinique, l'analyse d'une cohorte de 150 patientes atteintes d'un cancer du sein a montré que 80% d'entre elles ont une altération génique ou épigénétique de SLIT2 ou ROBO1/2 ce qui souligne leur importance dans le développement tumoral (Bhattacharya et al., 2016). Les résultats d'une autre étude clinique obtenus sur des patients atteints d'un cancer tête et cou, corroborent cette conclusion avec 89 et 58% des tumeurs qui présentent une altération de SLIT2 et ROBO1, respectivement. L'analyse de Kaplan-Meier indique une diminution de la survie moyenne lorsque ces gènes sont dysfonctionnels (Maiti et al., 2015). La signalisation ROBO/SLIT est donc importante dans plusieurs axes de la progression tumorale. A l'heure actuelle, la littérature décrit essentiellement l'implication de l'interaction ROBO1/SLIT2.

a- Survie des cellules tumorales

L'importance de cet axe dans la survie des cellules cancéreuses a largement été démontrée, parfois avec une dualité de rôles. Dans les cancers gastriques SLIT2 permet l'apoptose des cellules tumorales. L'absence de la protéine, induite par stratégie de shARN (Short Hairpin RNA), dans des cellules de cancer gastrique SGC-7901 et MKN45 qui expriment fortement SLIT2, engendre une diminution de l'apoptose des cellules médiée par l'activation d'AKT *via* sa phosphorylation. La voie AKT stimule alors l'activation de Bad et la synthèse de Bcl-2 et de Bcl-XL qui sont des protéines anti-apoptiques. A l'inverse, une diminution des protéines apoptotiques est observable lorsque SLIT2 est inhibé. En parallèle AKT phosphoryle et inactive GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3 β), ce qui entraîne l'activation de la β -caténine et la transcription accrue de C-myc ainsi que celle du gène codant la cycline D1. L'inhibition d'AKT abolit les effets de la sous régulation de SLIT2 ce qui démontre son importance dans l'activation d'AKT. Cela se traduit *in vivo* par une augmentation du volume tumoral ainsi que du nombre de métastases du péritoine (Shi et al., 2014).

Par ailleurs *ROBO1* et *SLIT2* sont fortement exprimés dans les cellules tumorales d'ostéosarcome et l'expression de *ROBO1* est corrélée à une diminution du taux de survie des patients en clinique. Contrairement à ce qui a été montré ci-dessus, ici l'axe SLIT2/ROBO1 induit la prolifération et inhibe l'apoptose des cellules tumorales par la phosphorylation et l'activation de Src et de la voie ERK/C-myc (Zhao et al., 2018).

b- Implication dans la transition épithélio-mésenchymateuse

Dans les cellules de cancer gastrique, l'expression de *SLIT2*, *ROBO1* mais aussi de *USP33* (Ubiquitin Specific Peptidase33) est réprimée. Or, une étude très récente montre que la surexpression de *USP33* stabilise la protéine ROBO1. Dans ce cas, la surexpression de *SLIT2* provoque une diminution de la migration des cellules tumorales gastriques et de l'expression de marqueurs de l'EMT causée par l'inhibition de la voie du TGF- β . *In vivo*, l'expression de *SLIT2* induit une diminution du nombre de micro-colonies pulmonaires mais cet effet est inhibé par la sous expression d'*USP33*. En clinique, une forte présence d'*USP33* est corrélée à une augmentation de la survie des patients (Xia et al., 2019).

En revanche, certains travaux mettent avant un rôle pro-tumoral des récepteurs ROBO, notamment de l'axe ROBO1/*SLIT2*. Ces deux protéines sont surexprimées dans les cancers intestinaux et l'activation de la voie *SLIT2/ROBO1 in vivo* conduit à la transformation maligne des cellules muqueuses de l'intestin et à la progression tumorale. En effet le signal *SLIT2/ROBO1* stimule la voie Wnt/ β -caténine et l'EMT *via* la régulation négative de la E-cadhérine médiée par Src (Zhang et al., 2015). De même, une étude menée *in vitro* sur des cellules de tumeur de la langue montre que l'inhibition du signal ROBO1, par l'utilisation d'un anticorps bloquant, diminue la migration et l'invasion des cellules tumorales et de surcroît, prévient l'activité des MMP2 et 9, ainsi qu'une augmentation de la E-cadhérine (Zhao et al., 2016b).

c- Régulation de la migration cellulaire et du chimiotactisme

Les cellules cancéreuses mammaires expriment fortement *CXCR4*. La sécrétion du ligand CXCL12 par l'organe hôte induit le chimiotactisme et l'invasion des cellules. Il a été démontré que la voie *SLIT2/ROBO1* peut contrecarrer ce phénomène en inhibant les protéines FAK (Focal Adhesion Kinase), les MAPK (Mitogen-activated protein kinases) ainsi que les MMP2 et 9 (Prasad et al., 2004).

Par ailleurs, les cellules de carcinome oral squameux (OSCC) expriment faiblement *SLIT2* mais expriment la *P-Cadhérine*. L'équipe du Dr Bauer a montré que la surexpression de la *P-cadherine* dans des cellules OSCC, PCI52 (qui sont déficientes en cadhérine) induit la sécrétion de *SLIT2* et entraîne une baisse de l'activité migratoire des cellules médiée par *SLIT*. La P-cadhérine interagit avec ROBO3 et lorsque les cellules sont stimulées par *SLIT2*,

cette interaction est augmentée. Lorsque ROBO3 est inhibé, la migration cellulaire est décuplée. En résumé l'axe SLIT2/ROBO3 permet de neutraliser l'effet pro-migratoire des OSCC exprimant la P-cadhérine (Bauer et al., 2011).

d- Angiogenèse tumorale

Les cellules endothéliales expriment fortement *ROBO1* qui exerce un effet pro-angiogénique. L'utilisation d'un anticorps bloquant anti-ROBO1 inhibe la migration des cellules endothéliales HUVEC en réponse à la sécrétion de SLIT2 médiée par les cellules humaines de mélanome 375 (Wang et al., 2003).

2- Cas du récepteur ROBO4

Contrairement aux autres membres de sa famille, l'expression de *ROBO4* dans les neurones du système nerveux central humain n'a jamais été mise en évidence. À ce jour, seulement deux études décrivent son rôle dans le processus de guidage axonal chez la souris et le zebrafish (Bedell et al., 2005; Zheng et al., 2012). ROBO4 est un récepteur spécifique des cellules endothéliales mais il est également présent à la surface des cellules souches hématopoïétiques.

2-1- Mécanisme de régulation de l'expression de ROBO4

a- Régulation transcriptionnelle

La région promotrice de 3Kb du gène codant pour *ROBO4*, a été clonée et relativement bien caractérisée, essentiellement par Okada et al (Okada et al., 2007).

La région proximale de -300 jusqu'au +1 de transcription contient un motif ETS (E26 Transformation-Specific), et deux domaines à motifs SP1 (Specific Protein 1) (Figure 22). Des expériences de co-immunoprécipitation de la chromatine révèlent l'interaction des facteurs de transcription SP1 et GABP (GA-Binding Protein) avec le promoteur proximal de *ROBO4*. De plus, l'utilisation de siARN dirigés contre SP1 et GABP induit une forte diminution de l'expression de *ROBO4* dans les cellules endothéliales ce qui témoigne de l'importance de ces protéines dans la régulation transcriptionnelle (Okada et al., 2007).

La région distale comprend deux motifs cis-régulateurs avec un motif palindromique de 12 pb (paire de bases) essentiels à l'activation. La région située entre -2550 et -2515 contient des sites de fixation pour les facteurs NFκB et NF-AT, pour les glucocorticoïdes et enfin pour la AP2γ (protéine activatrice 2γ) (Okada et al., 2007). Le TNF-α active la voie NFκB en facilitant l'interaction de l'hétérodimère NFκB p65-p50 sur les motifs NFκB ce qui augmente la transcription de *ROBO4* (Tanaka et al., 2017). La région la plus distale contient un motif AP-1 (Activator Protein 1) qui permet l'interaction avec c-jun et FRA-1 (Fos Related Antigen 1) en -2875 (Figure 22). L'utilisation de siARN dirigé contre ces facteurs réduit le taux d'ARNm (Acide ribonucléique messager) de *ROBO4* ce qui démontre leur rôle dans l'activation transcriptionnelle (Okada et al., 2015).

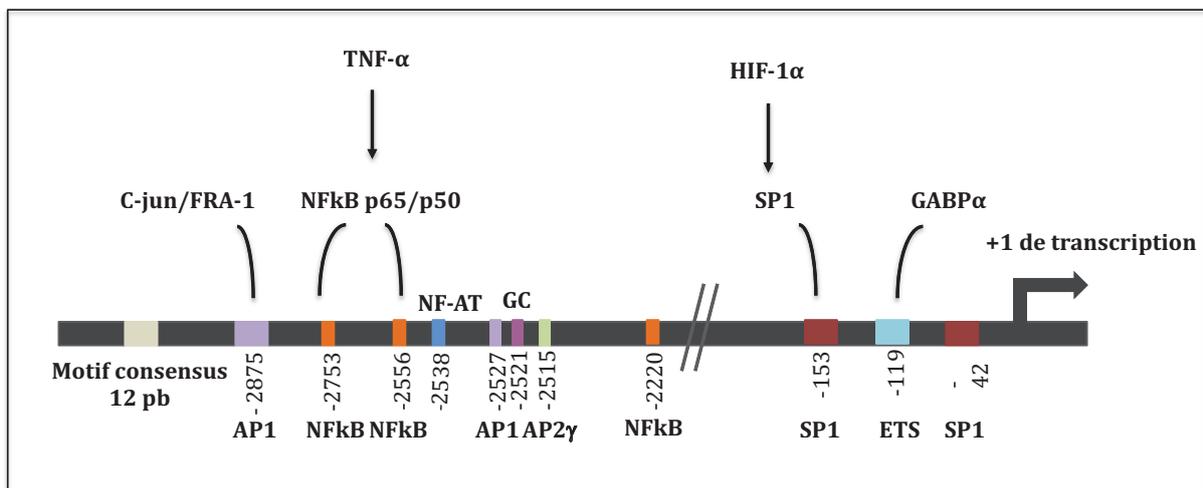


Figure 22 : Séquence promotrice du gène *ROBO4*

Très récemment ce groupe a également montré que la déméthylation du promoteur proximal est nécessaire à la transcription. L'interaction de ETV2 (ETS Translocation Variant 2) avec les motifs ETS permet le recrutement et la formation d'un complexe avec TET1 ou 2 (Ten-Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase 1 ou 2) qui sont deux déméthylases (Figure 23) (Tanaka et al., 2018).

Chez le zébrafish, des motifs SOX sont présents en -1176 et -1170, mais aucune étude n'a caractérisé leur présence dans le promoteur humain (Samant et al., 2011).

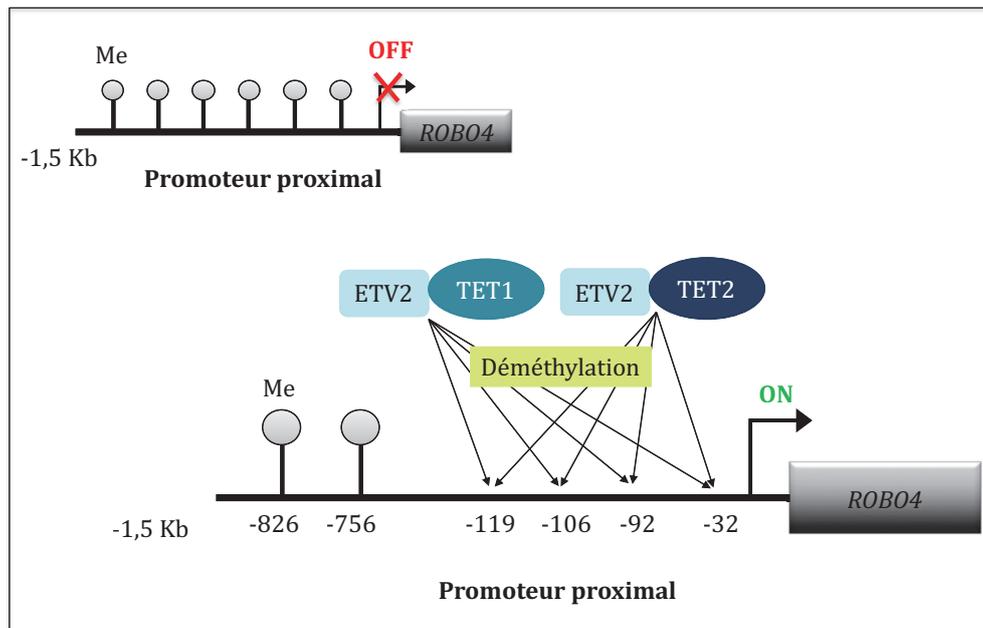


Figure 23 : Régulation de la méthylation du promoteur proximal de ROBO4. Les complexes ETV2/TET1 ou ETV2/TET2 permettent la déméthylation du promoteur et la transcription de ROBO4. Modifié d'après C.Dai et *al.*, Bioscience Report, 2019.

En condition hypoxique, la sécrétion de HIF-1 α stimule la transcription de *ROBO4* dans les cellules endothéliales (Tian et al., 2015). Très récemment, Qiaoyun Gong et *al.*, ont montré que chez les rats atteints d'une rétinopathie diabétique, l'hypoxie, l'hypocalcémie et l'hyperglycémie induisent une surexpression de *HIF-1 α* , de *SP1* et de *ROBO4*. L'utilisation d'un siARN dirigé contre HIF-1 α provoque une chute drastique de l'expression de *SP1* et de *ROBO4*. L'inhibition de *SP1* quant à elle, induit la répression de *ROBO4* mais pas de HIF-1 α . Ceci démontre que qu'HIF-1 α stimule l'expression de *SP1* qui, en se fixant sur le promoteur de *ROBO4*, active sa transcription (Figure 22) (Gong et al., 2019a).

b- Régulation par des micro-ARN (miR)

Par l'étude *in silico* dans les bases de données TargetScan et mirna.org, ce groupe a identifié deux miR, miR-125b-5p et miR-146a-5p, capables de cibler les régions 3'UTR (untranslated region) de *SP1* ou *ROBO4* et de *HIF-1 α* ou *ROBO4* respectivement (Figure 24). L'utilisation d'un miR « mimic » du miR-125b-5p réprime l'expression de *SP1* et *ROBO4* dans les cellules épithéliales de la rétine humaine, ARPE19. De plus, la région 3'UTR de *SP1* ou *ROBO4* a été clonée dans un vecteur luciférase puis transfectée dans des

cellules HEK293 en présence du miR « mimic » ou d'un miR contrôle. Le miR-125b-5p « mimic » diminue le signal luciférase ce qui démontre son implication dans la régulation négative SP1 et ROBO4. Les mêmes expériences réalisées avec le miR-146a-5p « mimic », ont mis en évidence son rôle dans la régulation négative de l'expression de *HIF-1α* mais aussi de *ROBO4* (Gong et al., 2019a).

De nouveaux travaux ont également identifié le miR-15a qui cible le 3'UTR de l'ARNm *ROBO4* (Figure 24). En effet, sa surexpression dans des cellules épithéliales rétinienne de rat provoque la répression de *ROBO4* (Gong et al., 2019b).

Ces études démontrent pour la première fois le rôle de miR dans la régulation directe mais aussi indirecte de *ROBO4*.

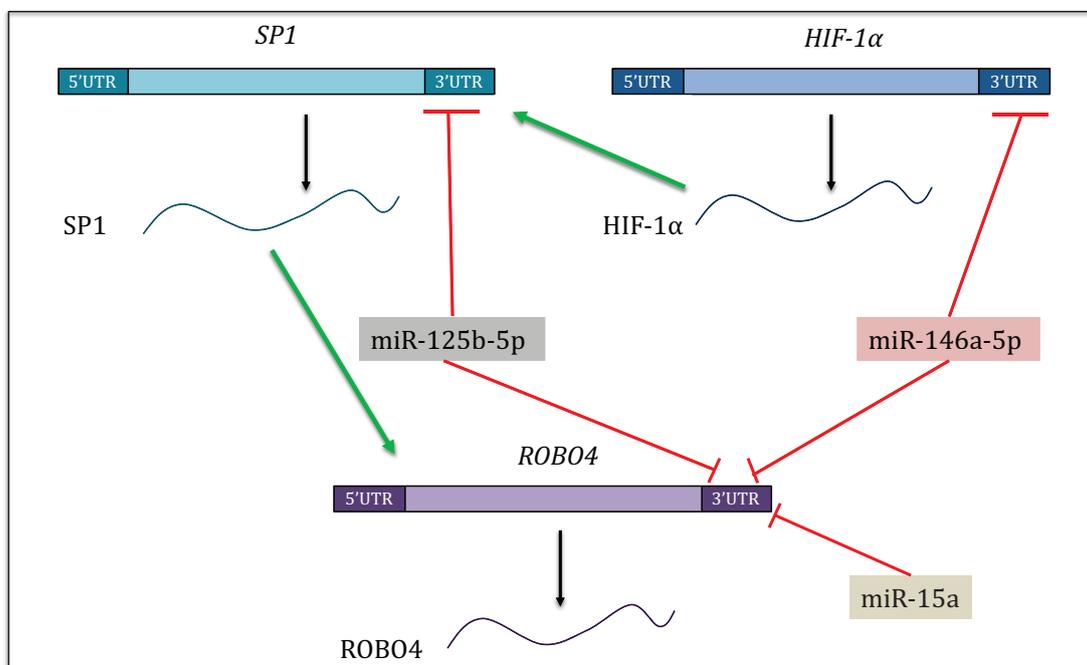


Figure 24 : Régulation de la transcription et de la traduction de *ROBO4* par les micro-ARN. Les miR-125b-5p et 146a-5p inhibent la transcription de *ROBO4* via la régulation négative de la transcription de *SP1* et *HIF-1α*, mais ils agissent aussi directement sur l'ARNm de *ROBO4* pour interférer avec sa traduction. De même miR-15a inhibe la synthèse de *ROBO4*.

c- Épissage alternatif

Les études menées sur la caractérisation du promoteur ont mis en évidence deux sites distincts d'initiation de la transcription (Okada et al., 2007). En revanche aucune étude ne mentionne si ce site permet la génération de transcrits alternatifs ou de variants d'épissages. Même si deux variants de *ROBO4* sont décrits sur NCBI (NM_019055.1 et

NM_001301088.1), le variant 2 n'a fait l'objet d'aucun travail publié à ce jour. Cependant les travaux menés dans notre laboratoire ont conduit à la détection d'une isoforme de plus faible masse moléculaire, ce qui démontre l'existence de variants d'épissages ou de transcrits alternatifs de ROBO4.

d- La N-Glycosylation

La N-glycosylation est une modification co-translationnelle courante de protéines sécrétées et membranaires. Elle est initiée dans le réticulum endoplasmique et s'achève dans l'appareil de Golgi. Elle consiste en l'ajout d'un glycané lié de façon covalente à l'azote du groupement aminé d'une asparagine. L'équipe du Dr. Bicknell a montré que la protéine ROBO4 contient quatre sites de N-glycosylation extracellulaires au sein de sa séquence (Huminiacki et al., 2002). De plus l'analyse glycoprotéomique du sécrétome de cellules endothéliales humaines a mis en évidence la présence membranaire de ROBO4 sous une forme glycosylée (Yin et al., 2013). En revanche, lorsque les cellules métastatiques de cancer du sein, qui présentent l'isoforme d'environ 90 KDa, sont traitées par la tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation, la masse moléculaire de ROBO4 détectée en western blot est inchangée, ce qui indique que cette isoforme n'est pas glycosylée.

e- Clivage

Bien qu'aucune étude sur le clivage de ROBO4 n'ait été réalisée à ce jour, une récente publication décrit une forme soluble d'environ 60 KDa immunoprécipitée dans du sérum humain et dans le surnageant collecté suite à la culture de HUAEC (Human Umbilical Artery Endothelial Cells). De plus, la transduction de la forme entière de ROBO4 dans les cellules endothéliales aortiques porcines conduit également à la sécrétion d'une forme de 60 KDa. Aucune donnée ne permet actuellement d'expliquer sa production mais de façon intéressante, la forme soluble est de taille similaire au domaine extracellulaire de ROBO4 (Zhang et al., 2016).

f- Dimérisation

Plusieurs études se sont intéressées à la dimérisation du récepteur ROBO4. Suite à la transfection et à la purification de la forme soluble de ROBO4 de 60 KDa dans des cellules HEK293, des expériences de gel filtration et d'électrophorèse en condition non dénaturante (blue-native page) permettent la détection d'une simple bande de plus de 200 KDa. Ces données suggèrent que le domaine extracellulaire de ROBO4 serait capable de s'homodimériser et de former des multimères en l'absence de ligand (Yoshikawa et al., 2008).

Par ailleurs, des données suggèrent que ROBO4 pourrait s'homodimériser *via* son domaine cytoplasmique et ceci de façon indépendante de SLIT2 (Bedell et al., 2005).

Comme évoqué précédemment ROBO4 serait capable de s'hétérodimériser avec ROBO1 (cf paragraphe 1-2-Interaction ROBO/SLIT). Cependant cette interaction est controversée car des expériences de BiaCore n'ont pas permis de mettre en évidence la liaison de ces deux récepteurs (Suchting et al., 2005).

2-2- ROBO4, un récepteur spécifique des cellules endothéliales

Le récepteur ROBO4 est abondamment présent dans les cellules endothéliales. Cependant dans la littérature son rôle est vivement controversé. Alors que de nombreuses publications lui confèrent un rôle dans le maintien de l'intégrité vasculaire *via* des fonctions anti-angiogéniques, quelques études indiquent une activité pro-angiogénique. Cette dualité de rôles semble dépendre de la diversité des acteurs pouvant interagir avec ROBO4 et de ce fait, du contexte cellulaire.

a- ROBO4 favorise la migration des cellules endothéliales

Dans un contexte embryonnaire, ROBO4 semble essentiel à l'angiogenèse. Son inhibition tout comme sa surexpression *in vivo* chez un embryon de zébrafish génère un défaut de bourgeonnement vasculaire. Néanmoins, la réexpression du gène humain de *ROBO4*, suite à son inhibition, permet la ré-acquisition d'une vasculature fonctionnelle chez l'embryon, semblant indiquer la nécessité de ROBO4, de façon dose dépendante dans l'angiogenèse à ce stade de développement (Bedell et al., 2005). Une étude réalisée dans un contexte

embryonnaire avec des cellules souches endothéliales, les angioblastes, montre que l'inhibition de ROBO4 engendre une trajectoire aléatoire des vaisseaux sanguins en cours de formation suggérant un rôle du récepteur dans le contrôle de la migration de ces cellules (Kaur et al., 2006). L'inhibition de ROBO4 *in vitro* dans les angioblastes et *in vivo* dans les cellules endothéliales du zébrafish embryonnaire ne permet plus l'activation de CDC42 et Rac1 respectivement impliqués dans la formation de filopodes et lamellipodes essentiels à la migration cellulaire (Figure 25). En effet l'interaction de CDC42 avec le domaine intracellulaire CC0 de ROBO4 est requise pour son activation. Concernant Rac1, la présence des domaines intra et extracellulaires de ROBO4 sont nécessaires à son activation, indiquant que celle-ci est dépendante du ligand de ROBO4 (Kaur et al., 2006). Durant l'embryogenèse, SLIT3 peut également interagir avec ROBO4 dans les angioblastes et médier l'activation de protéines du remodelage du cytosquelette d'actine telles que Rac1 et CDC42. Même si SLIT3 est immunoprécipité avec ROBO1 et ROBO4, seul l'utilisation d'un siARN dirigé contre ROBO4 (et pas un siARN contre ROBO1) inhibe la formation de vaisseaux sanguins démontrant que la signalisation engendrée par SLIT3 passe par le récepteur ROBO4 (Zhang et al., 2009).

En accord avec les données précédemment citées, une étude montre que la sous et la sur expression de ROBO4 dans les cellules HUVEC, sont toutes deux responsables de l'inhibition de l'angiogenèse. En revanche dans ces cellules, la formation d'un complexe ROBO4/ROBO1 et la stimulation de ROBO1 par SLIT 2 permet le recrutement et l'interaction des protéines WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) et MENA (Mammalian-enabled protein) avec le domaine intracellulaire de ROBO4, *in vitro* (Figure 25). WASP et MENA sont des protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine et la formation de filopodes permettant la migration des cellules endothéliales et la mise en place d'un réseau vasculaire (Sheldon et al., 2009).

Enfin, dans un contexte différent, des travaux avec des tissus d'ingénierie proposent un autre rôle activateur de l'angiogenèse *in vivo* de la voie SLIT3/ROBO4. En effet, l'expression de SLIT3 par des CSM périvasculaires permettrait l'acheminement correct des cellules endothéliales exprimant ROBO4 et la formation d'un réseau vasculaire normal (Paul et al., 2013). Des siARN dirigés contre SLIT3 dans les CSM ou contre ROBO4 dans les cellules endothéliales entravent la formation d'un réseau sanguin fonctionnel ce qui démontre la coopération des différents composants cellulaires et l'importance de l'axe ROBO4/SLIT3 dans la mise en place de l'angiogenèse (Paul et al., 2013).

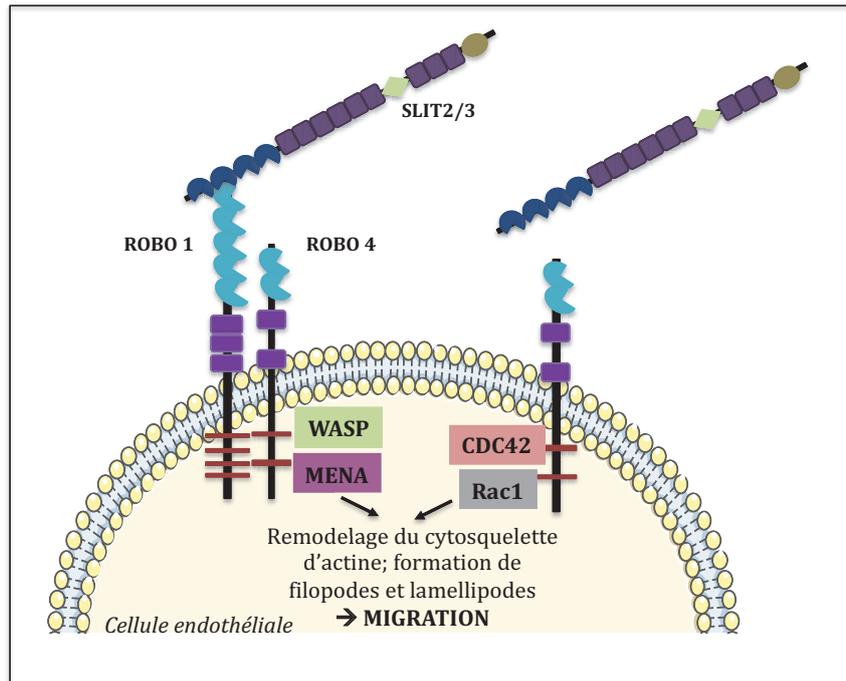


Figure 25: Rôle de ROBO4 dans la migration des cellules endothéliales et la néoangiogenèse. La formation du trimère ROBO1/ROBO4/SLIT2 ou 3 permet le recrutement et l'interaction des protéines WASP et MENA avec le domaine intracellulaire de ROBO4. Lorsque ROBO4 est stimulé par SLIT, les protéines CDC42 et Rac1 sont également capables d'interagir avec le domaine intracellulaire de ROBO4 ce qui induit leur activation. L'activité de ces deux voies induit un remodelage du cytosquelette d'actine ainsi que la formation de filopodes et lamellipodes permettant aux cellules endothéliales d'acquies un phénotype migratoire.

En résumé, l'activité pro-angiogénique de ROBO4 dans les cellules endothéliales induit un remodelage du cytosquelette d'actine qui engendre la formation de filopodes et lamellipodes, et par conséquent facilite l'acquisition du phénotype migratoire des cellules.

b- ROBO4 permet le maintien de l'intégrité vasculaire

Contrairement aux données décrites ci-dessus, le rôle vasculaire de ROBO4 majoritairement décrit est la stabilisation des vaisseaux sanguins.

Les cellules endothéliales tapissant la paroi des vaisseaux sont séparées en deux catégories les « stalk cells » et les « tip cells ». Les « stalk cells » représentent les cellules matures, qui ne migrent pas tandis que les « tip cells » sont les cellules bourgeonnantes formant des filopodes et capables de migrer sous l'influence de facteurs extracellulaires tel que le VEGF-165. Les « tip cells » peuvent être comparées aux cônes de croissance et

pourtant, de façon surprenante, elles n'expriment pas *ROBO4* pour la plupart. En revanche, *ROBO4* est abondamment présent dans les « stalk cells ». *In vitro*, le pré-traitement des cellules endothéliales par *SLIT2* inhibe la migration induite par le VEGF-165, cependant, chez les cellules *ROBO4*^{-/-}, *SLIT2* n'a plus cet effet. L'activation de l'axe *SLIT2/ROBO4* induit l'inhibition de la phosphorylation et l'activation de SFK (Src-Family-Kinase) et de Rac1 qui sont impliqués dans le remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire à l'acquisition d'un phénotype migratoire. Les mêmes expériences réalisées avec *SLIT3* montrent un rôle homologue du ligand dépendant de *ROBO4* (Jones et al., 2008). La liaison du VEGF à son récepteur VEGFR2 permet la signalisation ARNO qui active la voie ARF6 (ADP-ribosylation factor 6)/Rac1. A l'inverse, lorsque *ROBO4* est stimulé par *SLIT2*, la paxilline est co-localisée et interagit avec le domaine intracellulaire du récepteur. GIT1 (Arf GTPase activating protein), interagit avec ce complexe *via* sa liaison à la paxilline ce qui a pour conséquence l'inactivation d'ARF6 qui ne peut alors plus activer Rac1 (Figure 26) (Jones et al., 2009). De récents travaux menés sur des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique ont montré le rôle prédominant de l'ANXA2 dans le maintien des jonctions cellulaires adhérentes et serrées, notamment *via* son interaction avec la VE-Cadhérine et l'actine. Néanmoins, l'ANXA2 interagit également avec *ROBO4* et serait nécessaire à son interaction avec la paxilline et donc au blocage de la voie ARF6/Rac1 (Figure 26) (Li et al., 2018). Le rôle de *ROBO4* dans le maintien de la perméabilité vasculaire de la barrière hémato-encéphalique passe également par sa fonction protectrice des jonctions serrées. En effet l'inhibition de Src médiée par l'axe *ROBO4/SLIT2* empêche l'activation de la voie ERK et la synthèse de MMP9 (Figure 26). Or, ces 3 protéines sont impliquées dans la dégradation des protéines occludine, ZO-1 et claudine-5, composantes des jonctions serrées (Cai et al., 2015a). La diminution de la présence de l'occludine et de ZO-1 suite à la l'inhibition de *ROBO4*, accompagnée d'un important remodelage du cytosquelette d'actine, a été observée dans un modèle cellulaire humain de cellules endothéliales de la rétine. L'augmentation des fibres de stress résultante est expliquée par la régulation négative de la cofiline *via* sa phosphorylation par LIMK1 (LIM domain Kinase 1), abondamment présente en absence de *ROBO4* (Figure 26) (Cheng et al., 2013). Le TNF- α est une molécule inflammatoire connue pour augmenter l'hyperperméabilité vasculaire mais aussi pour favoriser l'expression de *ROBO4*. L'interaction de *ROBO4* avec TRAF7 (TNF Receptor Associated

Factor 7) permet la stabilisation de la VE-Cadhérine et des jonctions cellulaires et contrecarre l'action du TNF- α (Figure 26) (Shirakura et al., 2019).

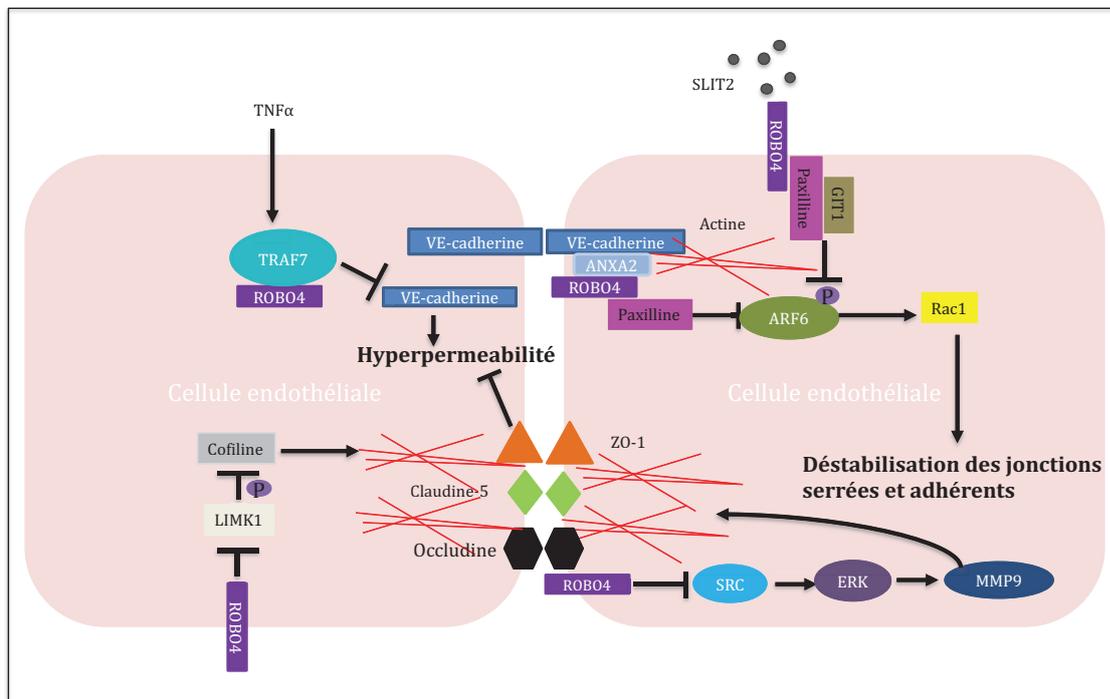


Figure 26 : Rôle de ROBO4 dans le maintien de l'intégrité vasculaire. Par son interaction avec la Paxilline, ROBO4 inhibe ARF6 et Rac1, impliqués dans le remodelage du cytosquelette d'actine de la dégradation des jonctions cellulaires. ROBO4 inhibe également Src et la voie ERK/MAPK responsable de la déstabilisation des jonctions serrées. En parallèle, la liaison de ROBO4 avec TRAF7 interfère avec la translocation et la dégradation de la VE-Cadhérine ce qui maintient les jonctions adhérentes. Enfin en inhibant la phosphorylation de la Cofiline par LIMK1, ROBO4 prévient la modification du cytosquelette d'actine. En résumé ROBO4 inhibe le remodelage du cytosquelette et la migration des cellules endothéliales ainsi que l'hyperperméabilité vasculaire.

L'activité inhibitrice de ROBO4 dans l'angiogenèse peut également nécessiter l'interaction avec des co-récepteurs. Précédemment, la triade moléculaire ROBO4/ROBO1/SLIT2 a été décrite comme une interaction moléculaire activatrice de l'angiogenèse dans les cellules HUVEC (α -ROBO4 favorise la migration des cellules endothéliales). Or une étude contradictoire a démontré *in vitro*, que SLIT2 médie un effet pro-migratoire des cellules HUVEC, lorsque ROBO1 est présent et que ROBO4 est délété. La présence de ROBO4 inhibe l'axe ROBO1/SLIT2 et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Cette étude en faveur d'un rôle de stabilisation de la vasculature du récepteur ROBO4, conforte cependant sa possible interaction avec ROBO1 (Figure 27) (Enomoto et al., 2016). De plus, grâce à son domaine extracellulaire ROBO4 est capable de lier en *cis* ou en *trans* et d'activer le récepteur UNC5b (Unc-5 Netrin Receptor B). UNC5b va alors contrecarrer la signalisation

induite par VEGFR2 par l'inhibition l'activation de Src et donc de l'angiogenèse (Figure 27). L'utilisation d'anticorps dirigés contre ROBO4 ou UNC5B stimule le processus de néoangiogenèse de la cornée ainsi que l'hyperperméabilité vasculaire, *in vivo*. De plus l'injection de ROBO4 intradermique chez des souris ROBO4^{-/-} et chez des souris WT traitées par un anticorps anti-UNC5b restaure la perméabilité vasculaire uniquement chez les animaux ayant une délétion génétique de *ROBO4*, ce qui démontre la coopération entre les 2 récepteurs (Koch et al., 2011).

En plus de son rôle dans l'angiogenèse, ROBO4 est également impliqué dans la régulation de la lymphangiogenèse. Lorsque les cellules endothéliales lymphatiques sont cultivées *in vitro* en présence de SLIT2, l'activation du VEGFR3 par VEGF-C est inhibée *via* l'internalisation du récepteur et les cellules deviennent incapables de proliférer, migrer et former des tubules. L'utilisation d'un siARN dirigé contre ROBO4 restaure l'activité de VEGF-C ce qui démontre l'importance de ROBO4 dans le rôle anti-lymphoangiogénique de SLIT2 (Yu et al., 2014).

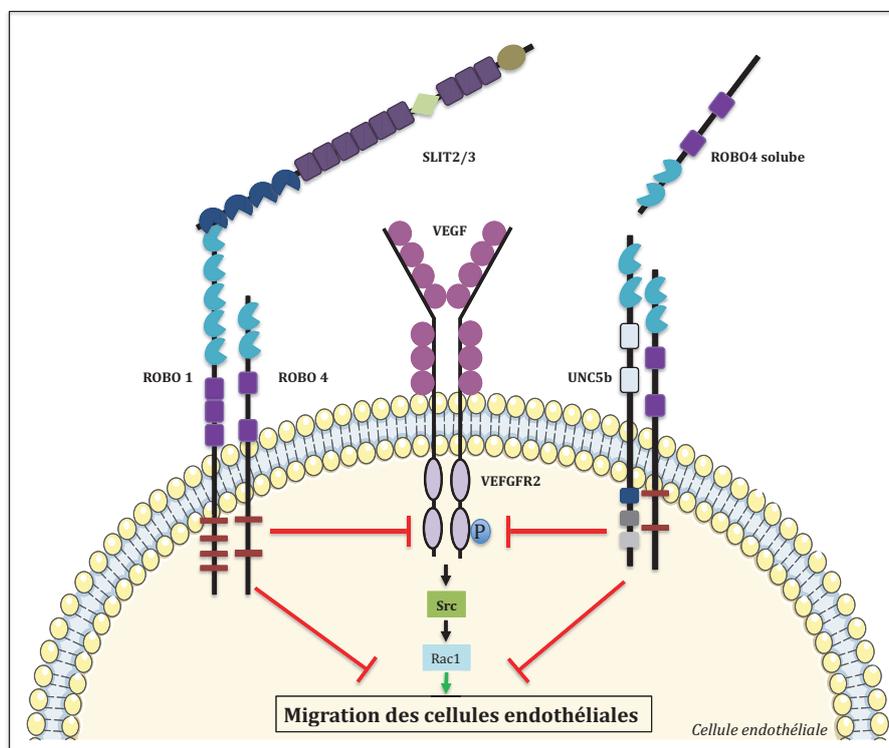


Figure 27 : Régulation de l'angiogenèse induite par la voie VEGF/VEGFR2 par ROBO4. La triade moléculaire ROBO4/ROBO1/SLIT2 inhibe l'activation des voies en aval de VEGFR2. UNC5b peut également lier ROBO4 en trans ou en cis et inhiber la phosphorylation et l'activation de VEGFR2.

En conclusion, ROBO4 contrecarre la voie du VEGF. Par sa liaison avec divers interacteurs, ROBO4 inhibe l'activation des voies impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine, la formation de lamellipodes et filopodes, mais aussi les voies nécessaires à la dégradation des jonctions cellulaires. Par l'inhibition de la migration et par son rôle protecteur des jonctions cellulaires, ROBO4 est essentiel à l'intégrité vasculaire et au maintien de la perméabilité des vaisseaux.

c- ROBO4 régule la production de l'interleukine 6 (IL-6) par les cellules endothéliales

Chez la souris l'injection de LPS (lypopolysacharride) provoque un contexte inflammatoire et stimule la sécrétion d'IL-6. Or, chez les souris ROBO4^{-/-}, la production d'IL-6 est fortement diminuée, et entraîne un défaut de synthèse de l'IL-1 β et de TNF- α . *In vitro*, l'absence de ROBO4 dans les cellules endothéliales en co-culture avec des monocytes inhibe l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 normalement observable dans les deux types cellulaires. Il en résulte une chute du taux d'IL-1 β et une faible sécrétion de GM-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) par les cellules endothéliales. Or, le GM-CSF stimule directement les monocytes et leur production d'IL-6.

De ce fait, la présence de ROBO4 permet aux cellules endothéliales de produire de l'IL-6 et du GM-CSF et par conséquent la synthèse d'IL-6 et d'IL-1 β par les monocytes.

L'IL-1 β agit également sur les cellules HUVEC et stimule à son tour la production d'IL-6 et de GM-CSF (Shirakura et al., 2018). Il en résulte un véritable dialogue entre les deux types cellulaires dépendant de ROBO4 (Figure 28).

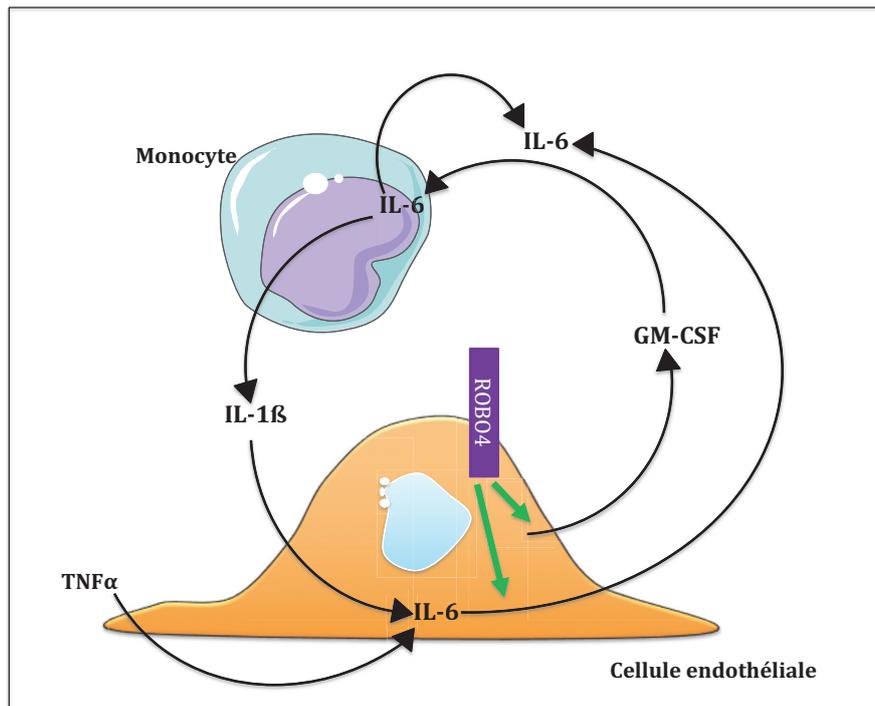


Figure 28 : Boucle de régulation de la production de l'IL-6 entre les monocytes et les cellules endothéliales. Dans un contexte inflammatoire ROBO4 stimule la sécrétion d'IL-6 et de GM-CSF par les cellules endothéliales. GM-CSF permet la production d'IL-6 par les monocytes qui elle-même permet la synthèse de l'IL-1 β . L'IL-1 β exerce un rétrocontrôle positif sur la sécrétion d'IL-6 par les cellules endothéliales. Modifié d'après Shirakura et Al., Biochemical and Biophysical Research Communication, 2018

2-3- Implication de ROBO4 dans le maintien de la niche hématopoïétique

Contrairement à ce qui a longtemps été admis, le récepteur ROBO4 n'est pas spécifique des cellules endothéliales. Dans la littérature, certaines études ont démontré son expression et sa présence dans les CSH résidentes de la moelle osseuse ce qui suggère un rôle de ce récepteur dans la physiologie de la niche hématopoïétique. De plus, les cellules stromales de l'environnement osseux sécrètent du SLIT2.

En 2009, une première étude chez la souris a mis en évidence la présence de ROBO4 dans les CSH et les progéniteurs hématopoïétiques immatures. Cependant, son expression diminue au cours de la différenciation cellulaire. Les CSH les plus quiescentes représentent une petite partie de cette population cellulaire et sont de phénotype SP (side-population). Les CSH-SP qui expriment fortement *ROBO4* sont celles qui présentent le plus important potentiel de différenciation dans de multiples lignées et sont également plus prolifératives. En revanche lorsque ces CSH surexpriment *ROBO4* ou *SLIT2*, le pourcentage de cellules SP est significativement diminué. Ceci suggère l'implication de

l'axe ROBO4/SLIT2 dans la transition des CSH-SP vers un phénotype non-SP (Shibata et al., 2009).

Comme cité précédemment, Smith-Berdan et al. (1-3-Niche hématopoïétique) ont démontré que l'absence de ROBO4 dans les CSH provoque une perte de leur interaction avec les cellules stromales de la moelle osseuse uniquement. A long terme, les transplants de CSH *ROBO4*^{-/-} ne permettent pas l'expansion hématopoïétique. Néanmoins les CSH *ROBO4*^{-/-} qui adhèrent à la moelle osseuse produisent un ratio normal de cellules différenciées, suggérant un mécanisme compensatoire. En effet, le récepteur CXCR4 est plus abondant dans ces cellules, ce qui leur permet de coloniser la moelle osseuse (Smith-Berdan et al., 2011).

En parallèle, les cellules endothéliales présentes dans la niche hématopoïétique expriment également *ROBO4*. Des expériences de colonisation de la moelle osseuse à court terme ont mis en évidence que les CSH transplantées dans des souris déficientes en *ROBO4* restent bloquées dans la vasculature et ne sont plus localisées dans la niche hématopoïétique. En revanche leur colonisation d'autres organes, comme la rate, n'est pas affectée. La délétion de *ROBO4* dans les cellules endothéliales augmente la densité du réseau sanguin de la moelle osseuse, cependant le nombre de capillaires sinusoides est drastiquement altéré. Or, les cellules sinusoidales expriment fortement *VCAM1* (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) qui interagit avec l'intégrine $\alpha 4$ des HSC dans le processus d'extravasation. De ce fait la présence de *ROBO4* est indirectement nécessaire à l'extravasation des HSC (Smith-Berdan et al., 2015).

Pour conclure, la présence de *ROBO4* dans les CSH régule leur transition d'un phénotype SP vers non SP. *ROBO4* participe également au maintien de CSH dans la moelle osseuse, sans être indispensable car ces CSH développent des mécanismes compensatoires suite à l'inhibition de ce récepteur. De plus l'expression de *ROBO4* par les cellules endothéliales permet l'extravasation des CSH vers la moelle osseuse et par conséquent le maintien d'une population souche dans la niche hématopoïétique. De façon intéressante l'absence de *ROBO4* dans les cellules endothéliales ou les CSH n'affectent pas la colonisation hématopoïétique d'autres organes. De ce fait, la participation de *ROBO4* à la physiologie de CSH est spécifiquement osseuse.

2-4- ROBO4 et cancer

a- Angiogenèse tumorale

Dans la littérature, la majorité des publications convergent vers un rôle inhibiteur de l'angiogenèse tumorale du récepteur ROBO4. Cependant cela est controversé, notamment dans le cas du gliome.

Une première étude *in vitro* montre que la culture de cellules endothéliales avec du milieu conditionné de cellules de gliome induit la prolifération, la migration et la formation de tubules par les cellules endothéliales. De plus, dans ces conditions de culture, l'expression de *ROBO4* est négativement régulée. La surexpression de *ROBO4* dans les cellules endothéliales contrecarre l'effet stimulateur du milieu conditionné de gliome sur ces dernières *via* l'inhibition de la phosphorylation et de l'activation de VEGFR2, mais aussi celle de molécules en aval comme PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase), FAK et AKT. Ceci est en faveur d'un rôle anti-angiogénique de ROBO4 (Figure 29) (Cai et al., 2015b).

En outre, ce même groupe a également publié une étude clinique démontrant que l'expression de *ROBO4* est de mauvais pronostic chez les patients atteints de gliome. Des analyses de RT-qPCR et d'immunohistochimie ont montré que ROBO4 est plus fortement présent dans le gliome de grade IV et est co-localisé avec le CD34 des cellules endothéliales. De plus l'expression de *ROBO4* est positivement corrélée avec une forte densité microvasculaire ainsi qu'à une survie moyenne largement réduite (49 versus 24 mois) (Cai et al., 2015c).

Dans le cas du cancer du sein, l'injection orthotopique de cellules tumorales mammaires murines dans des souris C57BL/6 ayant une délétion de *ROBO4* ou non, montre une croissance tumorale plus importante et davantage de métastases pulmonaires chez les animaux *ROBO4*^{-/-} comparé aux souris contrôles. Ces résultats corrélerent avec les observations cliniques montrant une meilleure survie sans rechute chez les patientes dont les tumeurs expriment fortement ROBO4. Les souris *ROBO4*^{-/-} présentent une vasculature accrue suggérant un rôle anti-angiogénique de ROBO4. De plus cette néoangiogenèse est imparfaite, avec une importante hyperperméabilité. Du fait de l'absence de la protéine jonctionnelle ZO-1, les cellules endothéliales *ROBO4*^{-/-} perdent

leur capacité à former des jonctions serrées entre-elles. La croissance anarchique du réseau vasculaire et son hyperperméabilité vont alors promouvoir la formation de métastases (Zhao et al., 2016a).

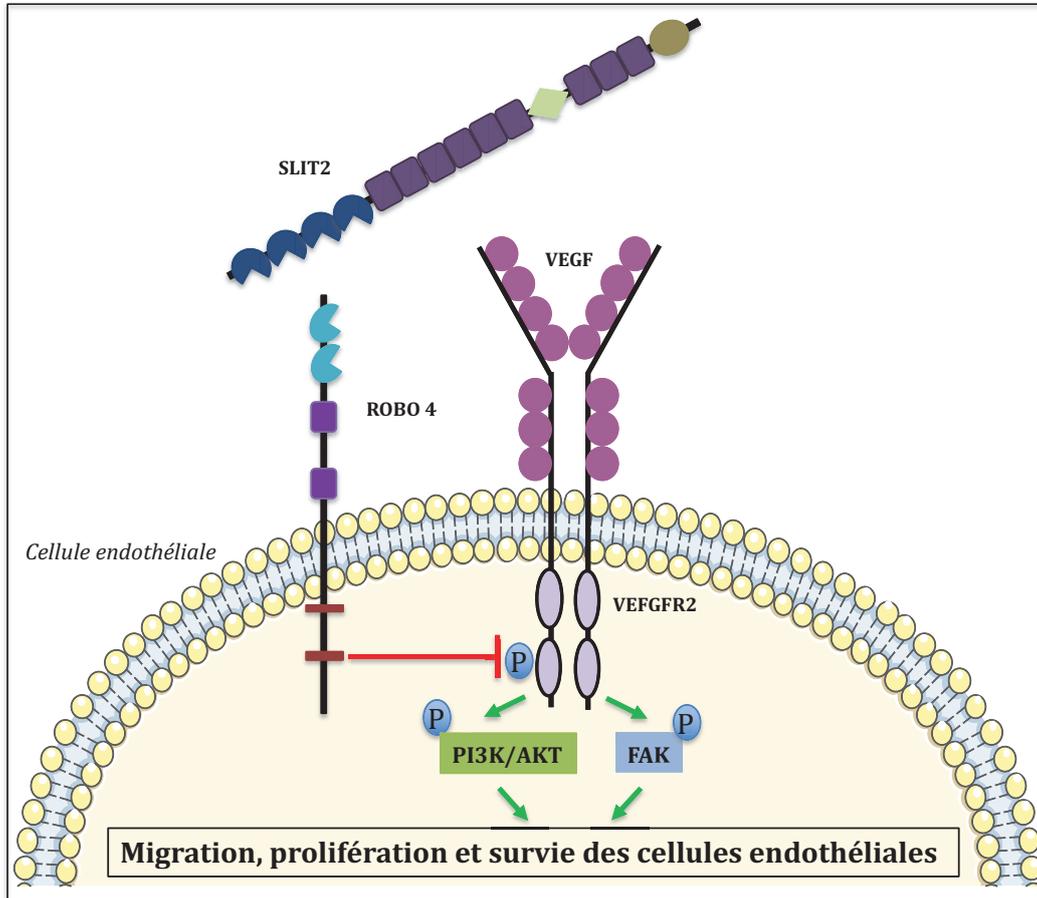


Figure 29 : Inhibition de la voie du VEGF par ROBO4 dans les gliomes. La stimulation de ROBO4 par SLIT2 inhibe la phosphorylation du VEGFR2, de PI3K, d'AKT et de FAK. Ceci a pour conséquence une diminution de la migration, de la prolifération et de la survie des cellules endothéliales et donc de l'angiogenèse tumorale.

Certaines études ont proposé de cibler ROBO4 pour pallier le développement tumoral. L'immunisation de souris avec le domaine extracellulaire de ROBO4 et un adjuvant permet le développement d'une réponse immunitaire dépendante des lymphocytes B. L'implantation d'éponges dans les souris immunisées montre que cibler ROBO4 permet de drastiquement diminuer l'angiogenèse. En parallèle, la prise tumorale est également réduite suite à l'injection sous cutanée de cellules de carcinome pulmonaire de Lewis chez ces souris immunisées. De plus, les organes de souris vaccinées ne présentent pas de pathologie. Ces données suggèrent qu'une vaccination anti-ROBO4 pourrait être une bonne stratégie thérapeutique (Zhuang et al., 2015). Compte tenu du rôle de ROBO4 dans

l'inactivation d'ARF6, Zhao et al. ont restauré cette inhibition dans les cellules endothéliales *ROBO4*^{-/-}. Pour ce faire, des souris *ROBO4*^{-/-} ont été traitées avec du SecinH3, un inactivateur d'ARF6, avant l'injection orthotopique de cellules murines de cancer du sein. Le traitement réduit la croissance tumorale et le développement de métastases pulmonaires *via* la réexpression de *ZO-1* qui permet la formation de jonctions serrées entre les cellules endothéliales. De plus SecinH3 engendre peu de toxicité chez l'animal (Zhao et al., 2016a).

L'ensemble de ces données suggèrent que le ciblage de ROBO4 dans l'angiogenèse tumorale pourrait être une bonne piste thérapeutique.

b- Rôle de ROBO4 dans les cellules tumorales

Quelques équipes ont également mis en évidence la présence de ROBO4 dans certaines lignées de cellules cancéreuses. Les cellules tumorales uroépithéliales humaines T24 expriment *ROBO4* et la présence de la protéine a été confirmée par immunohistochimie. L'inoculation sous-cutanée de ces cellules chez des souris *nude* suivie de l'injection d'anticorps anti-ROBO4 tous les 3 jours pendant un mois, freine la croissance tumorale suggérant un rôle pro-tumoral du récepteur dans les cellules T24 (Li et al., 2015). Très récemment, une étude clinique a démontré que la localisation nucléaire du récepteur ROBO4 est corrélée à des cancers de la vessie de bas grades ainsi qu'à une augmentation de la survie chez les patients. A l'inverse, une localisation cytoplasmique de ROBO4 est significativement associée à des tumeurs de la vessie invasives, de grades élevés et à une diminution de la survie des patients (Krafft et al., 2018). De ce fait la localisation de ROBO4 semble affecter ses propriétés pro ou anti-tumorales.

Dans le cas de leucémies myéloïdes aigues, des analyses en immunohistochimie de biopsies de patients confirment la présence de ROBO4 dans les cellules endothéliales mais aussi dans les cellules tumorales. L'étude clinique réalisée présente une diminution de la survie moyenne chez les patients dont les tumeurs expriment fortement ROBO4 (Chen et al., 2015). Ces données sont en accord avec celles précédemment énoncées en faveur d'un rôle pro-tumoral de ROBO4 dans les cellules cancéreuses.

Néanmoins des travaux publiés en 2019 dans le cadre du cancer de la prostate montrent une dualité de rôle du récepteur ROBO4. L'expression de *ROBO4* est nettement augmentée dans les tissus cancéreux prostatiques comparés aux tissus sains. De plus, ROBO4 est

présent dans les cellules endothéliales mais aussi dans les cellules cancéreuses. Son expression est significativement associée à des tumeurs agressives. En revanche la présence de ROBO4 est corrélée à une tendance à retarder la rechute tumorale après chirurgie, probablement *via* son rôle dans la stabilisation des vaisseaux sanguins. *In vitro*, la surexpression du récepteur ROBO4 diminue la prolifération cellulaire ainsi que la survie de différentes lignées de cancer de la prostate, indépendamment de leur statut hormonale (Pircher et al., 2019). Cette étude suggère un rôle contradictoire de ROBO4 à la fois pro- et anti-tumoral. Il est donc nécessaire de discriminer la fonction du récepteur dans les cellules tumorales et dans les cellules endothéliales pour mieux comprendre ces différents résultats.

Chapitre 2 : Travail expérimental

I- Introduction et hypothèse de travail

L'os est le principal site où des métastases se développent. Les cancers du sein, de la prostate et les myélomes multiples sont dits ostéophiles. Cela signifie qu'au décours de l'évolution de la maladie la majorité des patients présenteront des métastases osseuses. Dans le cas des tumeurs mammaires, des lésions osseuses sont diagnostiquées chez 50 à 80% des patientes. Lors du diagnostic de la tumeur primaire, près de 60% des patientes présentent des foyers métastatiques qui ne peuvent être détectés par les moyens d'imagerie actuels et qui pourront mettre une dizaine d'année à se développer (www.arcagy.org).

Lorsque des cellules de cancer du sein disséminent dans l'os, elles perturbent l'équilibre physiologique entre résorption et formation osseuse conduisant ainsi, à une dégradation accrue. En parallèle, le développement de lésions ostéolytiques favorise la croissance tumorale, *via* l'apport de nombreux facteurs de croissance qui alimentent les cellules tumorales, leur permettant de se multiplier et de survivre dans l'environnement osseux. Cliniquement, cette résorption massive est marquée par la fragilisation de l'os, ce pourquoi les patientes avec des métastases osseuses présentent souvent des fractures pathologiques. En plus de l'atteinte squelettique, les patientes souffrent également de dérèglements métaboliques, en particulier, d'une hypercalcémie.

Actuellement, pour ce stade de développement tumoral, aucune thérapie curative ne peut être proposée. Même si la prescription de Bisphosphonate ou de Dénozumab, induit un ralentissement de la résorption osseuse, elle ne permet pas la disparition des lésions existantes. De ce fait les métastases osseuses sont responsables de la majorité des décès associés à un cancer du sein. Comprendre les mécanismes impliqués dans la formation précoce de micro-métastases osseuses, en particulier l'ostéotropisme et l'ancrage des cellules tumorales dans la moelle osseuse, est essentiel à l'émergence de nouvelles thérapies curatives et par conséquent est donc un véritable enjeu de santé publique.

Une sous population de cellules ostéotropiques provenant de la lignée de cellules métastatiques de cancer du sein MDA-MB-231, appelée B02 a été générée au laboratoire (Peyruchaud et al., 2003). La comparaison des profils d'expression génique des cellules MDA-MB-231 et B02 par analyse du transcriptome sur puces Gene Chips Affymetrix A et B U133 a mis en évidence une signature génétique spécifique aux métastases osseuses dans les cellules B02 (Bellahcène et al., 2007; Garcia et al., 2008), comprenant les gènes de la famille *ROBO/SLIT*, en particulier *ROBO4*. Contrairement aux autres membres de sa famille impliqués dans le développement du système nerveux central, *ROBO4* a été identifié spécifiquement dans les cellules endothéliales où il a pour fonction principale le maintien de l'intégrité du réseau vasculaire. De façon intéressante, les CSH présentent à leur surface le récepteur *ROBO4* qui participe à leur ancrage dans la moelle osseuse. Actuellement *SLIT2*, *ROBO1* et *UNC5b* ont été décrits comme potentiels ligands de *ROBO4*, mais ces données sont encore discutées dans la littérature.

A ce jour, l'implication de *ROBO4* en oncologie est démontrée dans les cellules endothéliales et porte donc sur un rôle pro ou anti-angiogénique. En revanche, seulement trois études ont permis l'identification de la présence de *ROBO4* dans des cellules de cancers de la prostate, de la vessie ainsi que de leucémies myéloïdes aiguës, cependant son rôle est encore mal décrit (Chen et al., 2015; Li et al., 2015; Pircher et al., 2019).

Lors de son travail de doctorat au laboratoire, Bénédicte Eckel a réalisé une étude clinique chez 254 patientes atteintes de cancer du sein montrant que la forte expression de *ROBO4* dans les tumeurs primaires des patientes est significativement associée à un nombre de rechutes deux fois plus élevé que dans le groupe à faible niveau de *ROBO4* (Figure 30 A ; 32 rechutes contre 15, respectivement, $p = 0,009$ par le test de log-rang). En parallèle l'analyse réalisée chez des patientes présentant des ganglions lymphatiques positifs (pN+), démontre que des niveaux élevés de *ROBO4* dans la tumeur primaire corrélaient avec les rechutes métastatiques en général (Figure 30B; $p = 0,07$ par test de log-rank) ainsi qu'avec les rechutes métastatiques à l'os (Figure 30 C, $P = 0,018$ par test de log-rank). Par conséquent, une forte expression de *ROBO4* corréla avec un pronostic défavorable en clinique.

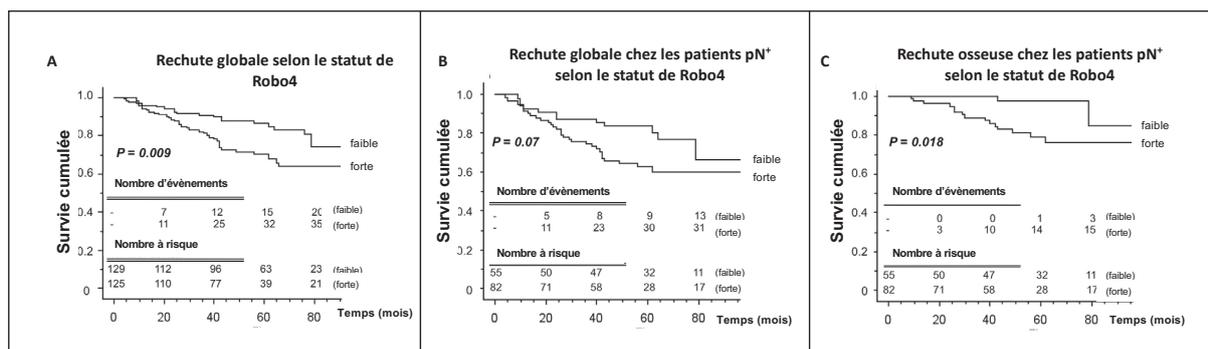


Figure 30 : Association de l'expression de ROBO4 avec la rechute clinique du cancer du sein. Estimations des taux de survie sans rechute, par la méthode de Kaplan-Meier, chez 254 patientes atteintes de cancer du sein, selon (A) le statut de ROBO4. (B) Taux de survie sans récurrence globale ou (C) osseuse chez 137 patientes atteintes de cancer du sein avec invasion des ganglions lymphatiques (pN+).

Au laboratoire, de précédentes analyses de western blot montrent la présence d'une protéine ROBO4 unique à un poids moléculaire de 92 KDa, dans les lignées de cancer du sein triples négatives, HER2+ et luminales (Figure 31 A). De façon intéressante, ce sont dans les cellules ostéotropiques B02 que ROBO4 est le plus fortement détecté. De plus, *in vivo*, l'inhibition du récepteur ROBO4 dans les cellules métastatiques B02 par traitement avec anticorps bloquant, diminue de façon drastique l'ancrage osseux, lorsque les cellules sont inoculées directement dans la cavité tibiale de souris (Figure 31 B). L'ensemble de ces résultats a mis en évidence le rôle pro-tumoral de ROBO4 dans les cellules métastatiques de cancer du sein et son implication dans les étapes précoces de la formation de métastases osseuses.

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité des résultats précédent et vise à comprendre l'impact de ROBO4 dans les cellules métastatiques, sur la survenue de lésions osseuses. Dans un premier temps, avec l'objectif de décrypter la fonction de ce récepteur dans les cellules B02 nous avons invalidé le gène *ROBO4* par stratégie de CRISPR-Cas9. Par conséquent, mes premiers travaux de doctorat ont porté sur l'obtention et la caractérisation de clones cellulaires déplétés en ROBO4, tant d'un point de vue moléculaire que fonctionnel. J'ai démontré que l'absence de ROBO4 ne perturbe pas les capacités de prolifération et de migration des cellules B02 mais interfère avec leur caractère invasif *in vitro*. J'ai ensuite utilisé un modèle expérimental murin d'injection orthotopique de cellules tumorales pour étudier l'influence de ROBO4 dans l'invasion et la tumorigénèse *in vivo*. Le rôle de ROBO4 dans la formation de métastases osseuses a été

étudié dans différents modèles animaux, à long et à court termes. Le défaut d'ancrage et/ou de survie des cellules B02 invalidées en ROBO4 évident nous a conduit à examiner leur interaction avec plusieurs types cellulaires résidents du microenvironnement osseux. La perte d'interactions cellulaires observée suite à la délétion de *ROBO4* a permis d'émettre l'hypothèse et d'examiner le rôle de ROBO4 en tant que molécule d'adhérence. L'obtention de résultats encourageants au cours de ce travail de thèse, a permis la mise en place d'un projet collaboratif avec pour objectif la genèse d'anticorps bloquants, humains dirigés contre ROBO4. Lors de mon doctorat j'ai par conséquent testé *in vitro* l'efficacité de ces anticorps.

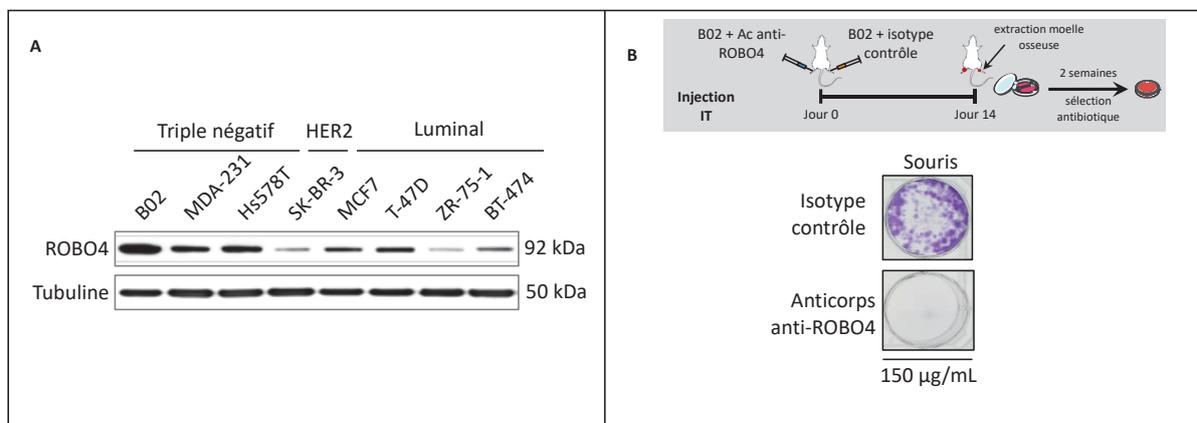


Figure 31 : Présence et rôle pro-métastatique du récepteur ROBO4 dans les cellules humaines de cancer du sein. (A) ROBO4 est présent dans les lignées cellulaires humaines de cancer du sein et est davantage détecté dans les cellules métastatiques ostéotropiques B02. (B) L'inhibition du récepteur ROBO4 dans les cellules B02 par utilisation d'un anticorps bloquant en préalable à une injection intra-tibiale dans des souris nude, provoque la chute drastique du nombre de micro-colonies tumorales après extraction et mise en culture de la moelle osseuse (Travail de thèse de Lise Clément-Demange).

II- Matériels et méthodes

1- Biologie cellulaire

Culture cellulaire

Les cellules ont été cultivées en milieu (Gibco) complet c'est-à-dire supplémenté avec du SVF (Sérum de Veau Fœtal) (Eurobio) et 1% (v/v) de pénicilline/streptomycine (Life technologies) à 37°C dans un incubateur à 5% de CO₂. Le milieu et la quantité de sérum utilisés sont répertoriés dans le tableau ci-dessous. Les lignées cellulaires sont testées en routine pour la détection de mycoplasmes par mesure de l'intensité de la bioluminescence dans le surnageant de culture (MycoAlert Plus, Mycoplasma Detection Kit, LONZA).

Cellules	Caractéristiques	Milieu	% (V/V) de SVF
MDA-MB-231	Lignée humaine de cancer du sein, ATCC	DMEM	10
B02	Lignée humaine ostéotrope (sous-clone des cellules MDA-MB-231)	DMEM	10
Cellules Souches Mésoenchymateuses	Humaine, issues de déchets opératoires de la hanche	α -MEM +/+	20
Cellules de Schwann	Lignée humaine, ScienCell. Les flasques ou puits sont coatés avec de la poly-L-lysine (Sigma) pour que les cellules adhèrent	DMEM	20
MC3T3-E1	Lignée de pré-ostéoblastes murins, ATCC	α -MEM +/+	10

Lorsque les cellules B02 ont été stimulées avec du TNF- α (Recombinant human TNF- α protein, 210-TA, R&D), il a été ajouté à une concentration de 10 ng/mL pendant 24h.

Génération des lignées B02 CTL et B02 KO ROBO4

La lignée cellulaire dont le gène de *ROBO4* a été invalidé de façon stable, a été générée en utilisant la technologie CRISPR/Cas9, par transduction lentivirale à l'aide de vecteurs lentiviraux pour l'expression de la cas9 et de l'ARN guide ROBO4 (pLentiCRISPRV2, GenScript).

La lignée B02 exprimant la luciférase *LUC2* a été transduite avec des plasmides lentiviraux contenant l'ARN guide (ARNg) ROBO4 ou un ARN guide universel non ciblant afin de générer les lignées B02 KO ROBO4 et B02 CTL, respectivement. L'ARNg cible l'exon4 de ROBO4, il a été conçu par CRISPR Design Tool, puis clonés dans le vecteur pLentiCRISPR, séquencé et vérifié (GeneScript).

Les particules lentivirales ont été obtenues par transfection de la lignée cellulaire Lenti-X 293T, avec le système d'expression lentiviral Lenti-X™ HTX (Takara, Clontech Laboratories) et les plasmides pLentiCRISPR en présence de l'agent de transfection Xfect Transfection Reagent (Takara, Clontech Laboratories), conformément aux directives des fabricants. Les cellules tumorales ont ensuite été incubées avec les particules lentivirales en présence du réactif RetroNectin™ (Takara) coaté sur le fond des puits de culture et cultivées dans un milieu complet contenant du SVF sans tétracycline (Clontech), puis soumises à une sélection avec par la puromycine à 2 µg / mL. Les cellules B02 KO ROBO4 ont ensuite été isolées sous forme de clones individuels par dilution limites. Les délétions dans ces lignées monoclonales ont été criblées par amplification par PCR de l'exon 4 puis séquençage ainsi que par Western Blot. Les clones utilisés dans ce travail ont été produits en utilisant l'ARN guide suivant : 5'CTCCCTATGTCCTGCGCTGT 3'

Test de prolifération cellulaire

Ce test mesure l'incorporation d'un analogue de la pyrimidine, le BrdU (bromodésoxyuridine) dans l'ADN des cellules en division.

Les cellules ont étéensemencées à la concentration de 1.10^5 cellules/mL dans des plaques de 96 puits. Après 24h, les cellules ont été lavées au PBS (Phosphate-Buffered Saline) puis incubées dans du milieu basal pendant 12h. Le BrdU a été ajouté dans le milieu cellulaire puis après 16h d'incubation et son incorporation a été détectée par un anticorps monoclonal anti-BrdU puis quantifiée par spectrophotométrie par mesure de l'absorbance à 450 nm selon les instructions du fabricant (kit Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche).

Test de cicatrisation

Les cellules ont étéensemencées à la concentration de 3.10^5 cellules/mL dans des plaques 12 puits. Après 24h d'incubation, une cicatrice a été réalisée à l'aide d'un cône de P20. Le recouvrement de cette cicatrice a été suivi pendant 24h par vidéomicroscopie à l'Axiovert 200M (Zeiss). Les puits ont été reconstruits et la vitesse de migration cellulaire a été quantifiée à l'aide du logiciel Fiji.

Test d'invasion

Les expériences en chambre de Boyden modifiée ont été réalisées en plaque de culture cellulaire de 24 puits, contenant des inserts avec des pores de 8 μm de diamètre (Corning). Les inserts ont été préalablement coatés avec 100 μL de Matrigel appauvri en facteurs de croissance à 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Corning) qui a polymérisé pendant 12h à 37°C. Les cellules tumorales ($1,6.10^5$ cellules/mL) ont été remises en suspension dans un milieu de culture contenant 0,1% (p/v) d'albumine de sérum bovin. Ces suspensions cellulaires (300 μL) ont été chargées dans la partie supérieure tandis que 750 μL de chimioattractant (milieu de culture supplémenté avec 10% (v/v) de SVF ont été ajoutés dans la partie inférieure. 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 avec une solution de cristal violet contenant du méthanol. 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 $\text{DO} = 570 \text{ nm}$.

Test d'adhérence sur des protéines matricielles

Les puits d'une plaque 96 puits coatées avec du collagène humain de type I (BD BioCoat) ont été saturés avec une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) 3% (p/v) 1h à 37°C puis 100 μL d'une suspension cellulaire à 5.10^5 cellules/mL a été ajoutée. Après 5, 15, 30 et 60 minutes les cellules ont été fixées et colorées avec une solution de cristal violet contenant du méthanol. Le nombre de cellules adhérentes a été quantifié à l'aide du logiciel Fiji.

Pour le test d'adhérence sur la fibronectine, les puits d'une plaque 96 puits ont été coatés avec une solution de PBS contenant 15 µg de fibronectine humaine (Millipore) pendant 16h à 37°C. Les puits ont ensuite été saturés et les cellulesensemencées comme précédemment. Les cellules ont été fixées après 15 et 30 min d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂.

Test d'adhérence avec les cellules résidentes de la moelle osseuse

Les cellules de la moelle osseuse ont étéensemencées à 1.10⁴ cellules par puits de P96 dans des plaques FluoroNunc blanches non traitées pour la culture cellulaire (Thermo Fisher Scientific). Après trois jours de culture les cellules osseuses ont été lavées au PBS puis les lignées cancéreuses B02 parentales, CTL ou KO ROBO4.1, exprimant la luciférase 2, ont été diluées dans 100 µL de milieu basal et ajoutées dans chaque puits à une concentration de 5.10⁵ cellules par/mL. Après 20h d'incubation, les puits ont de nouveau été rincés au PBS pour éliminer les cellules non-adhérentes et 20 µL de tampon de lyse 1X (Promega) ont été ajoutés directement sur les cellules. Le niveau de luciférase émise a été quantifié au luminomètre (Luminoskan Ascent, Thermo Electron), suite à l'injection de 50 µL de luciférine (Luciferase Assay System Promega).

Pour les tests des anticorps dirigés contre ROBO4 que nous avons généré, les cellules B02 F11 Luc N13, ont été diluées à une concentration de 2.10⁶ cellules/mL dans du milieu basal, puis traitées pendant 1h. Par la suite, 100 µL de la suspension cellulaire ont été ajoutés dans chaque puits.

Test de formation de sphéroïdes

Pour les tests en culture homotypique, les cellules tumorales ont été lavées et remises en suspension dans un milieu adéquat à la formation de sphéroïdes, dépourvu de sérum (3D Tumorsphere Medium XF, Promocell) à la concentration de 4.10⁴ cellules/mL. En parallèle, 300 µL de milieu est déposé par pipetage inversé dans des plaques P24 à surface non-adhérente (Elplasia, Kraray/ALS) avant l'addition de 500 µL de suspension cellulaire. En culture hétérotypique, les cellules sont diluées à une concentration de 8.10⁴ cellules/mL et 250 µL de chaque suspension cellulaire est ajoutée.

Lorsque de l'anticorps est utilisé, celui-ci est additionné à la concentration de 10 µg/mL. Trois jours plus tard, 300 µL de milieu est ajouté.

Après une semaine d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, les sphères sont fixées avec du PFA (paraformaldehyde) 4% pendant 15 min, puis les noyaux sont marqués au DAPI pendant 10 min. Les sphères sont lavées 2 fois au PBS puis conservées dans 300 µL de PBS. Les puits ont été scannés avec un microscope NIKON PALM-STORM puis le nombre et la surface des sphéroïdes ont été analysés avec le logiciel FIJI.

Dans le cas des tests de co-cultures des cellules tumorales B02 parentales avec les cellules B02 CTL ou KO ROBO4.1, les cellules ont été préalablement colorées au DiD ou DiO (Vybrant DiD or DiO, ThermoFisher), selon les instructions du fabricant. Le comptage des cellules a été effectué à l'aide d'un algorithme créé en Python 3. Un seuil de 1000 niveaux de gris a été choisi pour binariser l'image et différencier les cellules de l'arrière-plan. Ensuite, une transformation d'opening avec un kernel sous forme de disque d'un diamètre de 3 pixels (correspondant à 79 µm²) a été appliquée à l'image binarisée, pour supprimer les pixels parasites. Enfin, les groupes isolés ont été quantifiés et leur densité optique a été mesurée en calculant le produit, de la valeur de gris moyenne du groupe et de la surface du puits.

Immunofluorescence

Les cellules ont étéensemencées sur lamelle de verre dans des plaques P24 à la concentration de 3.10⁴ cellules/mL. Après 16h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, les cellules ont été rincées au PBS puis fixées avec du PFA 4% 10 minutes et de nouveau lavées au PBS. Après un blocage des sites aspécifiques à la BSA 1,5% dans du PBS de 30 min à 37°C, les cellules ont été marquées avec de la rhodamine/phalloïdine (1 /1000) et au DAPI (1µg/mL) pendant 15 min à 37°C avant d'être lavées au PBS. Les lamelles de verre sont montées sur lame et collées grâce au FluorSave Reagent (CALBIOCHEM).

2- Biologie moléculaire

RT-PCR 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'1 µg d'ARN totaux en utilisant le kit de synthèse d'ADNc (Acide Désoxyribonucléique) iScript (Biorad). La PCR en temps réel a été effectuée sur un système Applied Biosystems QuantStudio 7 (ThermoFisher Scientific) en utilisant du PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific) ainsi que les amorces adéquates à 0,5 µM dans des plaques 96 puits (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) selon le programme suivant : 2 minutes à 50°C puis 2 minutes à 95°C suivie d'une phase d'initiation de 1 seconde 95°C puis 30 secondes à 60°C et enfin, de 45 cycles de 15 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C puis 15 secondes à 95°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). Les résultats sont exprimés en quantité relative par la méthode des $\Delta\Delta Ct$.

Western Blot

Les cellules en culture ont été lysées dans un tampon RIPA (Sigma) additionné d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les lysats ont été incubés 5 minutes sur glace avant d'être centrifugés à 8 000 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 protéines des lysats membranaires ont été extraites à l'aide du kit « ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit » selon les recommandations du fournisseur (Merck Millipore). Les extraits protéiques (20µg) ont été dénaturés à 95°C pendant 5 minutes avant d'être séparés sur un gel SDS-PAGE de concentration gradiente en polyacrylamide de 4 à 15% (Mini-PROTEAN TGX, Biorad) à 200V puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (Millipore) *via* un système de transfert liquide pendant 1h à 100V. Les membranes ont été saturées 1h à température ambiante dans du TBS-T 0,01% + 5% de lait écrémé puis

incubées 1h avec les anticorps primaires dirigés contre ROBO4 (Abcam ab103674 ; 1/500), α -tubuline (Cell signaling 21445 ; 1/5000). Après 30 minutes de rinçage dans du TBS-T 0,01% (Tris-Buffer Saline-Tween), les membranes ont été incubées 1h avec les anticorps secondaires anti-lapin (GE Healthcare ; NA934) couplés à la peroxydase de raifort (HRP). La révélation est effectuée grâce à un kit de détection de chimioluminescence (ECL) (Biorad).

Clonage

Les ADNc ont été synthétisés par reverse transcription à l'aide du kit de synthèse d'ADNc iScript (Biorad) à partir d'ARN de cellules B02. Les ADNc codant pour ROBO4 issus des différents clones de B02 KO ROBO4 ont ensuite été amplifiés à l'aide de la polymérase Dream Taq (ThermoFisher Scientific) qui ajoute des extrémités TA et d'amorces spécifiques de l'exon 4 de *ROBO4* (amorces sens : CCGCATCCTCCGGTAGAATTTG et anti-sens : GAACTGAGGCGTGGAACATCC). Le fragment d'ADN double brin obtenu a été purifié et cloné dans le vecteur pCR™2.1 Vector (TA cloning kit, invitrogen) par stratégie de clonage TA, selon les recommandations du fabricant. La réaction de ligature a été effectuée à l'aide d'une T4 DNA ligase (Promega). Le plasmide obtenu a été amplifié par transformation de bactéries compétentes. Le milieu réactionnel (2 μ L) a été incubé avec 50 μ L de bactéries compétentes Stellar (Clontech) pendant 30 minutes dans la glace. Un choc thermique de 45 secondes à 42°C a été effectué, permettant l'entrée du plasmide dans les bactéries, et après 2 minutes sur la glace puis 500 μ L de milieu liquide SOC préalablement chauffé à 37°C, a été ajouté (Clontech). Après 1h d'incubation à 37°C et sous agitation, les bactéries ont été étalées sur un milieu gélosé LB Agar supplémenté par 100 μ g/mL d'ampicilline pour une sélection sur la nuit, des clones porteurs du gène de résistance.

Pour chaque ADNc cloné, 4 clones résistants ont étéensemencés dans 5 mL de milieu LB liquide supplémentés de 100 μ g/mL d'ampicilline. Après une nuit à 37°C sous agitation, les plasmides ont été extraits à l'aide du kit « NucleoSpin® plasmid » (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. La concentration d'ADN a été mesurée par absorbance à 260nm et sa pureté évaluée par le rapport des densités optiques à 260 et 280nm. La séquence de l'insert a été vérifiée par séquençage (Cogenics, England) et les résultats analysés à l'aide du logiciel SnapGene Viewer.

3- Expérimentation animale

Les souris femelles immunodéprimées Balb/c *nude*, âgées de 6 semaines proviennent des laboratoires Janvier (Saint-Berthelin, France). Les souris NOD/SCID sont issues de l'élevage à l'animalerie ALECS, module SPF, Lyon. Toutes les procédures impliquant des animaux, y compris leur hébergement, les soins, la méthode par laquelle ils ont été mis à mort, ainsi que les protocoles expérimentaux ont été menées conformément au code de pratique établi par le comité d'éthique local de l'Université de Lyon. Le comité d'éthique en expérimentation Animale CEEA-55 a autorisé le projet : DR2017-44 « Etude de la déplétion de ROBO4 dans la formation de métastases osseuses » 2017061409575827.

Tumorigenèse

Des expériences de xénogreffes tumorales orthotopiques ont été menées chez des souris immunodéficientes *nude*. Les cellules B02 parentales, CTL et KO ROBO4 ont été injectées dans le tissu adipeux de la quatrième glande mammaire de souris femelles âgées de six semaines (10^6 cellules dans 50 μ l de PBS). Après 35 jours, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs collectées, pesées et mesurées, puis préparées pour l'immunohistochimie.

Ostéolyse

Les expériences de formation de métastases osseuses ont été réalisées chez les femelles immunodéprimées Balb/c. Les cellules ($5 \cdot 10^5$ cellules dans 100 μ l de PBS) ont été injectées dans l'artère caudale des souris sous anesthésie gazeuse. L'apparition de tumeurs au niveau des pattes des souris a été suivie par la bioluminescence (NightOwl, Berthold) et les lésions ostéolytiques ont été analysées par radiographies (Skyscan1076) des animaux anesthésiés. La surface des lésions ostéolytiques a été mesurée à l'aide d'un système informatisé d'analyse d'image avec le logiciel CTAn64 (Bruker microCT), et l'étendue de la destruction osseuse par patte a été exprimée en millimètres carrés. Les souris ont été sacrifiées 21 jours après l'inoculation et les membres inférieurs ont été scannés *ex-vivo* (Skyscan1076). Pour l'analyse 3D, les images de scanner ont été

reconstruites avec le logiciel NRecon Reconstruction (Bruker microCT), et le BV/TV (Bone Volume/ Tissu Volume) a été quantifié avec le logiciel CTAn64 (Bruker microCT). En parallèle, les os ont été préparés pour inclusion en paraffine.

Micro-métastases dans la moelle osseuse ex vivo

Les injections intra-tibiales (IT) ont été réalisées chez des souris femelles BALB/c *nude* âgées de 6 semaines. Après anesthésie gazeuse, 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 µL d'une suspension de 10^5 cellules B02 parentales ou KO ROBO4 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 3h à 37°C sous agitation (110 rpm) puis filtrés sur tamis cellulaire de 100 µm. Les cellules de la moelle osseuse ainsi recueillies ont été mises en culture dans du milieu complet supplémenté de 5 µg/mL de blasticidine (Life technologies) et de 0,5% de fungizone (Gibco). Après 2 semaines de culture, les colonies de cellules tumorales ont été fixées et colorées avec une solution de cristal violet contenant du méthanol, puis dénombrées. La surface de puits recouvert par les micro-colonies a également été mesurée avec le logiciel FIJI.

Les injections intra-artérielles (IA) ont également été réalisées chez des souris femelles BALB/c *nude* âgées de 6 semaines. Les cellules ($5 \cdot 10^5$ cellules dans 100 µL de PBS) ont été injectées dans l'artère caudale de souris anesthésiées. Les souris ont été mises à mort 1 semaine après l'injection des cellules et le même protocole que précédemment décrit a été mis en place.

Micro-métastases osseuses ex-vivo par microscopie bi-photonique

Les cellules tumorales ont été colorées au DiD (Dihydroethidium, Vybrant DiD, ThermoFisher) selon les instructions du fabricant. Les souris BALB/c *nude* âgées de 6 semaines ont été placées sous anesthésie gazeuse et inoculées par une injection intra-artérielle avec $5 \cdot 10^5$ cellules dans 100 µL de PBS. Les animaux ont été sacrifiés après 5 jours de protocole et les membres inférieurs ont été placés dans l'azote liquide puis

stockés à -80°C. Les tibias ont été inclus dans de l'OCT (Tissue-Tek) à -80°C puis la moelle osseuse a été exposée grâce à des coupes réalisées au cryostat (LEICA CM3050 S) et imagée avec un microscope confocal biphotonique (Zeiss LSM 880 AiryScan) sur une profondeur de 70 µm. L'utilisation de multiphotons permet la fluorescence des fibres de collagène de l'os grâce à une longueur d'onde d'excitation de 900 nm, d'émission de 480 nm et de détection de 412 à 464 nm. Les cellules tumorales ont été détectées par microscopie confocale avec une longueur d'onde d'excitation de 633 nm et d'émission de 661 nm. L'analyse du nombre et de la surface des micro-métastases par rapport au volume osseux a été réalisée avec le logiciel Imaris.

Niches osseuses humanisées

Pour réaliser une niche d'os ectopique humanisée, un mélange comprenant : 55 mg d'hydroxyapatite, du calcium (7,5 µL; 90,1 mM), et des cellules souches mésenchymateuses humaines ($2 \cdot 10^6$) diluées dans 50 µL de sérum humain; a été inoculé en sous-cutané à des souris NOD/SCID. Après 6 semaines, les cellules tumorales ($2 \cdot 10^5$ cellules dans 100 µl de PBS) ont été injectées dans l'artère caudale de souris anesthésiées. Chaque semaine la croissance tumorale a été surveillée et quantifiée par l'analyse en bioluminescence des animaux anesthésiés, à l'aide d'un système d'imagerie NightOwl. Après un mois, les souris ont été sacrifiées et une niche en os ectopique a été collectée et préparée pour la coloration immunohistochimique.

Lorsque de l'anticorps a été utilisé, les cellules tumorales ont été pré-incubées 1h à 37°C sous agitation à 110 RPM avec de l'anticorps anti-ROBO4 (ab103674) ou de l'anticorps contrôle (immunoglobuline G de lapin, R&D, AB-105-C) avant inoculation chez la souris.

Immunohistochimie, histologie osseuse et histomorphométrie

Les tumeurs primaires ont été fixées et incluses en paraffine. L'immunohistochimie a été réalisée sur des sections de tumeurs de 5 mm incubées avec un anticorps monoclonal anti-Ki67 humain (Dako, Cytomation) qui reconnaît spécifiquement les cellules en prolifération ou avec un anticorps polyclonal anti-CD31 de souris (Anaspec) pour visualiser les vaisseaux sanguins. Les coupes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire couplé à la HRP. Le marquage a été réalisé par la Plateforme Ciqle (Lyon,

France). Le nombre de noyaux immunocolorés pour le Ki-67 a été dénombré à l'aide du logiciel FIJI. L'index mitotique a été calculé comme le rapport entre le nombre de noyaux Ki-67 positifs et le nombre total de noyaux et exprimé en pourcentage de noyaux Ki-67 positifs. La densité des micro-vaisseaux tumoraux a également été quantifiée sous un microscope à l'aide du logiciel FIJI.

Les niches osseuses humanisées ont été fixées et incluses en paraffine. L'immunohistochimie a été réalisée sur des sections de 5 µm incubées avec un anticorps anti-PAN cytokératine humaine qui reconnaît spécifiquement les cellules tumorales humaines. Les coupes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire couplé à la HRP. Le marquage a été réalisé par la Plateforme Recherche Anatomopathologique (CLB, Lyon, France).

Des analyses d'histologie osseuse et d'histomorphométrie sur des coupes de tissus osseux, fixées en paraffine, ont été réalisées. Des coupes de 5 µm ont été colorées au trichrome de Goldner, puis les mesures histomorphométriques [volume osseux (BV) / volume de tissu (TV) et le volume tumoral (TB) / volume des tissus mous (STV)] ont été effectuées dans une zone standardisée de la métaphyse du tibia, située à 0,5 mm de la plaque de croissance, incluant l'os cortical et trabéculaire. Le rapport BV/TV représente le pourcentage de tissu osseux. Le rapport TB/STV représente le pourcentage de tissu tumoral.

4- 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 PRISM5. Les données ont été présentées sous forme de médiane ± 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).

III- Résultats

1- Invalidation du gène ROBO4 dans une lignée humaine de cancer du sein triple négative et ostéotrope

1-1- Génération des lignées cellulaires B02 CRISPR ROBO4 et B02 CRISPR CTL

Afin d'étudier l'implication du récepteur ROBO4 dans la dissémination et la formation de micro-métastases osseuses, nous avons invalidé le gène ROBO4 dans les cellules B02, par technologie de CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-cas9. Ce système a été initialement découvert comme moyen de défense immunitaire adaptatif, utilisé par des bactéries et Archaea, pour la dégradation de matériel génétique étranger de bactériophages. Chez ces organismes procaryotes, les loci *CRISPR* consistent en plusieurs répétitions espacées par des séquences appelées espaceurs et sont souvent adjacents aux gènes *Cas*, codant pour des endonucléases (Barrangou et al., 2007). Des études *in silico* ont ensuite mis en évidence que ces espaceurs présentent des homologies de séquences avec des génomes de bactériophages et de plasmides, et leurs présences rendent les bactéries résistantes à l'infection par ces phages. Ceci a alors permis aux chercheurs d'émettre l'hypothèse que les gènes *CRISPR* et *Cas* sont impliqués dans la production d'une immunité contre les éléments génétiques étrangers par un mécanisme d'interférence ARN (Makarova et al., 2006). En 2008, il a été démontré que cette défense antivirale chez les procaryotes implique la genèse d'un petit ARN guide (ARNg) d'une vingtaine de paires de base (pb), complémentaire à l'ADN étranger. La reconnaissance de l'ADN cible par cet ARNg en complexe avec les endonucléases Cas, se fait notamment par le biais d'adaptateurs qui sont les séquences PAM (Protospacer Adjacent Motif) (Brouns et al., 2008; Marraffini and Sontheimer, 2008). Ceci a ouvert une nouvelle voie d'ingénierie génomique avec le développement de systèmes CRISPR/Cas9 dans le but d'induire la perte (ou le gain) de fonction d'un gène étudié : la Cas9 produit une coupure double brin dans un locus spécifique grâce à un ARNg synthétique d'environ 20 pb ciblant la séquence codante du gène, elle-même précédée d'une séquence PAM 5'NGG (Figure 32). La coupure double brin active le système de réparation imprécis NHEJ (Non Homologous End Joining)

de la cellule engendrant des mutations de types indel (insertion ou délétion) et souvent l'apparition de codons stop prématurés dans la séquence codante du gène (Ran et al., 2013b, 2013a).

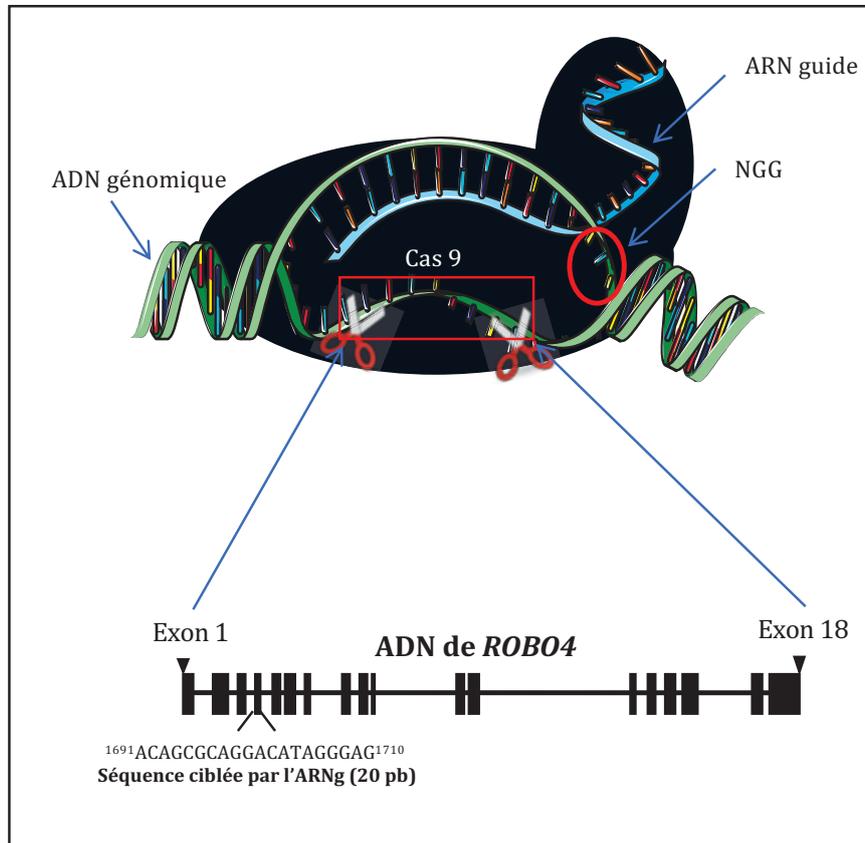


Figure 32: Représentation schématique du système CRISPR-Cas9 utilisé pour l'inactivation du gène *ROBO4*. *ROBO4* est un gène de 18 exons. L'ARNg a été conçu pour cibler l'exon 4 de *ROBO4* sur une séquence de 20 nucléotides (1691 à 1710 nucléotides). Numéro d'accèsion NCBI : gene ID 54538

La génération de cellules B02 KO *ROBO4* a été réalisée par transduction de cellules B02 parentales avec un vecteur lentiviral, pLentiCRISPR V2, permettant l'expression simultanée de la *Cas9* et de l'ARNg reconnaissant l'exon 4 de l'ADN génomique de *ROBO4* (pLentiCRISPR-*ROBO4*) (Figure 32). Comme expliqué précédemment, l'ARN guide se fixe au niveau de la séquence cible, ce qui permet à la *Cas9* d'exercer son rôle d'endonucléase puis au système de surveillance cellulaire d'effectuer une réparation aléatoire. Afin de disposer de cellules complètement invalidées en *ROBO4*, différents clones de B02 KO *ROBO4* ont été obtenus par dilution limite et ont été analysés.

La genèse de cellules B02 CTL a été réalisée par transduction avec le vecteur contenant une séquence « filler », qui ne contient pas d'homologie avec l'ADN cellulaire et par

ROBO4 est nettement diminué comparé aux cellules parentales mais, une petite quantité du récepteur est encore détectée alors que dans les deux populations clonales on observe une très forte disparition de la protéine (Figure 34 B). Ces résultats s'expliquent par l'hétérogénéité cellulaire de la population totale. Après la sélection antibiotique toutes les cellules contiennent un vecteur, il est toutefois possible que le système ARNg/Cas9 n'ait pas été fonctionnel dans toutes les cellules ou que la mutation soit parfois mono-allélique et par conséquent, que la protéine ROBO4 soit encore produite dans certaines d'entre elles. Ces données justifient la nécessité de la dilution limite pour obtenir des clones complètement inhibés en ROBO4. Cependant le western blot réalisé sur les clones KO ROBO4 présente une très faible détection à un poids moléculaire similaire de celui de ROBO4. Le système CRISPR-Cas9 agissant directement sur l'ADN génomique, aucune protéine ne devrait être produite dans ces populations clonales, nous avons donc émis l'hypothèse que ce marquage résultait d'une légère aspécificité de l'anticorps anti-ROBO4 utilisé.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons vérifié les mutations présentes dans l'ADN génomique des lignées génétiquement modifiées avec le vecteur pLentiCRISPR-ROBO4. Pour ce faire, les ADN de la population parentale, transduite totale et des différents clones ont été extraits, puis la région d'ADN génomique ciblée par l'ARNg a été amplifiée, grâce à des amorces spécifiques. Les produits d'amplification ont ensuite été clonés et séquencés. Les séquences obtenues issues de la population parentale ont été alignées avec celles présentes dans les différentes populations transduites. L'analyse de ces données démontre l'efficacité du système CRISPR/Cas9 avec des mutations au niveau de la région cible, identifiées dans tous les ADN séquencés issus des populations transduites avec le vecteur pLentiCRISPR-ROBO4.

Deux des séquences d'ADN extraites de la population totale hétérogène présentent deux mutations distinctes engendrant un codon stop prématuré (Figure 34 C et D). On remarque aussi qu'une autre mutation identifiée dans l'ADN de cette population n'induit pas de décalage du cadre de lecture et pourrait conduire à la production d'une protéine de poids moléculaire similaire à celui attendu pour ROBO4 et de même séquence avec une délétion de seulement 11 acides aminés (Figure 34 E). Dans ce cas, l'anticorps utilisé est capable de détecter une telle protéine. Ceci confirme l'hétérogénéité génomique au sein de cette population et permet de justifier la détection de protéine ROBO4 précédemment observée en western blot.

et un transcrite significativement moins abondant (Figure 35 A et B). Cette expérience confirme également que la transduction ne modifie ni l'expression ni la transcription de *ROBO4* dans la lignée B02 CTL, où les niveaux révélés sont similaires à ceux de la lignée parentale.

Afin de vérifier la spécificité du système CRISPR/Cas9 nous avons examiné si les niveaux d'expression des autres gènes *ROBO* sont affectés par la transduction du vecteur pLentiCRISPR-ROBO4 dans les cellules B02. Les analyses de RT-PCR quantitative démontrent que les taux de transcrits *ROBO1* et *ROBO2* sont similaires dans les trois lignées étudiées (Figure 35 C et D). De plus l'expression du gène *ROBO3* n'est détectée dans aucune des lignées. Ces données permettent de conclure que l'inactivation de *ROBO4* dans les cellules B02-KO n'a pas affecté l'expression des autres membres de sa famille, confirmant ainsi la spécificité de la méthode utilisée.

La suite de notre étude s'est portée sur les différents niveaux d'expression des interacteurs intracellulaires de ROBO4 décrits dans la littérature. Tout d'abord, l'interaction ROBO4-UNC5b en position *cis* au sein d'une même cellule a été décrite (Koch et al., 2011). La liaison UNC5b-ROBO4 permettrait l'activation du récepteur UNC5b par SLIT2 et la signalisation sous-jacente. De ce fait nous nous sommes interrogés sur une potentielle modulation de l'expression de ce récepteur suite à l'inhibition de ROBO4. Les résultats de RT-PCR quantitative indiquent un taux relatif inchangé de transcrits *UNC5B* dans les différentes conditions (Figure 35 E), démontrant que le gène n'est pas régulé en fonction de la présence de ROBO4 au sein des cellules B02. De même, il a été décrit que lorsque ROBO4 est inhibé dans les CSH, l'expression de *CXCR4* est stimulée pour compenser la perte du récepteur (Smith-Berdan et al., 2011). Des données transcriptomiques du laboratoire ont montré que la lignée ostéotrope B02 n'exprime que très faiblement *CXCR4*. C'est pourquoi nous avons examiné le taux de transcrits *CXCR4* dans les différentes lignées. Contrairement au phénomène observé dans les CSH, l'inhibition de ROBO4 dans les cellules B02 ne conduit pas à une augmentation de l'expression de *CXCR4*, en comparaison aux lignées contrôles (Figure 35 F). Enfin, une étude récente a démontré qu'au sein d'une même cellule endothéliale, la liaison de l'ANXA2 au récepteur ROBO4 est nécessaire à l'interaction de ROBO4 avec la paxilline. Les cellules B02 expriment fortement l'ANXA2, c'est pourquoi, en suivant le même raisonnement que précédemment, l'expression de son message a été quantifiée et ne semble pas être modulée par l'inactivation de ROBO4 dans les cellules B02 (Figure 35 G).

Ces résultats confirment également le fait que la transduction n'a pas affecté le profil génomique des cellules B02, étant donné, que l'expression des différents gènes est similaire entre les lignées B02-P et CTL.

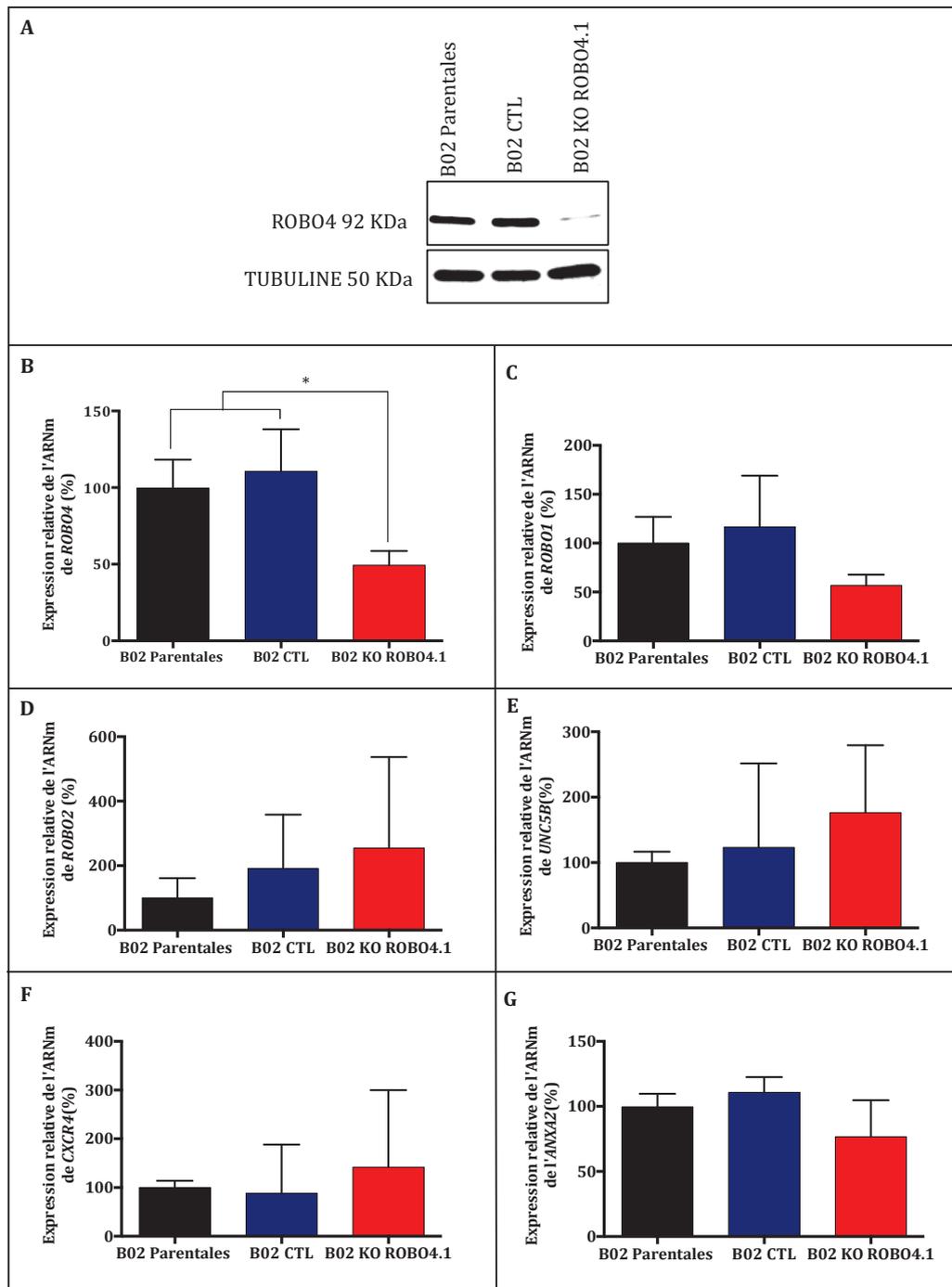


Figure 35: Conséquences de l'inhibition de ROBO4 sur l'expression de gènes associés au récepteur. L'inhibition de ROBO4 dans la lignée B02-KO en comparaison aux lignées B02-P et CTL a été montrée en (A) par western blot et en (B) par RT-qPCR. Les taux relatifs de transcrits en (C) *ROBO1*, en (D) *ROBO2*, en (E) *UNC5B*, en (F) *CXCR4* et enfin en (G) *ANXA2* ont été analysés et quantifiés par RT-qPCR.

Nous nous sommes également intéressés aux propriétés cellulaires intrinsèques afin d'examiner si l'inhibition de ROBO4 modifie les caractéristiques fonctionnelles des B02. Premièrement, la vitesse de prolifération des différentes lignées a été étudiée par incorporation de BrdU dans l'ADN pendant 16h. Ces expériences ont montré que l'absence de ROBO4 ne perturbe pas le cycle de division cellulaire étant donné que l'incorporation de BrdU est identique pour chacune des lignées d'intérêts (Figure 36 A).

L'activité à la fois pro- et anti-migratoire de ROBO4 dans les cellules endothéliales ayant été décrite nous avons examiné les conséquences de son inhibition sur les propriétés migratoires des cellules B02. Pour ce faire, un test de cicatrisation, aussi appelé « wound healing » a été réalisé. Après 24h d'incubation, les cellules ont été lavées au PBS, puis une cicatrice a été produite et du milieu basal ou complet a été ajouté dans chaque puits. Pendant 24h, une photo de la « plaie » a été prise au même endroit toutes les 5 minutes, pour le montage d'une vidéo afin de mesurer la vitesse de recouvrement de la « plaie » par les cellules tumorales. Ici, seules les photos à T0 et à T24 sont montrées. Lorsque les cellules ont été incubées dans du milieu sans SVF, elles n'ont pas migré. En revanche l'ajout de milieu complet a permis aux cellules de recouvrir une partie de la plaie à vitesse égale pour les différentes lignées analysées (Figure 36 B). Contrairement à son rôle dans les cellules endothéliales, ROBO4 ne module donc pas les capacités migratoires des cellules métastatiques B02.

Il a aussi été décrit que dans les cellules cancéreuses uroépithéliales de vessie la présence de ROBO4 induit une augmentation de la prise tumorale chez la souris (Li et al., 2015). Or, la capacité des cellules à former des tumeurs est reflétée par l'acquisition d'un phénotype invasif. C'est pourquoi nous avons examiné les propriétés invasives des cellules B02 en chambre de Boyden modifiée, coatée avec du matrigel. Après 20h d'incubation, les cellules ayant envahi l'implant ont été fixées, colorées et quantifiées. Lorsque ROBO4 est déplété dans les cellules B02, l'invasion cellulaire est réduite d'environ 30% comparé aux lignées parentale et CTL (Figure 36 C). ROBO4 semble donc augmenter le caractère invasif des cellules tumorales.

En conclusion, la caractérisation de ces lignées nous a montré que la transduction ne modifie pas les propriétés intrinsèques des cellules B02 CTL en comparaison à celles des B02-P. De plus l'inactivation du gène *ROBO4* a été caractérisée au niveau génomique (via le séquençage de la zone d'intérêt), au niveau transcriptomique mais aussi protéique. Les tests fonctionnels menés *in vitro*, ne montre pas de différence significative dans les capacités de prolifération cellulaire ou de migration. En revanche, le phénotype invasif des cellules B02 est altéré par la déplétion de ROBO4. L'ensemble de ces résultats suggère que la présence du récepteur dans les cellules de cancer de sein peut influencer la formation de tumeur orthotopique en favorisant l'invasion tissulaire des cellules B02.

2- Rôle du récepteur ROBO4 dans la formation de tumeurs primaires et secondaires *in vivo*

2-1- Tumorigenèse et invasion locale

Les résultats précédents montrant un défaut de la capacité d'invasion des cellules B02 invalidées en *ROBO4 in vitro*, nous ont conduit à étudier la formation de tumeurs primaires *in vivo*. Dans ce cadre, les cellules B02-P, B02 CTL et B02-KO ont été injectées de façon orthotopique dans la 4^{ème} glande mammaire de souris immunodéficientes BALB/C *nude*. Après 35 jours de croissance tumorale, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs résectionnées puis analysées.

Comme en témoignent les clichés présentés ci-dessous, la prise tumorale est fortement altérée chez les animaux inoculés avec les cellules B02-KO comparé aux souris injectées avec les B02-P ou B02 CTL (photos représentatives Figure 37 A). De même, le poids et le volume des tumeurs formées par les cellules B02-KO sont très significativement diminués comparé aux tumeurs composées de B02-P ou CTL (Figure 37 A).

Bien que la prolifération des différentes lignées génétiquement modifiées soit identique à celle observée chez les B02-P *in vitro*, l'index de prolifération des cellules cancéreuses au sein de la tumeur a été mesuré. Pour ce faire un marquage avec un anticorps anti-Ki67 humain, qui reconnaît donc les cellules B02 uniquement, a été réalisé sur les coupes de tumeurs incluses en paraffine. L'analyse a montré qu'il n'y a pas de différence de capacité de prolifération *in vivo* lorsque ROBO4 est inhibé dans les cellules B02, par comparaison aux lignées parentale et CTL (Figure 37 B).

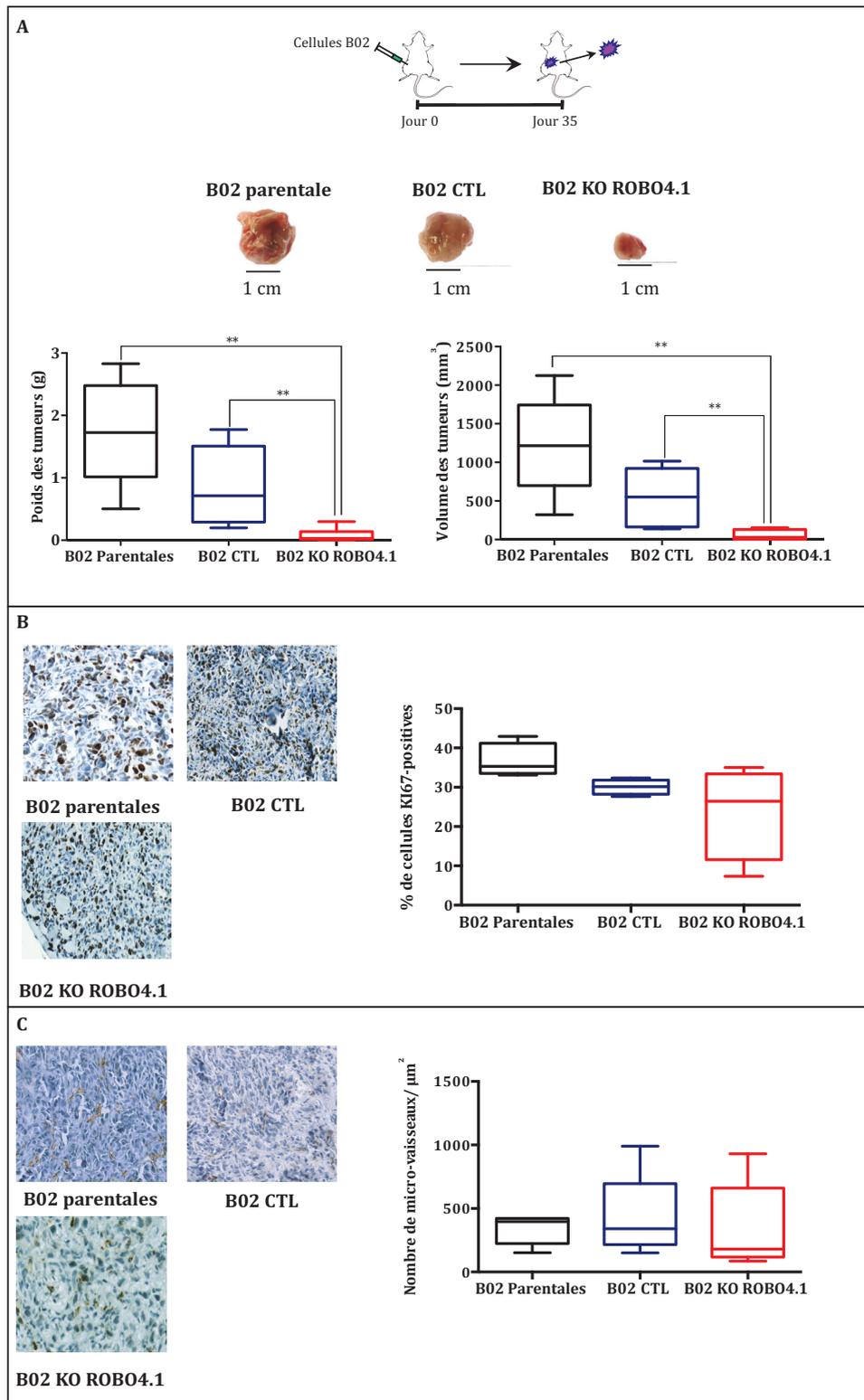


Figure 37 : ROBO4 est impliqué dans la formation de tumeurs mammaires primaires *in vivo*. (A) Les cellules B02 ont été inoculées en orthotopique dans des souris *nude*. Après 35 jours de croissance, les tumeurs ont été réséquées, pesées et le volume tumoral a été calculé. Des analyses d'IHC ont été réalisées sur des coupes tumorales pour déterminer en (B) l'index de prolifération des cellules B02 dans les tumeurs et en (C) la densité de micro-vaisseaux présents dans les tumeurs.

En parallèle, la densité de micro-vaisseaux détectés par l'anticorps anti-CD31 murin dans les tumeurs de B02 KO ROBO4.1 est équivalente à celle observée dans les tumeurs B02-P et B02 CTL (Figure 37 C).

Ceci suggère que la différence de taille des tumeurs des différents groupes, n'est donc pas la résultante d'une altération du cycle cellulaire ou de la néoangiogenèse dans le microenvironnement tumoral.

Cependant, l'expression de *ROBO4* dans les cellules B02 augmente la prise tumorale dans le modèle de xénogreffe murin. Ainsi, cette expérience démontre l'activité pro-tumorale du récepteur ROBO4 dans le développement de tumeurs primaires mammaires formées des cellules cancéreuses de statut hormonal triple négatif.

2-2- Implication du récepteur ROBO4 dans la formation de métastases osseuses

Par la suite, nous avons examiné si l'invalidation du gène codant de *ROBO4* réduit également le développement de tumeurs secondaires formées par les cellules B02, en particulier au niveau des métastases osseuses.

Pour ce faire les cellules B02-P, B02 CTL et B02-KO ont été inoculées dans l'artère caudale de souris BALB/C *nude*, immunodéficientes. Pendant toute la durée du protocole, les animaux ont été suivis chaque semaine pour s'assurer du respect des points limites et nous avons donc analysé :

- La croissance tumorale par mesure de bioluminescence (les cellules exprimant la luciférase)
- La lyse osseuse par radiographie

L'invalidation de ROBO4 dans les cellules B02 diminue le signal de bioluminescence dès lors qu'il est détectable (Figure 38 A), indiquant ainsi, une réduction de la masse tumorale présente dans l'os des animaux injectés avec les cellules B02-KO. Ces résultats sont confirmés par le traitement des données radiographiques mettant en évidence une diminution des surfaces ostéolytiques, dès leur apparition, dans les membres postérieurs

des souris injectées avec les cellules B02-KO comparés à celles observées dans les groupes contrôles (Figure 38 B).

Après 21 jours de protocole, les animaux ont été sacrifiés et les membres inférieurs ont été scannés *ex-vivo* puis inclus en paraffine pour l'obtention de données histologiques. Après reconstruction des images de CT-scan récoltées, le BV/TV qui représente le ratio entre le volume osseux (Bone Volume) et le volume tissulaire dans l'os (Tissu Volume) a été mesuré. Une destruction massive de l'os entraîne une diminution du volume osseux et par conséquent une réduction du ratio BV/TV. En effet, les souris inoculées avec les cellules B02-KO présentent un BV/TV significativement augmenté, ce qui traduit une ostéolyse largement réduite (Figure 38 C).

Enfin, les coupes histologiques colorées au trichrome de Goldner ont permis d'identifier la masse tumorale présente au sein de la cavité osseuse et les structures présentes dans l'os. Cette coloration met en évidence l'os minéralisé en vert, les cellules de la moelle osseuse et tumorales en marron et le muscle en rouge comme le montre les photos représentatives présentées ci-dessous, où la formation tumorale est facilement observable (Figure 38 D). Par la suite, l'analyse histomorphométrique a été réalisée, la charge tumorale présente dans les tibias de chacune des souris a été quantifiée, rapportée au volume tissulaire total, dans lequel le volume des travées osseuses a été soustrait, et est exprimée en pourcentage (selon la formule suivante : $\text{Volume de la métastase} / (\text{volume tissulaire} - \text{volume osseux}) \times 100$). Une diminution significative de la prise tumorale dans l'os lorsque ROBO4 est absent des cellules tumorales est observable, ce qui concorde avec la diminution de l'ostéolyse rapportée précédemment (Figure 38 D).

Cette expérience a mis en évidence l'importance du récepteur ROBO4 dans la formation de métastases osseuses par les cellules B02 et l'apparition de lésions ostéolytiques *in vivo*. De plus, il a été démontré que la stimulation par du TNF- α permet la sécrétion d'IL-6 par les cellules endothéliales seulement lorsqu'elles expriment ROBO4. La libération d'IL-6 permet la stimulation des monocytes circulants (Shirakura et al., 2018). Cette cytokine étant une molécule pro-ostéoclastique, nous avons examiné l'expression du gène codant l'*IL6* dans les cellules tumorales B02 invalidées ou non en *ROBO4*, avec ou sans stimulation par le TNF- α .

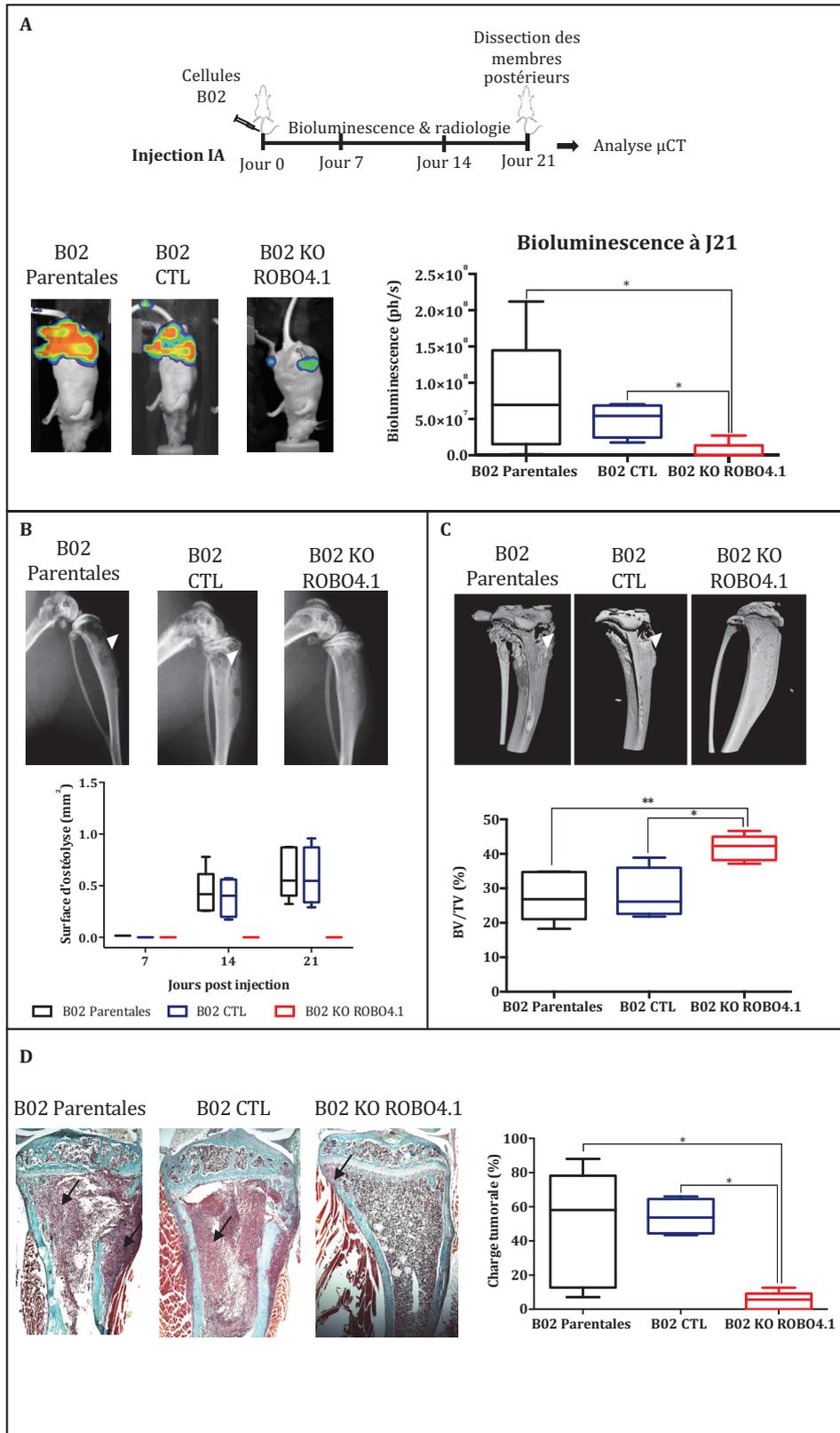


Figure 38 : ROBO4 est impliqué dans la formation de lésions ostéolytiques. Les cellules B02 ont été injectées dans la circulation sanguine par voie intra-artérielle. La colonisation osseuse a été suivie par bioluminescence (A) et par radiographie (B). (C) Les os ont été scannés *ex-vivo* et le BV/TV quantifié. (D) Les coupes de tissus osseux ont été colorées au trichrome de Goldner et la charge tumorale analysée. Des images représentatives de chaque groupe sont présentées (à J21).

L'analyse des données obtenues par RT-PCR quantitative démontre une diminution significative d'expression de l'*IL6* lorsque *ROBO4* est absent des cellules B02 sans stimulation par le $TNF-\alpha$. Une exposition de 24h au $TNF-\alpha$ à 10 ng/mL induit une importante augmentation de l'expression de l'*IL-6* dans les cellules B02-P et CTL. En revanche, cette augmentation est significativement altérée lorsque les cellules n'expriment pas *ROBO4* (Figure 39).

Ces résultats préliminaires suggèrent un rôle du récepteur *ROBO4* dans l'activation des ostéoclastes, pouvant expliquer la forte réduction d'ostéolyse observée dans les pattes de souris injectées les cellules B02-KO. D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer ce résultat.

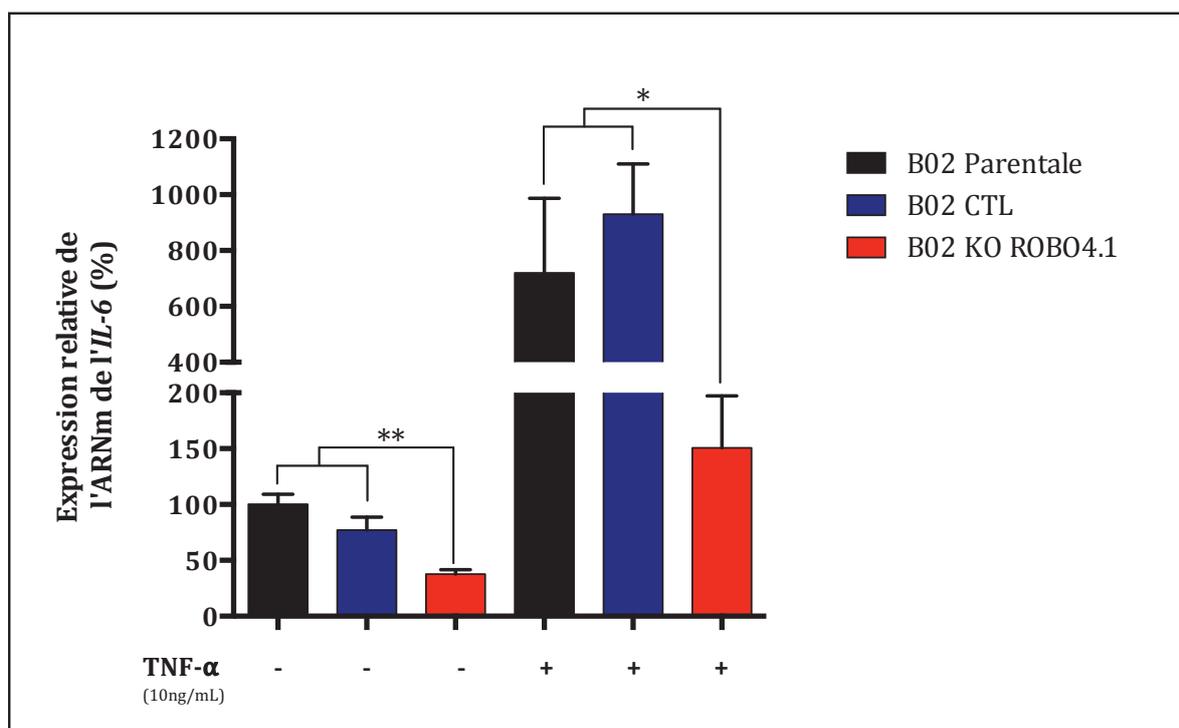


Figure 39 : Expression relative de l'IL-6 dans les cellules métastatiques B02 exposées ou non au $TNF-\alpha$. L'inhibition de *ROBO4* dans les cellules B02 induit une chute significative de l'expression de l'IL-6

2-3- ROBO4 est impliqué dans les phases précoces de formation de micro-métastases osseuses

ROBO4, par coopération avec CXCR4, participe au maintien des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Smith-Berdan et al., 2011). De plus il est maintenant admis que les cellules tumorales résidentes de la niche hématopoïétique adhèrent aux cellules du microenvironnement osseux grâce à des mécanismes similaires à ceux employés par les CSH. C'est pourquoi, nous avons examiné si ROBO4 participait à l'ancrage osseux et à la survie des cellules tumorales B02 dans l'os dès les étapes précoces de colonisation. Pour ce faire nous avons procédé à trois expériences distinctes.

Dans la première expérience, les cellules tumorales ont été inoculées par une injection intra-tibiale (IT) directement dans la cavité osseuse de souris immunodéprimées BALB/C *nude*. Les souris ont été sacrifiées 15 jours après l'injection et la moelle osseuse a été mise en culture sous sélection antibiotique le temps nécessaire à l'apparition des micro-colonies de cellules tumorales résistantes à l'antibiotique. Ces micro-colonies sont le reflet des micro-métastases en cours de formation dans l'os au moment de la mise à mort. Suite à la coloration des colonies formées, le nombre de micro-métastases a été dénombré. L'inhibition de ROBO4 dans les cellules B02 provoque une diminution de 75% du nombre de souris présentant des micro-métastases par rapport aux animaux injectés avec les cellules B02-P (Figure 40 A). Ceci démontre le rôle de ROBO4 dans l'ancrage des cellules métastatiques aux composants cellulaires ou matricielles de l'environnement osseux.

Dans la deuxième expérience, les cellules B02-P et B02-KO ont été injectées directement dans la circulation sanguine dans l'artère caudale de souris immunodéprimées BALB/C *nude*. Dans cette expérience, les souris ont été sacrifiées 7 jours après l'injection et la moelle osseuse a été mise en culture sous sélection antibiotique pendant 17 jours. Les cellules ont été fixées et colorées, de façon similaire à l'expérience précédente. Nous avons observé une forte réduction du nombre de micro-colonies formées par les cellules B02-KO : environ 4 fois par comparaison au nombre des colonies composées de cellules B02-P. De plus, la surface des micro-colonies issues des cellules B02-P est 7 fois supérieure à la taille de celles formées par les cellules B02-KO (Figure 40 B). En conclusion, les données de cette expérience sont en accord avec celles obtenues après l'inoculation IT et

démontrent l'implication du récepteur ROBO4 dans l'ancrage des cellules tumorales dans la moelle osseuse. Cette expérience suggère également, un impact de ROBO4 dans le processus de colonisation osseuse par des cellules tumorales circulantes.

Afin de visualiser les étapes précoces de la colonisation *in vivo*, nous avons marqué les cellules au DiD préalablement à leur injection par voie intra-artérielle. Le DiD est un colorant lipophile qui s'incorpore dans les membranes puis diffuse latéralement pour colorer l'intégralité de la cellule. Il est souvent utilisé comme « traceur cellulaire » *in vivo*, pour suivre le devenir cellulaire sur le long terme. Ici, son utilisation a permis d'examiner l'implantation des cellules tumorales (rouges) dans le microenvironnement osseux 5 jours après l'injection. Pour ce faire les membres postérieurs des souris ont été extraits et coupés de façon longitudinale afin d'exposer la moelle osseuse. Par microscopie confocal/bi-photonique, nous avons pu visualiser les cellules cancéreuses, en rouge à une longueur d'onde de 633 nm, ainsi que le réseau de fibres de collagènes en bleu (il génère des secondes harmoniques lui permettant d'être détecté à une longueur d'onde d'environ 450 nm visible en bleu après excitation à 900 nm), sur une profondeur de 70 μm (photos représentatives Figure 40 C). Les micro-métastases présentes dans l'os ont été dénombrées et la surface de ces colonies a été rapportée à la surface osseuse en question. Le nombre et le volume des micro-métastases osseuses présentes dans les tibias des souris injectées avec les cellules B02-KO sont significativement diminués par comparaison aux animaux injectés avec les B02-P (Figure 40 C). En accord avec les données précédemment décrites, cette expérience prouve que la colonisation osseuse précoce est impactée par l'inhibition de ROBO4 dans les cellules B02.

L'ensemble de ces résultats démontre que ROBO4 est un acteur majeur de l'envahissement osseux par les cellules métastatiques de cancer du sein, impliqué dès les étapes précoces de la colonisation. Ce récepteur cellulaire pourrait intervenir dans la survie des cellules tumorales dans l'os et éventuellement dans la circulation sanguine mais également dans l'interaction des cellules B02 avec les différents composants du microenvironnement osseux.

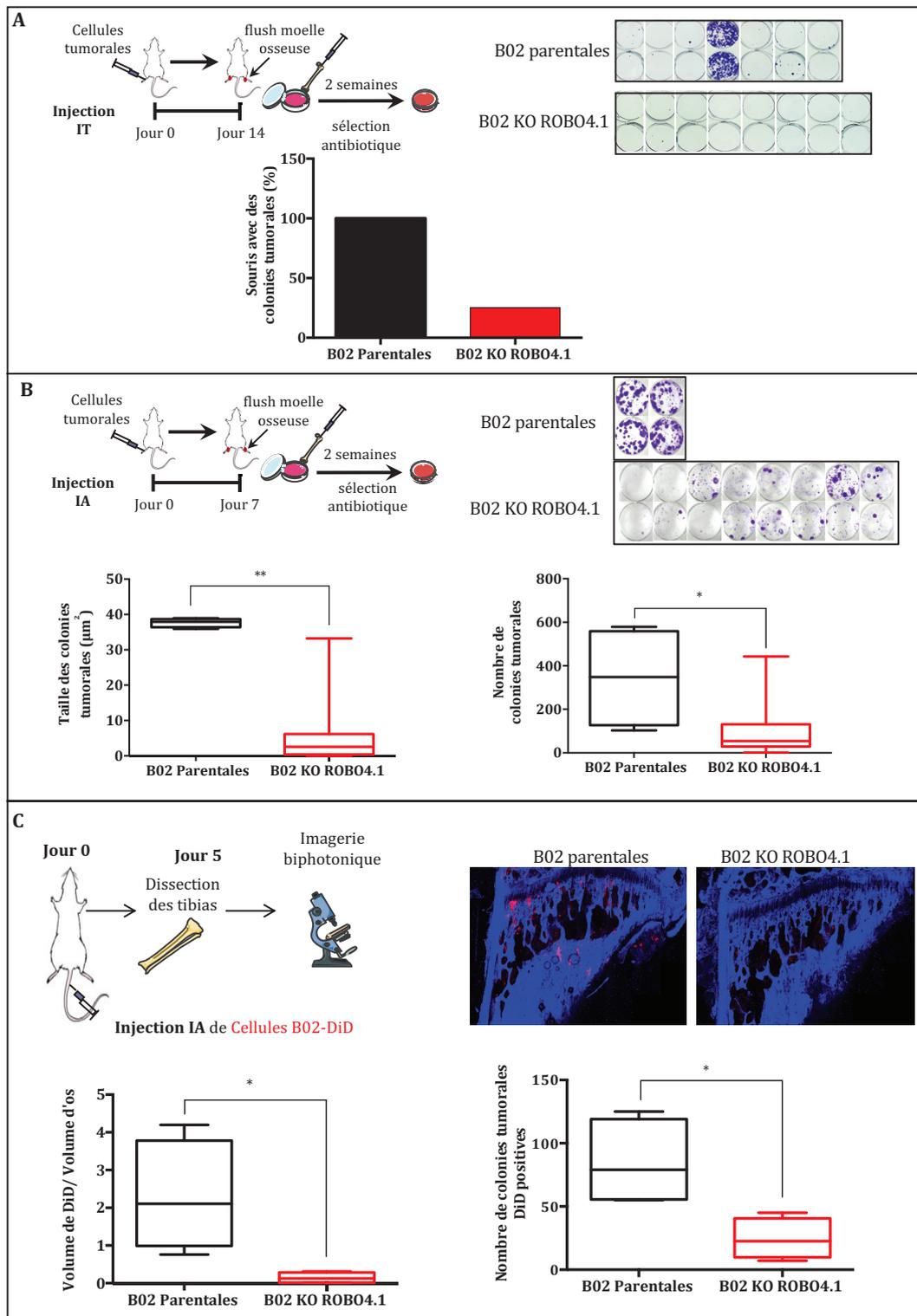


Figure 40 : ROBO4 est essentiel à la formation de micro-métastases osseuses. (A) Les cellules B02 ont été inoculées dans la cavité tibiale de souris *nude*. Les souris ont été sacrifiées 14 jours après l'injection et les membres inférieurs ont été émincés pour la mise en culture de la moelle osseuse sous sélection blastocidine pendant 14 jours. (B) Les cellules ont été injectées dans l'artère caudale de souris *nude*. Les souris ont été sacrifiées après 7 jours de protocole puis la moelle osseuse a été mise en culture comme précédemment. (C) Les cellules colorées au DiD ont été injectées en IA et les souris sacrifiées 5 jours après. La moelle osseuse a été imagée par microscopie confocale/bi-photon puis le nombre et la surface de colonies DiD positives ont été quantifiés.

2-4- L'expression de ROBO4 par les cellules B02 est nécessaire à la colonisation d'os ectopique humanisée dans des souris immunodéficientes

a- Mise au point du modèle expérimental

Dans un travail collaboratif avec l'équipe du Dr. UZAN (UMR-S 1197), nous avons développé un modèle de niche osseuse humanisée sous cutanée, injectée au niveau de la face dorsale de souris immunodéficientes NOD/SCID âgées de 4 semaines. Cet os ectopique a été réalisé par injection sous cutanée d'un mélange composé de poudre d'hydroxyapatite, de calcium et de CSM humaines.

Des tests préliminaires menés dans le laboratoire montrent que 6 semaines après l'injection de ce mélange chez la souris, de l'os néoformé apparaît avec une structure lamellaire (en vert) et de l'irrigation sanguine (en rouge), comme on le voit avec le marquage de Goldner sur des coupes à 8 semaines post injection (Figure 41 A). Les premiers tests étant réalisés sur des souris EGFP, l'examen de l'implant en ultra-violet a permis de nous assurer que cet os est bien formé par des cellules humaines (grâce aux CSM humaines implantées), et non pas, colonisé par des cellules murines, étant donné que l'os ainsi formé ne fluoresce pas (Figure 41 B).

b- Les cellules tumorales B02 colonisent l'implant ectopique humanisé

Suite à ces mises au point, nous avons alors injecté les cellules tumorales B02, humaines et ostéotropiques, invalidées ou non en ROBO4 avec 2 objectifs distincts :

- déterminer si des cellules humaines vont préférentiellement coloniser de l'os ectopique humanisé, de l'os murin ou les deux,
- déterminer si l'expression de ROBO4 influence cette colonisation.

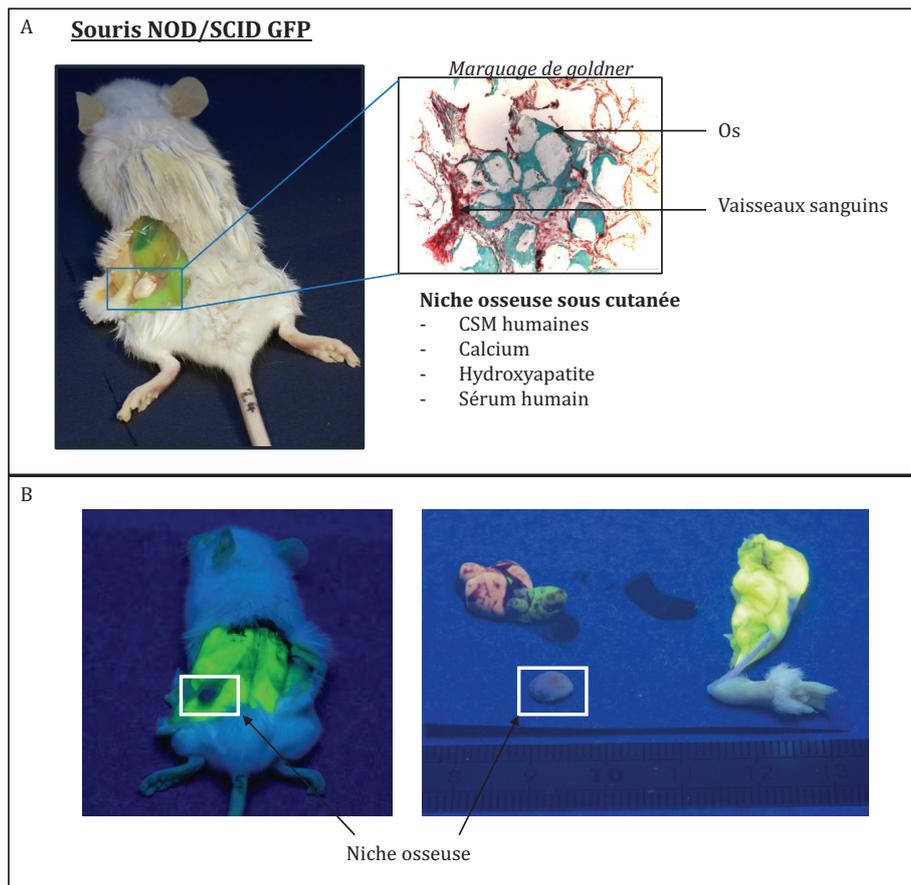


Figure 41 : Implantation de la niche osseuse humanisée *in vivo* chez la souris Balb/c NOD/SCID. (A) Observation de l'implant en sous-cutané et après marquage de Goldner réalisé sur des coupes 8 semaines après l'implantation. En (B), des tests préliminaires avec des souris EGFP sur plaque UV ont été réalisés afin d'observer la fluorescence de l'implant à 8 semaines.

Dans une première expérience, les cellules B02-P et KO ont été injectées par voie artérielle dans la queue des souris implantées depuis 6 semaines avec deux biomatériaux. Chaque semaine, la colonisation osseuse a été suivie par bioluminescence jusqu'au sacrifice 30 jours après l'injection des cellules tumorales. L'analyse des données obtenues met en évidence un signal de bioluminescence situé au niveau des implants. De plus la puissance de ce signal est réduite lorsque les cellules B02 n'expriment pas *ROBO4* (Figure 42 A). Ceci suggère que les cellules métastatiques humaines ont plus d'affinité pour l'os humanisé que pour l'os murin. De plus, la présence de *ROBO4* dans les cellules B02 accroît la colonisation de l'os ectopique.

Afin de s'assurer que l'implant humanisé est envahi par les cellules tumorales, les niches osseuses ont été incluses en paraffine et analysées par immunohistochimie. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la PAN-cytokératine humaine qui marque spécifiquement les

cellules tumorales nous a permis de montrer que les cellules B02 colonisent cet os humanisé. De plus, le marquage est extrêmement faible dans les coupes de niches des souris injectées avec les cellules KO ROBO4 ce qui confirme le rôle majeur de ROBO4 dans la dissémination osseuse (Figure 43 B).

Le marquage TRAP réalisé marque en violet les ostéoclastes présents dans la niche osseuse humanisée. Ceci a un double avantage. Premièrement, la présence d'ostéoclastes prouverait que cet implant est une structure dynamique, en renouvellement à l'instar de l'os. Deuxièmement, au vu du défaut d'expression de l'*IL6* dans les cellules B02-KO, il est probable que le nombre d'ostéoclastes résidant dans l'os ectopique soit différent entre les deux groupes. Comme attendu les niches implantées sont positives au TRAP ce qui démontre que les cellules murines de la lignée monocyttaire sont capables de le coloniser et de recevoir les signaux menant à leur différenciation ostéoclastique et créant une structure dynamique avec une activité de résorption. De plus le nombre d'ostéoclastes TRAP positifs apparaît nettement augmenté lorsque les cellules B02 expriment *ROBO4* (Figure 43 C), ce qui est en accord avec un potentiel rôle pro-ostéoclastique du récepteur. Cette expérience a permis de valider notre modèle de niche osseuse humanisée : les cellules impliquées dans le remodelage osseux sont présentes et les cellules tumorales humaines B02 sont capables de l'envahir.

Par la suite, les cellules B02-P, B02 CTL et B02-KO ont été injectées par voie artérielle dans la queue des souris implantées de la façon décrite ci-dessus (Figure 43 A). Comme précédemment, la colonisation osseuse a été suivie par bioluminescence chaque semaine. Les analyses du signal de bioluminescence ont montré que les cellules B02-P et CTL colonisent bien la niche osseuse humanisée à défaut de coloniser les os des membres postérieurs murins. En accord avec les observations préliminaires, la délétion de ROBO4 dans cellules B02 induit une décroissance du signal de bioluminescence (Figure 43 B). Ces données confirment une attraction préférentielle des cellules B02 pour des composants humains et l'implication de ROBO4 dans colonisation osseuse.

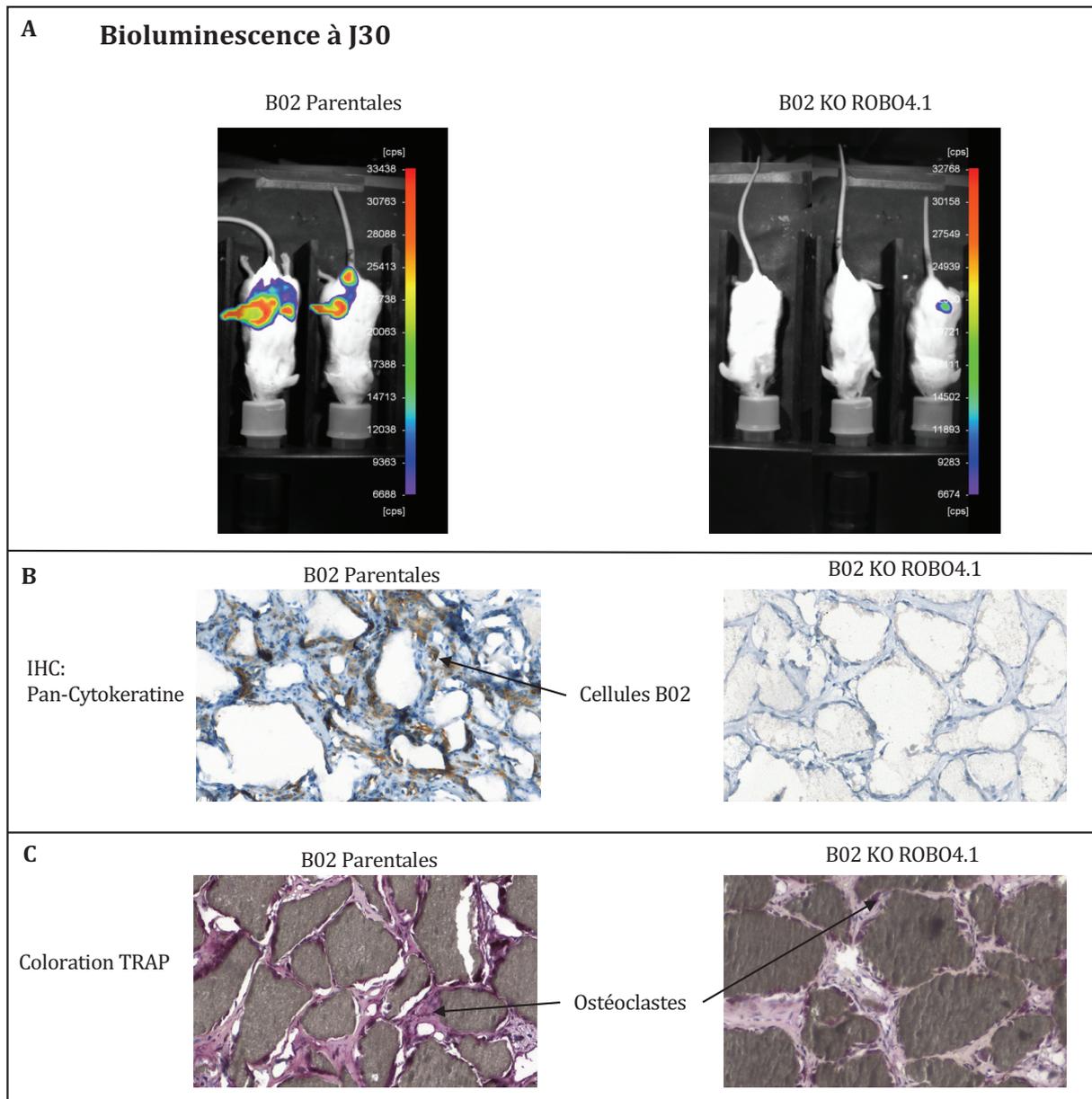


Figure 42 : Validation du modèle de niche osseuse humanisée en tant qu'os dynamique et attractif pour les cellules métastatiques. Les cellules B02 ont été injectées dans l'artère caudale de souris NOD/SCID implantées avec 2 biomatériaux depuis 6 semaines. (A) Le signal de bioluminescence émis par les cellules tumorales a été mesuré et semble localisé au niveau de l'implant osseux. Les souris ont été sacrifiées et les niches récoltées pour préparation histologique. (B) Un marquage avec un anticorps anti-PAN-cytokératine humaine a permis de mettre en évidence la colonisation de l'implant ectopique par les cellules tumorales B02 lorsque ces dernières expriment *ROBO4*. (C) Un marquage TRAP a également été réalisée et montre la présence d'ostéoclaste dans les niches osseuses.

Afin de s'assurer que les cellules B02 ont bien colonisé l'implant osseux, les niches ont été prélevées *post mortem* et le signal de bioluminescence mesuré. Pour toutes les lignées injectées on peut voir des niches émettant de la bioluminescence ce qui confirme une invasion par les cellules tumorales, même en l'absence de *ROBO4* (Figure 43 C). Ceci

indique que l'absence de ROBO4 ne modifie pas le tropisme vers un composant humain mais provoque un défaut de survie et/ou de colonisation de l'organe secondaire.

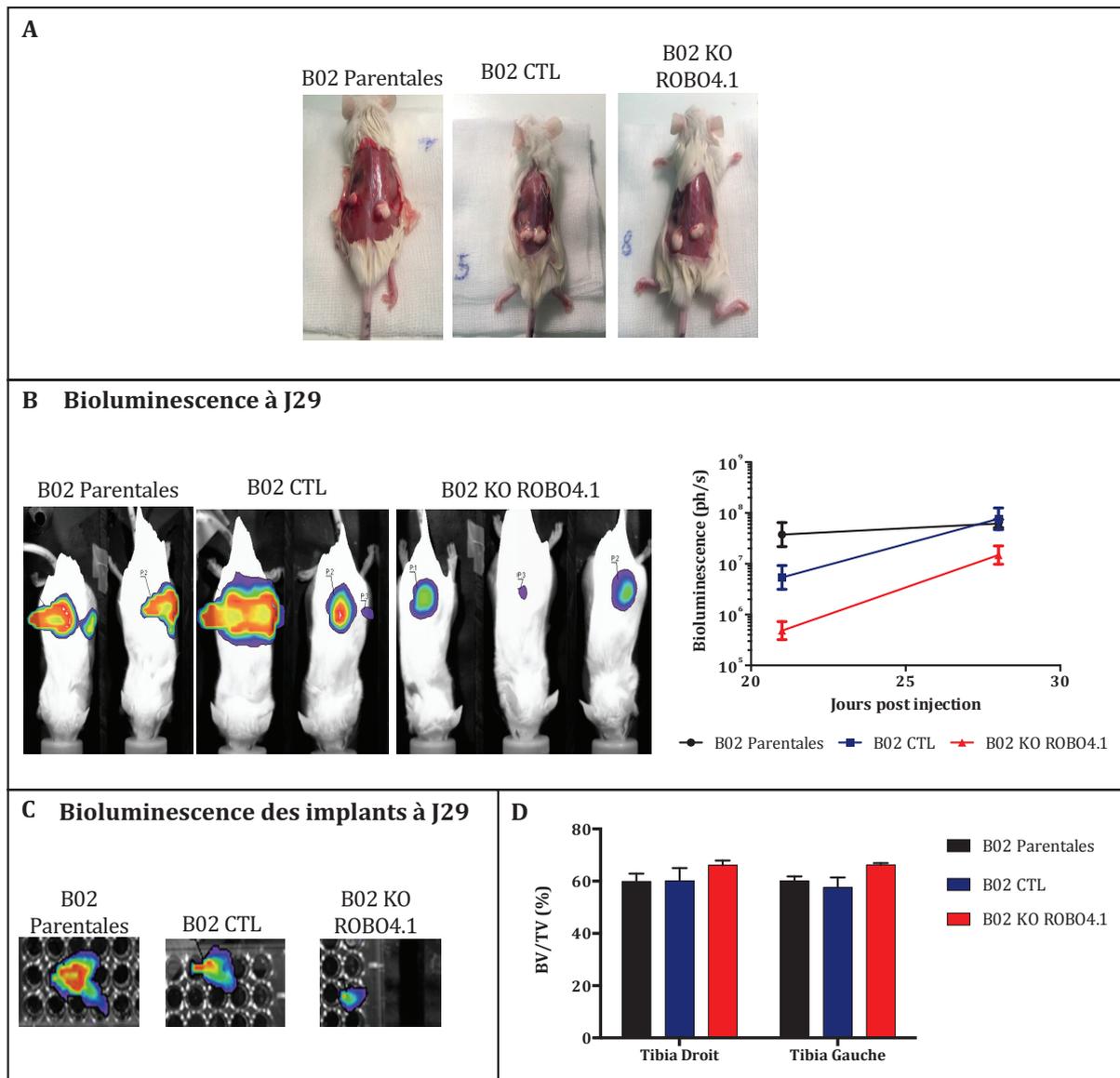


Figure 43 : ROBO4 est impliqué dans la colonisation d'os ectopique humanisée par les cellules B02. (A) Les souris ont été implantées avec 2 niches osseuses ectopiques. Lors du sacrifice à J29, on peut voir des implants bien vascularisés. (B) La colonisation a été étudiée par suivi de bioluminescence une fois par semaine jusqu'au jour du sacrifice. (C) Le signal de bioluminescence a été mesuré dans les niches osseuses le jour du sacrifice. (D) Les membres inférieurs des souris ont été disséqués et scannés pour mesurer le BV/TV grâce à des analyses de μ CT.

Enfin dans l'hypothèse que certaines cellules tumorales aient quand même colonisé l'os murin, les membres postérieurs ont été récupérés et les tibias scannés *ex vivo* afin de mesurer la lyse osseuse. Lors des expériences précédentes, nous avons démontré que 3

semaines après l'injection des cellules B02, les souris présentent de grandes plages de lyse et un BV/TV très bas, de l'ordre de 25% (cf paragraphe 2-2-). Ici, le sacrifice a été réalisé 4 semaines après l'injection, donc si les cellules métastatiques ont colonisé les os des pattes arrières, une certaine étendue de lyse devrait être observable. Les tibias de souris inoculées avec les lignées B02-P et B02 CTL ne présentent pas un BV/TV significativement plus faible que celui quantifié dans les os d'animaux injecté avec les B02-KO (Figure 43 D). Ces résultats montrent que les cellules B02 vont coloniser préférentiellement la niche osseuse humanisée.

L'ensemble de ces expériences confirme que les cellules B02 présentent un tropisme préférentiel vers un composant osseux humanisé. De plus, à l'instar des expériences précédentes, ROBO4 favorise la survie des cellules B02 dans le sang et/ou dans l'organe secondaire mais peut également être impliqué dans l'ancrage des B02 dans la niche osseuse ectopique. Enfin, la présence de cellules tumorales exprimant *ROBO4* favoriserait la différenciation ostéoclastique.

2-5- L'anticorps bloquant anti-ROBO4 affecte la colonisation osseuse

Lors de sa thèse, Lise Clément-Demange a démontré l'activité bloquante d'un anticorps commercial polyclonal anti-ROBO4. En effet, le traitement des cellules B02 par cet anticorps avant une injection intra-tibiale induit une réduction du nombre de micro-métastases osseuses *in vivo*. Cependant, aucune expérience d'injection directe dans la circulation sanguine avec utilisation de cet anticorps n'avait été menée. C'est pourquoi nous avons décidé d'injecter les cellules B02 parentales pré-incubées avec ce dernier dans l'artère caudale de souris.

a- Colonisation de la niche osseuse

Comme dans l'expérience décrite ci-dessus, les cellules ont été inoculées dans la circulation sanguine, 6 semaines après la mise en place sous cutanée des composants nécessaires à la formation de l'implant, dans des souris NOD/SCID. Au préalable, elles

avaient été incubées une heure sous agitation, avec de l'anticorps isotypique contrôle (une immunoglobuline G, IgG à 100 µg/mL), ou l'anticorps anti-ROBO4 (à 100 µg/mL) ou avec du PBS.

Le suivi de bioluminescence réalisé chaque semaine pendant un mois a mis en évidence un signal fortement réduit lorsque les cellules sont traitées avec de l'anticorps anti-ROBO4 (Figure 44) par rapport aux cellules traitées avec du PBS ou par de l'isotype contrôle (qui lui ne modifie pas le signal en comparaison des cellules témoins). De plus, la décroissance de bioluminescence suite au traitement avec l'anticorps bloquant est visible dès la détection des premiers signaux.

Ceci indique que le ciblage de ROBO4 dans les cellules tumorales B02 conduit à une forte diminution de la colonisation de l'implant osseux humanisé.

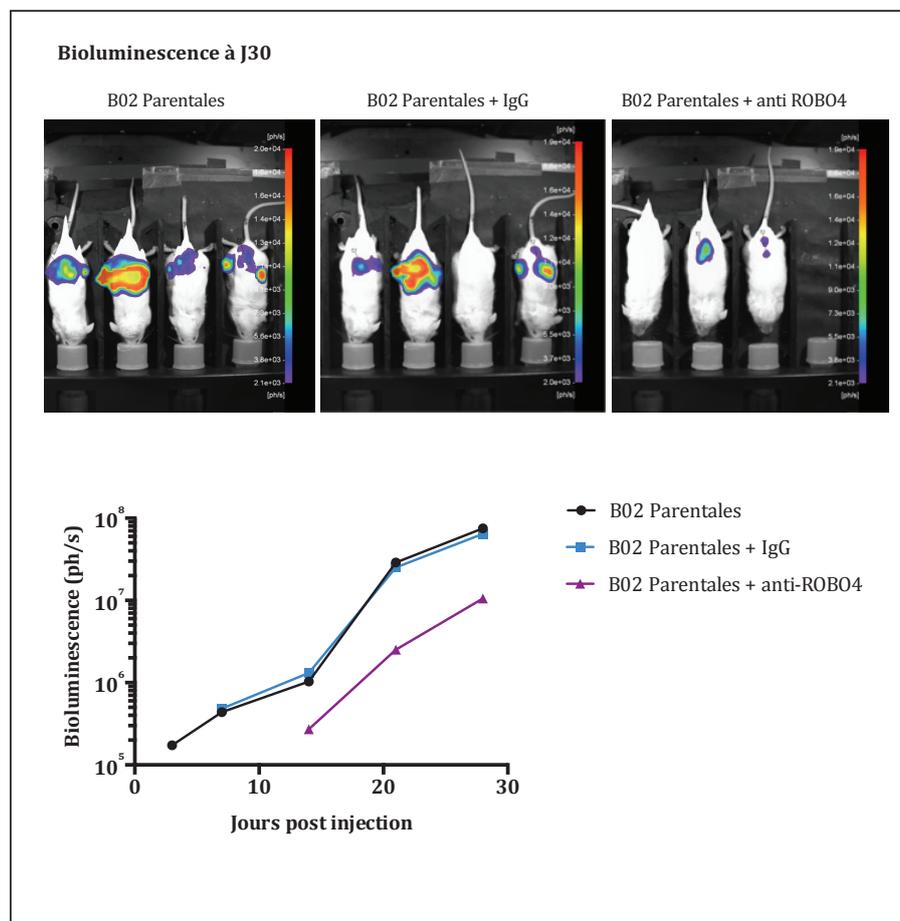


Figure 44 : L'inhibition de ROBO4 dans les cellules B02 par utilisation d'un anticorps bloquant diminue la colonisation de la niche osseuse humanisée. Un suivi des souris par bioluminescence a été réalisé chaque semaine pendant 30 jours. L'analyse des résultats montre une importante diminution du signal chez les souris injectées avec les cellules B02 incubées dans du PBS contenant 100 µg/mL d'anticorps anti-ROBO4. Les photos de la bioluminescence de toutes les souris du protocole sont montrées.

b- Colonisation métastatique par les cellules MDA-MB-231

Nous nous sommes ensuite demandé si l'inhibition de ROBO4 affecte également la dissémination métastatique dans d'autres organes secondaires tels que les poumons. Les cellules humaines de cancer du sein MDA-MB-231 expriment *ROBO4* et sont connues pour être métastatiques, sans tropisme particulier. C'est pour cette raison que nous les avons choisies pour être injectées dans l'artère caudale de souris BALB/C *nude* âgées de 6 semaines.

Comme précédemment, les cellules ont été incubées une heure sous agitation avec un anticorps bloquant anti-ROBO4 ou une IgG avant l'injection IA. Chaque semaine un suivi de bioluminescence a été réalisé et a mis en évidence que comme dans les cellules B02, l'inhibition de ROBO4 dans la lignée cellulaire MDA-MB-231, induit une forte diminution du signal bioluminescent comparé au groupe contrôle. En revanche, dans les deux groupes, aucun signal n'a été détecté dans les poumons (Figure 45). Pour vérifier si ces poumons ont été colonisés malgré l'absence de bioluminescence, ils ont été mis en culture sous sélection blasticidine pendant 15 jours. Les résultats obtenus sont en accord avec les données de bioluminescence car, aucun des deux groupes ne présentent de micro-colonies métastatiques pulmonaires (données non montrées).

En conclusion, cette expérience démontre que l'inhibition de ROBO4 affecte la capacité des cellules à envahir et/ou survivre dans l'environnement osseux, pas uniquement dans un modèle ostéotrope. Cependant, nous n'avons pas pu déterminer si le rôle de ROBO4 est ostéotrope ou si son inhibition affecte la dissémination métastatique en général.

Les résultats obtenus dans les différentes expériences réalisées *in vivo* permettent de conclure que le récepteur membranaire ROBO4 est impliqué dans la colonisation osseuse par les cellules tumorales. La présence de *ROBO4* pourrait favoriser la survie dans la circulation sanguine et/ou dans l'environnement osseux mais aussi l'ancrage des cellules B02 avec les composants osseux.

Par conséquent, ces données nous ont conduit à examiner le rôle de ROBO4 dans les mécanismes mis en jeu lors de la colonisation de la moelle osseuse par les cellules B02.

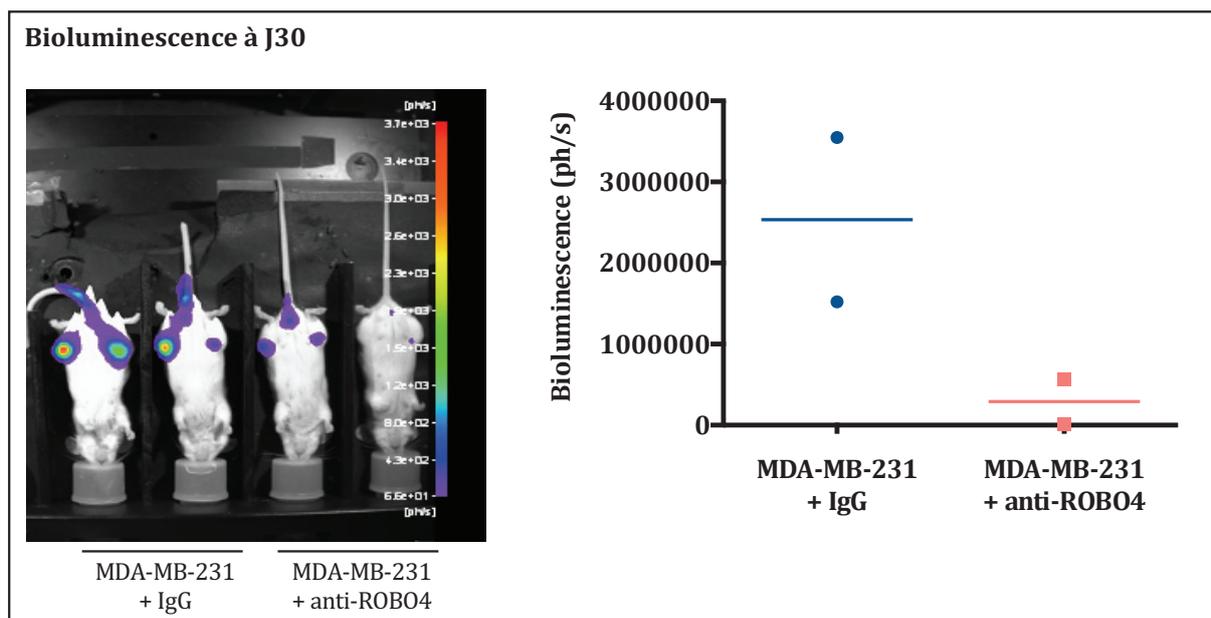


Figure 45 : L'inhibition de ROBO4 dans les cellules MDA-MB-231 par utilisation d'un anticorps bloquant diminue la dissémination osseuse. Un suivi des souris par bioluminescence a été réalisé chaque semaine pendant 30 jours. L'analyse des résultats montre une importante diminution du signal chez les souris injectées avec les cellules MDA-MB-231 incubées avec l'anticorps anti-ROBO4. Les photos de la bioluminescence de toutes les souris du protocole sont montrées.

3- Étude de l'interaction des cellules tumorales B02 avec des composants du microenvironnement osseux : implication du récepteur ROBO4 dans ces interactions

Comme nous l'avons vu précédemment, ROBO4 intervient dans le maintien des CSH dans la niche hématopoïétique et est également fortement impliqué dans l'intégrité des jonctions cellulaires dans les modèles endothéliaux. De ce fait nous nous sommes tout d'abord interrogés sur les conséquences de la perte de ROBO4 dans l'interaction des cellules B02 avec les composants de la moelle osseuse.

3-1- Interaction des cellules B02 avec les composants de la matrice extracellulaire osseuse

La matrice osseuse est majoritairement composée de collagène fibrillaire de type I et de fibronectine. Les cellules cancéreuses, une fois dans l'os vont, entre autres, s'ancrer à ces fibres. C'est pourquoi nous avons réalisé des tests d'adhérences sur ces protéines matricielles, afin de mimer l'attachement des cellules B02, exprimant ou non le récepteur ROBO4, sur les matrices.

Les cellules B02-P, CTL et KO ont été diluées dans du milieu basal puisensemencées dans des puits coatés avec du collagène de type I humain. Les cellules ont été fixées et colorées par ajout d'une solution de cristal violet contenant du méthanol, 5 min, 15 min, 30 min puis 1h après ensemencement. Le cristal violet a ensuite été dissous par de l'acide acétique et la DO mesurée à 570 nm afin de quantifier les cellules ayant adhéré aux fibres de collagène (Figure 46 A). Dès 5 min, on observe une tendance à l'inhibition de l'adhérence cellulaire suite à la déplétion de ROBO4. Aux temps 15 et 30 min, la perte d'adhérence des cellules B02-KO devient significative comparé aux deux lignées contrôles. Après une heure d'incubation la différence d'adhérence est toujours présente mais de façon moins importante, suggérant que les cellules KO ROBO4 ont réussi à « compenser » en partie, leur défaut d'adhérence au collagène au cours du temps.

La même expérience a été réalisée sur des plaques dont les puits sont coatés avec de la fibronectine humaine. Cette fois, les cellules ont été fixées uniquement après 15 et 30 min d'interaction, temps pour lesquels nous avons observé une différence d'attachement précédemment. De nouveau, les cellules B02-KO présentent un défaut d'adhérence à la fibronectine comparé aux cellules B02-P et CTL (Figure 46 B).

Cette expérience a permis d'émettre l'hypothèse que ROBO4 serait impliqué dans l'attachement des cellules tumorales à la matrice osseuse.

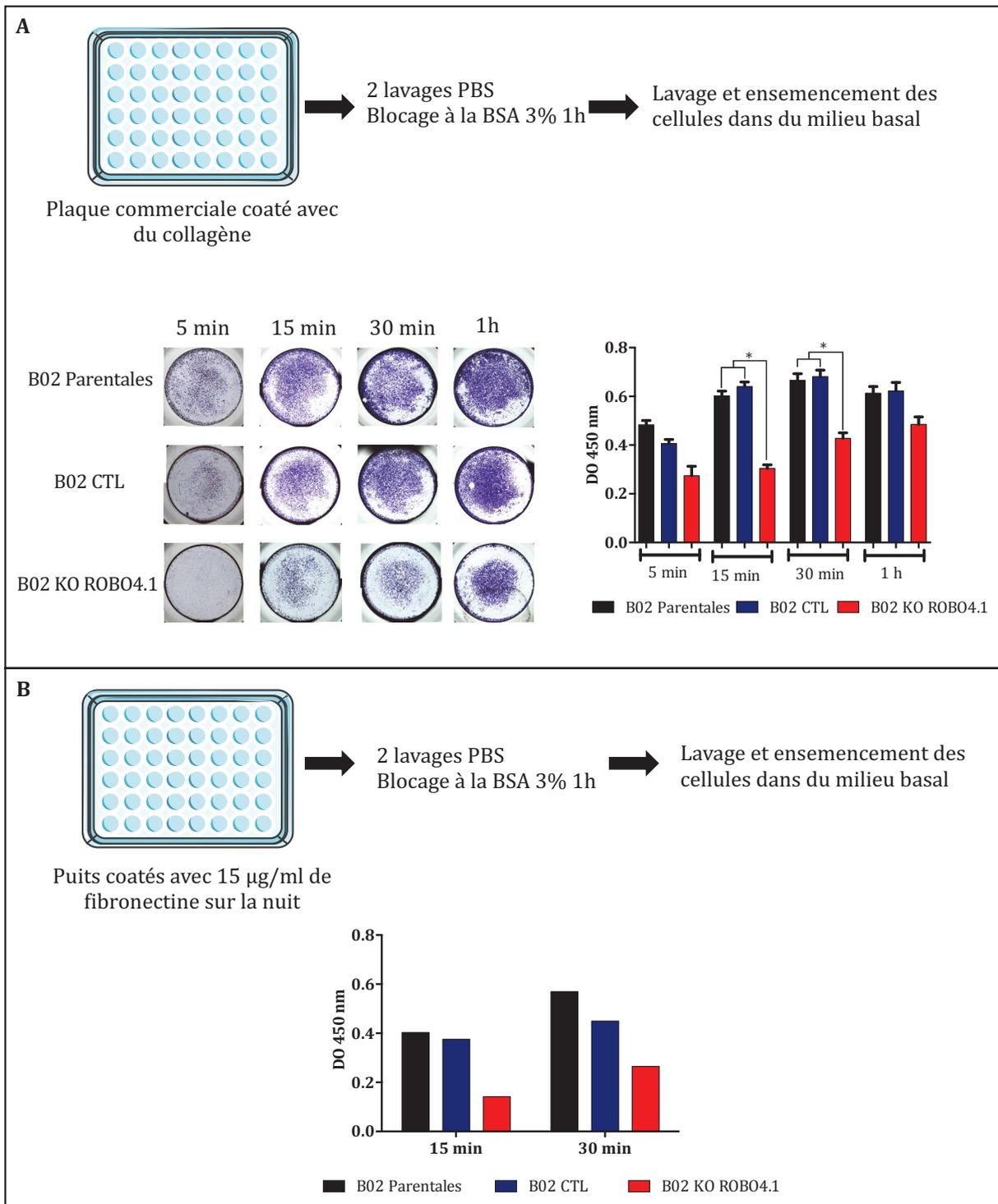


Figure 46 : ROBO4 pourrait jouer un rôle dans l'attachement des cellules B02 aux protéines matricielles osseuses. (A) Les cellules B02 ont été ensemencées sur des plaques commerciales coâtées avec du collagène de type I humain. A 5, 15, 30 min et 1h, les cellules ont été fixées et colorées au cristal violet et la DO lu à 570 nm. (B) Les cellules ont été ensemencées sur de la fibronectine diluée dans du PBS à 15µg/ml. Les cellules ont été fixées comme précédemment après 15 et 30 min d'incubation.

3-2- Interaction des cellules B02 avec les cellules de la niche osseuse

Il a été démontré par *Smith-Berdan et Al*, que ROBO4 est impliqué dans la localisation des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Smith-Berdan et al., 2011). De plus, beaucoup de cellules composant le microenvironnement osseux expriment des protéines décrites comme susceptible d'interagir avec le récepteur ROBO4. Par exemple, les ostéoblastes et les cellules mésenchymateuses expriment *SLIT2* tandis que les cellules de Schwann présentent le récepteur ROBO1 à leur surface. C'est pourquoi nous avons examiné si l'inactivation de *ROBO4* pouvait engendrer une modification des interactions cellulaires. Pour cela nous avons tout d'abord cultivé en tapis des pré-ostéoblastes murins non différenciés, les MC3T3-E1, dans des plaques 96 puits non traités pour la culture cellulaire, où les cellules tumorales B02 seules dans du milieu basal ne peuvent pas adhérer (thèse de Lise Clément-Demanges). Après 48h d'incubation, les cellules tumorales B02-P, CTL et KO ont été ajoutées dans du milieu basal. Le nombre de cellules tumorales a été dénombré après 20h de co-culture par mesure de leur activité luciférase (Figure 48 A). Ces essais ont mis en évidence une perte de l'interaction entre cellules B02 et MC3T3-E1 suite à l'inactivation du gène ROBO4 d'environ 50% (Figure 48 B).

Cette expérience a également été réalisée avec des CSM humaines. De même, une diminution de l'interaction des cellules B02-KO avec les CSM d'environ 60% est observée (Figure 48 C).

Enfin, nous avons testé l'interaction avec les cellules de Schwann et observé une importante réduction de l'attachement tumorale après l'inhibition de ROBO4 dans les cellules B02, d'environ 40% (Figure 48 D).

Ces tests réalisés en 2D ont montré que la perte de ROBO4 dans les cellules B02 induit une diminution significative de leur interaction avec les cellules du microenvironnement osseux. Ceci démontre l'implication de ROBO4 dans l'ancrage des cellules métastatiques au sein de la moelle osseuse.

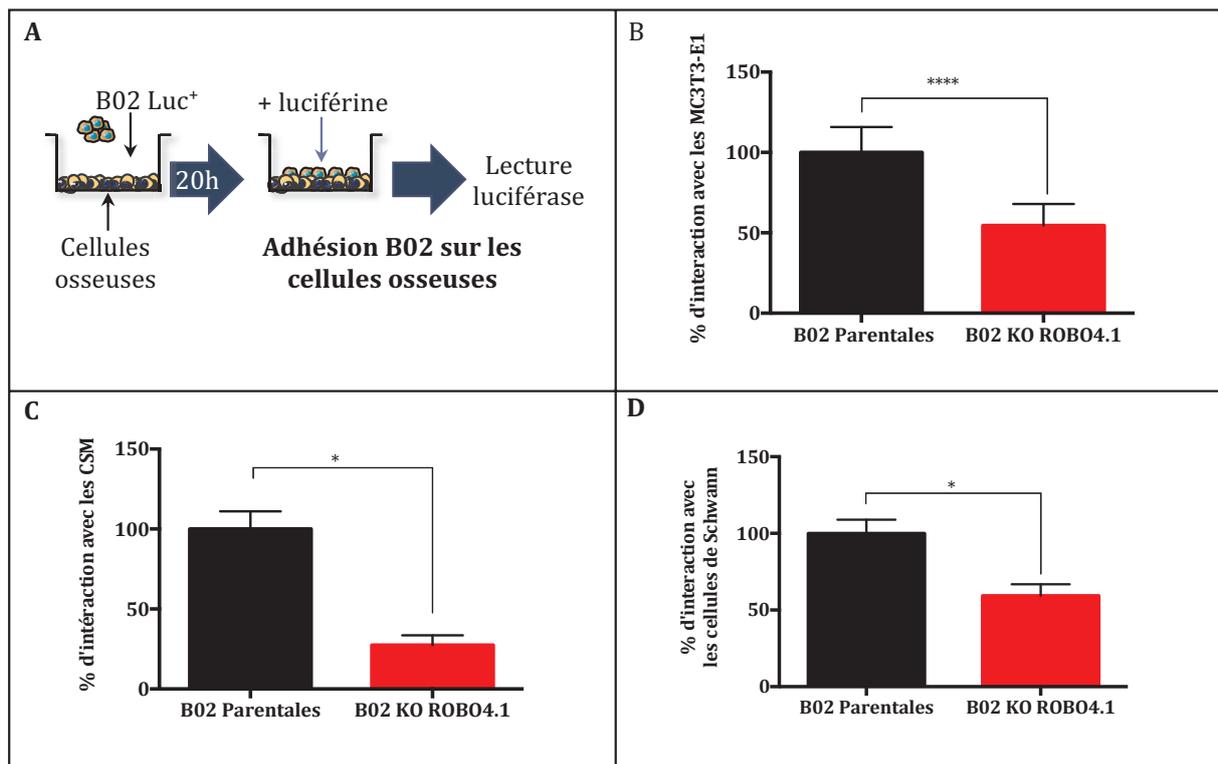


Figure 47 : Impact de la délétion de ROBO4 dans les cellules B02 sur leur adhérence aux cellules de la moelle osseuse. (A) Les cellules osseuses sontensemencées de façon à former un tapis avant l'ajout de cellules tumorales exprimant la luciférase. Après 20h d'incubation le nombre de cellules adhérentes aux cellules osseuses est déterminé par la lecture de l'activité luciférase. Les tests ont été réalisés : en (B) sur des MC3T3-E1, en (C) sur des CSM et enfin, en (D) sur des cellules de Schwann.

Pour approfondir ce travail, nous avons développé un modèle d'interaction en 3D de formation de sphéroïdes par co-culture (ici ces sphéroïdes sont appelés mammosphères), dans un milieu sans sérum et avec des plaques « low adherence » (Figure 48 A). Ceci représente un environnement qui mime de façon plus représentative ce qu'il se passe *in vivo*, où les tumeurs croient en 3D avec des conséquences micro-environnementales, comme l'hypoxie et le manque de nutriment pour les cellules au centre de la tumeur. De plus les interactions cellulaires simulées sont également plus proches d'un modèle tumoral *in vivo*.

Dans ces expériences les lignées B02-P et KO ont été ensemencées en co-culture avec soit des MC3T3-E1, soit des CSM, soit des cellules de Schwann à concentration égale. Après une semaine d'incubation, les sphères ont été fixées avec du PFA et les noyaux marqués au DAPI avant de scanner les puits avec un microscope NIKON PALM-STORM. Nous avons ainsi dénombré les sphères présentes dans chaque puits et déterminé la taille de chacune des mammosphères formées, grâce à des analyses avec le logiciel Fiji.

L'analyse des résultats de co-culture avec les différents composants cellulaire osseux testés, a permis de mettre en évidence une perte significative des sphères de grosses tailles lorsque ROBO4 est inhibé dans les cellules B02 comparé à la surface des sphéroïdes formées par les cellules B02-P (Figure 48 B à D).

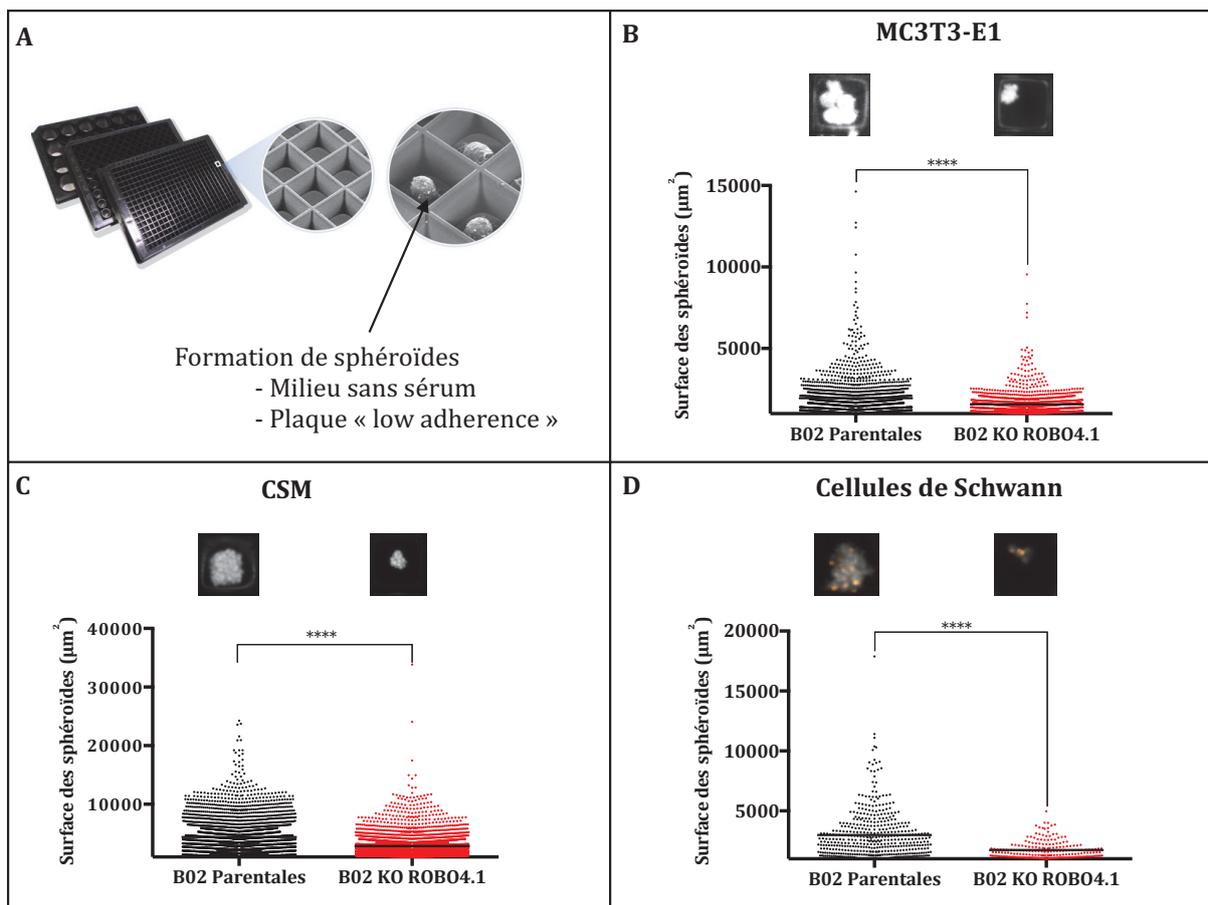


Figure 48 : Impact de la délétion de ROBO4 sur la capacité des cellules B02 à former des sphéroïdes en co-culture avec des cellules de la moelle osseuse. (A) Les cellules ont été ensemencées en co-culture à concentration égale dans un milieu sans sérum dans des plaques à faible attachement, pendant 7 jours. Les cellules tumorales B02 avec ou sans ROBO4 sont en co-culture avec, (B) des MC3T3-E1, (C) des CSM, (D) des cellules de Schwann. À chaque fois, les sphères ont été dénombrées et leurs tailles analysées. Des photos représentatives de sphères sont montrées.

La capacité cellulaire à former des sphéroïdes est souvent corrélée au caractère souche : plus les cellules sont aptes à se diviser, croître et survivre dans un milieu en suspension sans sérum, plus elles présentent des caractéristiques de cellules souches. Dans notre cas, cela suggère que les cellules B02-P seraient plus pluripotentes que les cellules B02-KO. Or, de précédentes études menées au laboratoire ont démontré que les cellules B02

exprimant le caractère souche, mesuré par l'ALDH (aldéhyde déshydrogénase) représente moins de 1% de cette population qui est pourtant 100% CD44+ et 0% CD24- (Croset et al., 2018). Afin de s'en assurer, avons tout de même examiné l'expression de gènes impliqués dans la pluripotence : *NOGGIN*, *NANOG* et *OCT4* (Octamer-binding Transcription factor 4). L'expression relative de *NOGGIN* et *NANOG* est significativement augmentée dans les cellules B02-KO en comparaison au B02-P et le taux d'*OCT4* a également tendance à augmenter dans ces cellules (Figure 49). Par conséquent les cellules invalidées en *ROBO4* ont un caractère cellule souche plus marqué que les cellules B02-P et devraient donc former des sphères plus importantes. Ce n'est pas ce qui est observé expérimentalement, ce qui indique que c'est vraisemblablement la perte d'interaction cellulaire qui est responsable de la diminution de taille de sphéroïdes formées par les cellules B02-KO.

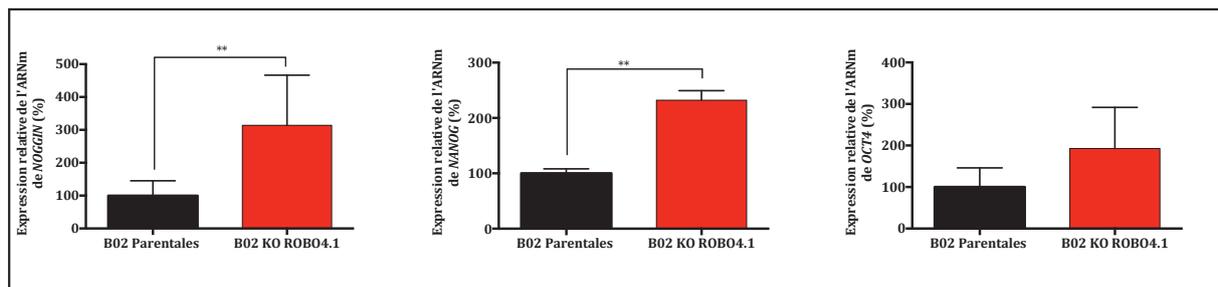


Figure 49: Expression relative de *NOGGIN*, *NANOG* et *OCT4* dans les cellules métastatiques B02. Une augmentation du caractère souche des cellules est observable suite à l'invalidation de *ROBO4*.

Ces données sont en accord avec celles obtenues en culture 2D, et confirment donc la participation de *ROBO4* dans les interactions des cellules métastatiques B02 avec les cellules du microenvironnement osseux. Cependant l'adhérence des cellules tumorales avec les composants organiques ou cellulaires osseux est altérée suite à l'invalidation de *ROBO4* et cela de façon aspécifique, quel que soit les composants testés. De ce fait, nous nous sommes demandé si l'inhibition du récepteur *ROBO4* pouvait engendrer un défaut d'agrégation des cellules tumorales entre elles, qui serait en partie responsable des phénomènes observés. Si les cellules B02 perdent leur capacité à interagir entre-elles en l'absence de *ROBO4*, cela pourrait affecter leur survie dans la circulation sanguine mais

aussi, empêcher la formation de tumeurs cohésives dans l'organe primaire mais aussi dans l'os.

3-3- ROBO4 est impliqué dans la cohésion des cellules tumorales entre elles

Afin d'examiner cette hypothèse, les cellules B02-P, B02 CTL et B02-KO ont été ensemencées en culture homotypique pour déterminer si leur capacité à former des sphéroïdes en 7 jours et en l'absence d'autres types cellulaires est impactée par l'inhibition de ROBO4.

Lorsque ROBO4 est absent dans les cellules B02, on observe une perte de la formation des sphéroïdes de tailles importantes, en comparaison à la taille des sphères formées par les lignées contrôles (Figure 50 A).

De plus, des résultats similaires sont obtenus lorsque les cellules sont cultivées en présence de l'anticorps bloquant anti-ROBO4 (10 µg/mL), ajouté à J0.

En effet, le profil de la taille de sphères formées par les cellules B02-P incubées en présence de l'anticorps est similaire à celui des sphères composées de B02-KO. L'ajout de l'anticorps n'a pas d'effet cumulatif sur la taille des sphères formées par les cellules B02-KO, ce qui implique que l'anticorps n'agit pas de façon aspécifique sur un autre récepteur membranaire. De plus, le traitement par un isotype contrôle ne modifie pas les capacités des cellules à former des mammosphères (Figure 50 B).

Dans ces modèles, ROBO4 est inhibé et perturbe l'interaction cellulaire dès la mise en culture des cellules. Cependant, ces données ne nous permettent pas de déterminer si la présence de ROBO4 dans les cellules B02 est encore nécessaire à la cohésion cellulaire après l'agrégation des cellules. Pour répondre à cette question, l'expérience a été reproduite : les cellules B02-P ont été mises en culture homotypique et de l'anticorps contrôle ou anti-ROBO4 à 10 µg/mL ont été ajoutés soit à J0, soit après 3 jours de culture. Le profil de taille des sphères formées est identique lorsque de l'anticorps bloquant anti-ROBO4 est ajouté dans le milieu de culture à J0 ou à J3, et est significativement inférieur à celui des sphéroïdes formés par les cellules B02 non traitées ou en présence de l'anticorps contrôle (Figure 50 C). Ceci démontre que cibler ROBO4 plus tardivement prévient également l'interaction des cellules B02 entre elles.

L'ensemble des expériences de formation de sphéroïdes homo- ou hétérotypiques montre l'importance du récepteur ROBO4 dans les interactions cellulaires.

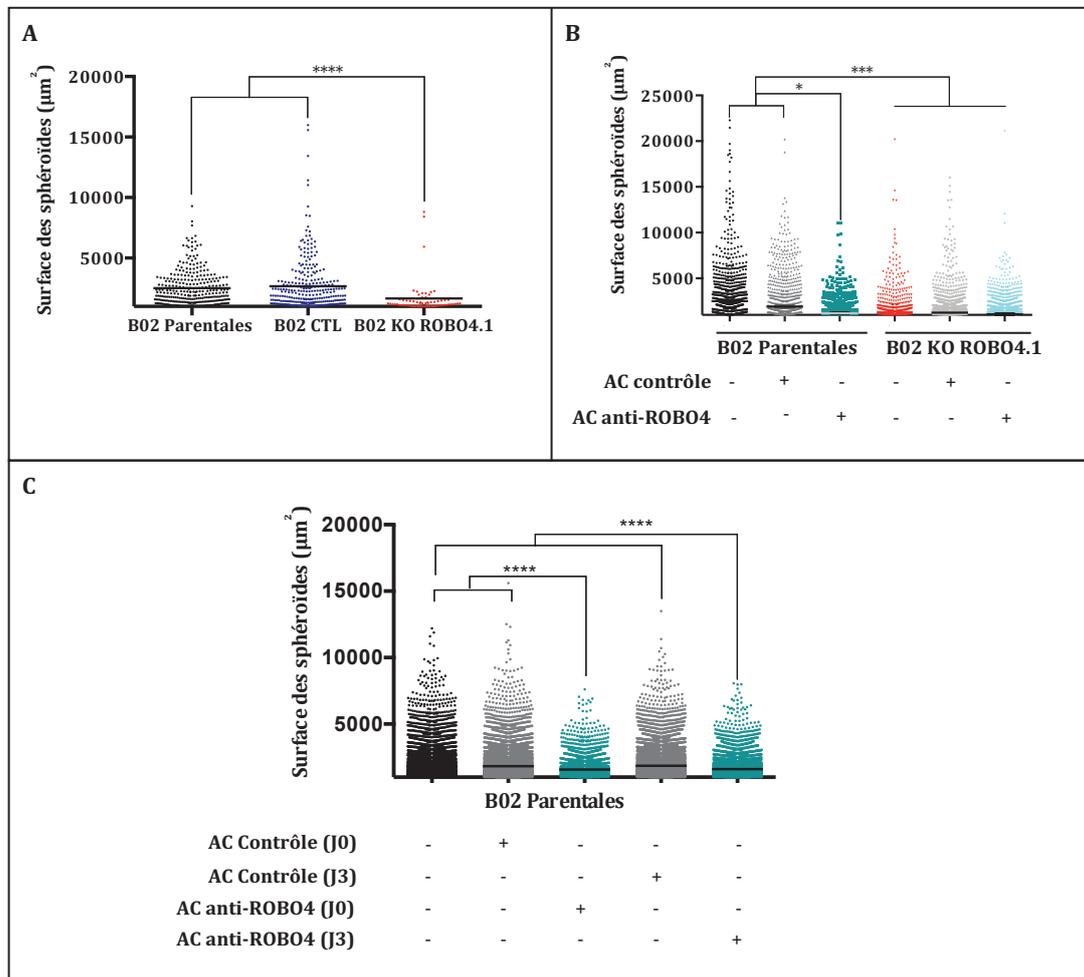


Figure 50 : Implication du récepteur ROBO4 dans la cohésion des cellules tumorales entre elles. (A) Les cellules tumorales B02-P, CTL et KO ont été cultivées en suspension dans du milieu sans sérum pendant 7 jours. Les sphères ont été dénombrées et leurs tailles analysées. (B) La même expérience a été réalisée avec des cellules B02-P et KO non traitées, traitées avec de l'anticorps contrôle ou avec de l'anticorps anti-ROBO4 dès le premier jour de culture. (C) Les cellules B02-P et KO ont étéensemencées comme précédemment et de l'anticorps contrôle ou anti-ROBO4 a été ajouté à J0 ou à J3.

4- ROBO4 intervient dans l'agrégation cellulaire

Dans les cellules endothéliales, ROBO4 participe à la protection de l'intégrité vasculaire, notamment via son rôle dans le maintien des jonctions cellulaires, en particulier des jonctions adhérentes et serrées. L'inhibition de ROBO4 par une stratégie de siARN dans

ces cellules induit un remodelage du cytosquelette d'actine, avec formation de filopode et de fibre de stress.

4-1- ROBO4 est impliqué dans l'intégrité du cytosquelette d'actine des cellules B02

Les cellules B02 présentent un phénotype mésenchymateux très marqué car elles n'expriment pas la *E-cadhérine* mais le marqueur mésenchymateux N-cadhérine et les jonctions cellulaires y sont désassemblées (Croset et al., 2014). C'est pourquoi nous avons examiné si l'inactivation de ROBO4 modifie le cytosquelette d'actine des différentes lignées par un marquage à la phalloïdine-rhodamine. La phalloïdine, toxine extraite de champignons tel que l'amanite phalloïde, se lie à l'actine et inhibe sa dépolymérisation. Cette propriété permet son utilisation en biologie cellulaire car couplée à la rhodamine, elle devient fluorescente et permet la visualisation des fibres d'actine par microscopie en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 541 nm et d'émission à 572 nm.

Les cellules B02-P, CTL et KO ont étéensemencées à faible densité, de façon à ce qu'elles soient relativement isolées, sur des lamelles en verre. Après 24h les cellules ont été marquées avec le fluorochrome puis analysées par microscopie confocale. Deux expériences distinctes (conf-) ont été réalisées et ont permis de montrer que les cellules B02-KO sont beaucoup plus petites et plus isolées que les cellules B02-P et CTL. Une troisième expérience avec des cellules plus confluentes (conf +) montre toujours des cellules plus petites lorsque ROBO4 est déplété. Sur les images de cette expérience on distingue que les cellules B02-KO sont moins jointives, avec une tendance à se chevaucher plutôt que de se lier les unes aux autres (Figure 51 A).

En parallèle, la même expérience a été réalisée avec les cellules B02-P pré-incubées 1h dans du milieu complet seul, avec de l'anticorps isotypique ou de l'anticorps anti-ROBO4, puisensemencées pour 24h sur les lamelles en verre. Les cellules incubées avec l'anticorps ciblant ROBO4 ont un phénotype identique à celui des cellules B02-KO, c'est à dire plus petites et isolées (Figure 51 B).

Ces observations suggèrent un rôle de ROBO4 dans le maintien du cytosquelette d'actine des cellules B02 ; l'inhibition de ROBO4 pourrait ainsi induire un défaut d'attachement des cellules à la lamelle en verre ou le désassemblage des jonctions cellulaires.

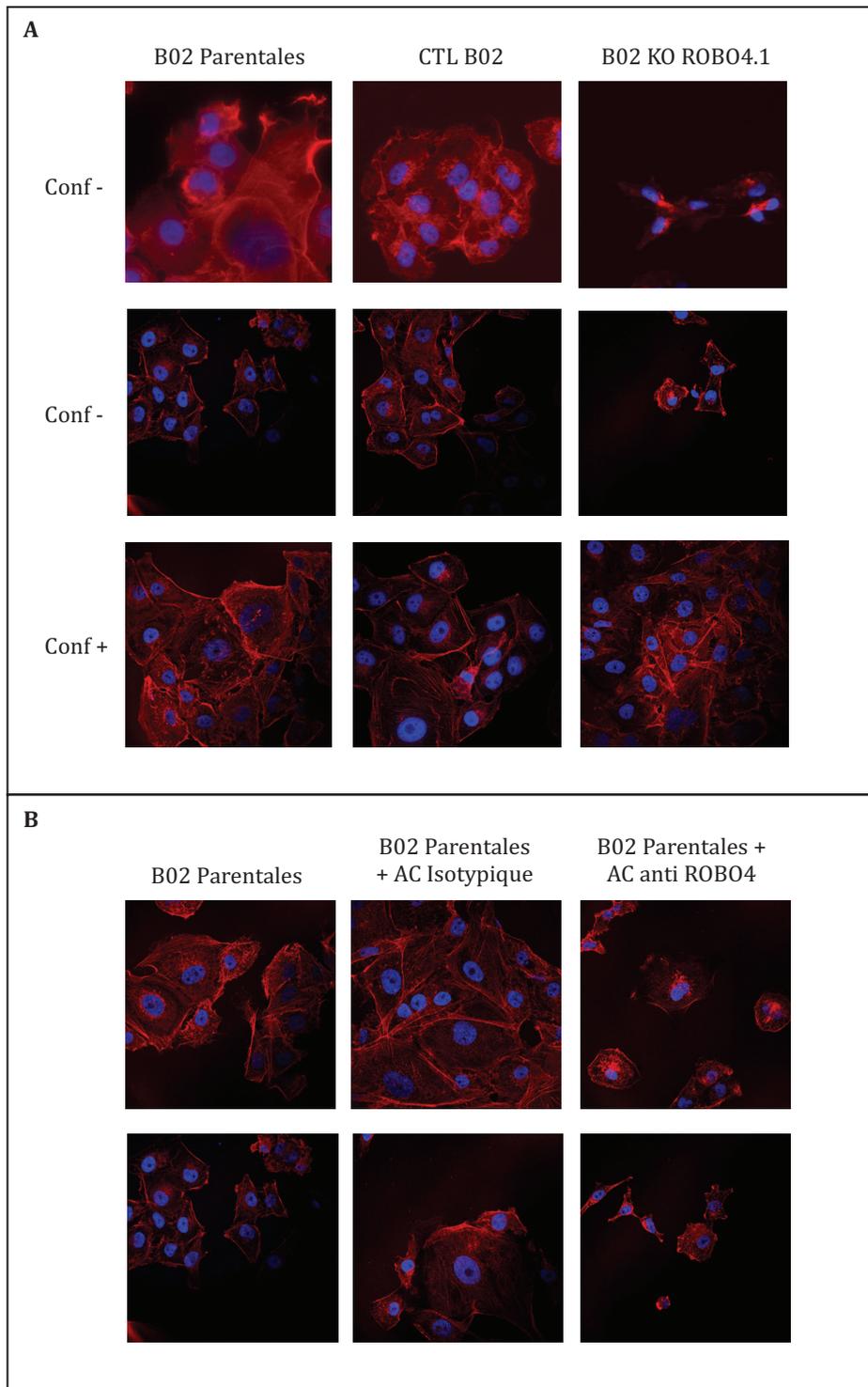


Figure 51 : ROBO4 est impliqué dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette d'actine des cellules B02. (A) Le cytosquelette d'actine des cellules B02-P, CTL et KO a été marqué à la phalloïdine-rhodamine puis imagé au microscope confocal. Les cellules ont été ensemencées à faible confluence (conf -) ou à plus forte confluence (conf +). (B) La même expérience à faible confluence a été réalisée après pré-incubation des cellules dans du milieu complet seul, avec de l'isotype contrôle ou avec de l'anticorps anti-ROBO4.

4-2- L'agrégation des cellules tumorales entre-elles est médiée par ROBO4

Les résultats obtenus sur la formation de sphéroïdes homotypiques et sur l'intégrité du cytosquelette d'actine nous ont conduits à émettre l'hypothèse qu'une interaction homophile ROBO4-ROBO4 pourrait être nécessaire à la cohésion des cellules B02. De plus, des données bibliographiques suggèrent que ROBO4 est capable de s'homodimériser et de former des multimères (Yoshikawa et al., 2008).

Afin de répondre à cette question, les cellules B02-P ont été colorées en rouge, grâce à l'utilisation de DiD comme décrit précédemment. En parallèle, les cellules B02 CTL et KO ont été colorées en vert avec un autre colorant lipophile de la même famille, le DiO. Par la suite, les cellules B02-P-DiD ont été mises en co-culture avec, soit les cellules B02 CTL-DiO, soit les KO-DiO dans des plaques non-adhérentes et dans du milieu sans sérum afin d'observer la formation de sphéroïdes hétérotypiques. Les interactions cellulaires ont été imagées par l'utilisation d'un microscope NIKON-PALM-STORM (photos représentatives Figure 52 A). Grâce au logiciel de programmation Python, le nombre de sphères homotypiques (vertes et rouges) et hétérotypiques (jaunes, par fusion du rouge et du vert) a été quantifié. Les résultats démontrent une perte de sphéroïdes hétérotypiques d'environ 40% lorsque ROBO4 est inhibé dans les cellules B02 (Figure 52 A). En parallèle, l'intensité du signal fluorescent jaune a également été quantifiée et nous apporte une information supplémentaire sur la surface de sphères hétérotypiques : plus elles sont de tailles importantes, plus la densité optique sera élevée. On observe une chute drastique de l'intensité du signal de colocalisation lorsque les cellules B02-P sont cultivées avec les cellules B02-KO par comparaison à la co-culture avec les B02-CTL (Figure 52 B).

La perte d'interaction des cellules B02-KO avec les cellules B02-P démontre que ces cellules tumorales s'agrègent entre-elles, en partie *via*, une interaction impliquant le récepteur ROBO4.

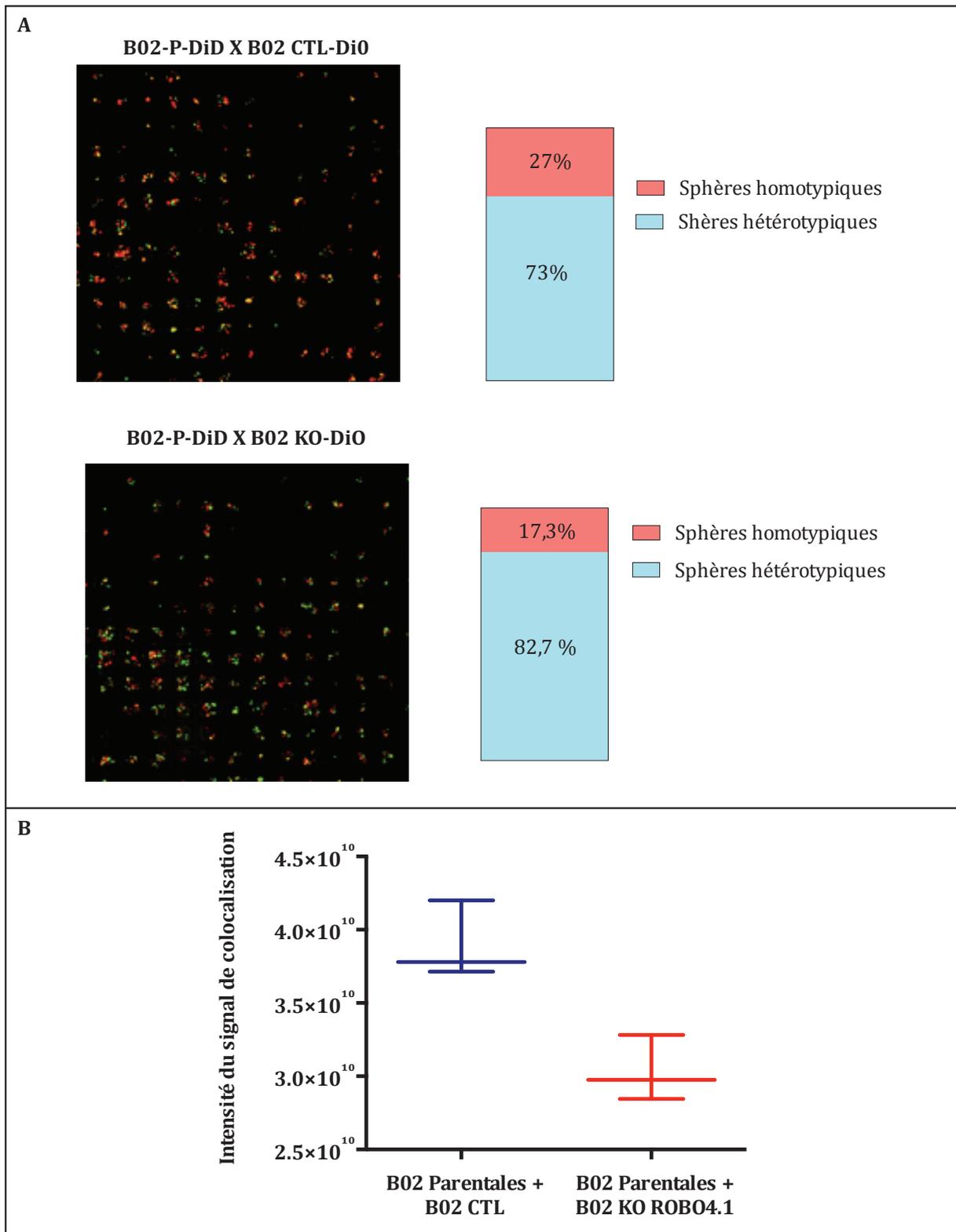


Figure 52 : L'interaction ROBO4-ROBO4 participe à la cohésion des cellules tumorales entre-elles. Les cellules B02-P-DiD ont été mises en co-culture avec les cellules B02 CTL-DiO (panel du haut) ou avec les cellules B02-KO-DiO (panel du bas). (A) Les sphères homo- et hétérotypiques ont été dénombrées grâce au logiciel de programmation Python. (B) L'intensité du signal de colocalisation a également été quantifié.

4-3- ROBO4 module l'expression de gènes codant les molécules d'adhésion cellulaire de la famille CAM

En plus de son rôle direct dans les interactions tumorales, nous avons émis l'hypothèse que ROBO4 pourrait également intervenir dans le maintien des jonctions cellulaires, tout comme il le fait dans les jonctions serrées et adhérentes entre cellules endothéliales. Or, les cellules B02 ont un phénotype très mésenchymateux et par conséquent elles n'expriment que très peu ou pas du tout les gènes codants les protéines jonctionnelles. De ce fait nous sommes intéressés à d'autres types de protéines d'adhérence essentiellement impliquées dans les interactions hétérotypiques, les CAM (Cell Adhesion Molecule). L'équipe du Dr. Smith-Berdan a démontré que chez la souris la délétion de *ROBO4* dans les cellules engendre une diminution du taux d'ARNm de *VCAM1*, suggérant une régulation en partie contrôlée par ROBO4 (Smith-Berdan et al., 2015). *VCAM1* et *ICAM1* (intercellular Cell Adhesion Molecule) sont très souvent surexprimés dans les cellules tumorales. Leur expression est stimulée par le facteur de croissance TNF- α , sécrété dans des conditions inflammatoires.

Dans ce cadre, les cellules B02 ont été stimulées par du TNF- α à 10 ng/mL pendant 24h. L'expression de *ICAM1* et *VCAM1* a été quantifiée par RT-PCR quantitative. L'analyse des résultats démontre que la stimulation par du TNF- α induit l'expression de *VCAM1* dans les cellules B02. En revanche, le taux relatif de transcrite produit dans les cellules B02 invalidées en *ROBO4* est environ 10 fois plus faible que celui observé dans les cellules B02-P et CTL (Figure 53 A). De façon très intéressante, *VCAM1* est impliqué dans la formation de macro-métastases osseuses ostéolytiques. Par son interaction avec l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ présente dans les cellules ostéoclastiques, *VCAM1* induit une augmentation du recrutement des progéniteurs et de l'activité des ostéoclastes (Lu et al., 2011). De ce fait, les résultats observés *in vivo* sur la formation de plage d'ostéolyse pourrait être, en partie expliqués par la diminution de l'expression de *VCAM1* dans les cellules B02-KO. De plus, cette intégrine est exprimée par les cellules stromales de la moelle osseuse et les cellules métastatiques B02 suggérant une possible interaction homo- ou hétérotypique passant par *VCAM1*. Un article récent a mis en évidence que les cellules tumorales de cancer du sein expriment *ICAM1*. Son inhibition entraîne la perte d'adhérence des cellules métastatiques sur les ostéoblastes et les cellules souches mésenchymateuses mais aussi, entre cellules tumorales (Dhawan et al., 2016). C'est pourquoi nous avons analysé le taux

relatif de transcrit *ICAM1* dans les cellules B02 et montré que l'inhibition de ROBO4 induit une importante décroissance de l'expression de *ICAM1* après stimulation avec du TNF- α (Figure 53 B).

En conclusion la présence de ROBO4 dans les cellules de cancer du sein B02 induit l'expression des molécules d'adhésion *ICAM1* et *VCAM1*, suite à la stimulation avec du TNF- α . *VCAM1* et *ICAM1* sont impliquées dans les interactions cellulaires homo- et hétérotypiques. Par conséquent elles pourraient également être impliquées dans les interactions homotypiques entre cellules tumorales mais aussi dans la perte d'interaction observée avec les composants du micro-environnement osseux (qui eux, n'expriment pas *ROBO4*). De plus, l'expression de *VCAM1* pourrait être en partie responsable de l'ostéolyse provoquée par la colonisation de la moelle osseuse des cellules B02.

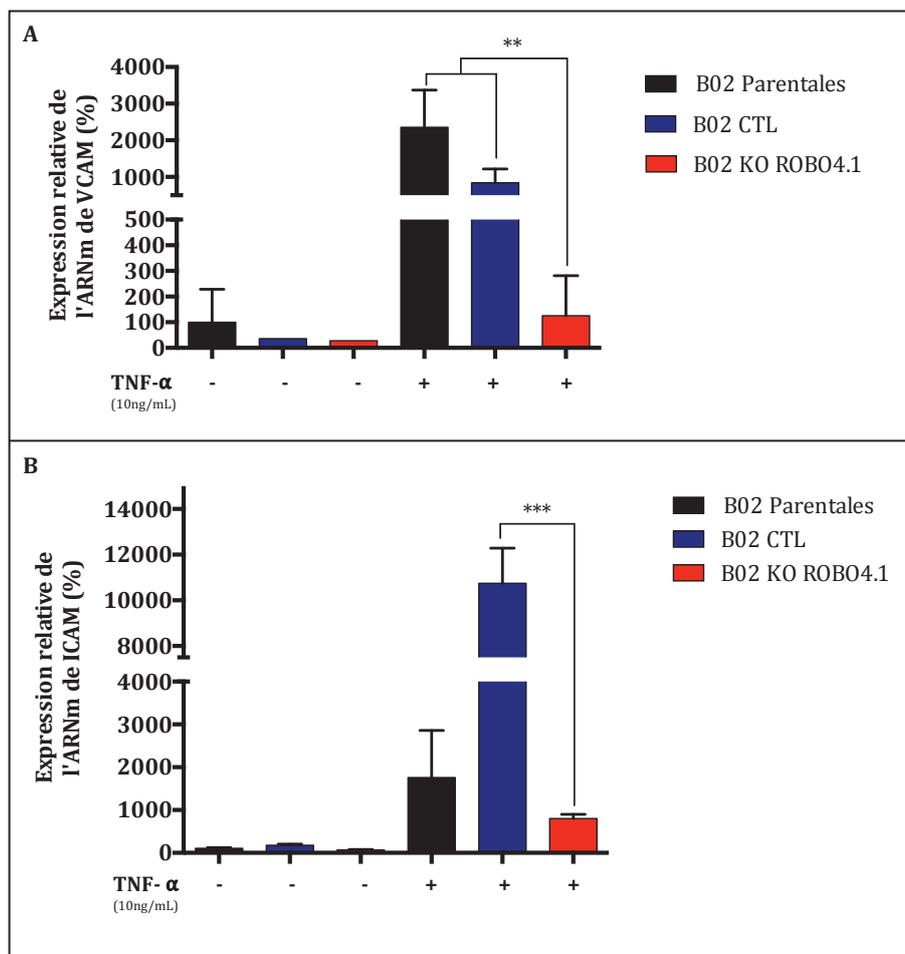


Figure 53 : Expression relative de *VCAM* et *ICAM* dans les cellules métastatiques B02 stimulées ou non par le TNF- α . L'inhibition de ROBO4 dans les cellules B02 induit une chute significative de l'expression, en (A) de *VCAM* et en (B) d'*ICAM*.

5- Développement de nouveaux outils thérapeutiques ciblant le récepteur ROBO4

Nos résultats mettent en évidence qu'un traitement avec de l'anticorps commercial anti-ROBO4 produit les mêmes effets que l'inactivation du gène *ROBO4* dans les cellules tumorales B02. En effet cet anticorps utilisé altère la formation de sphéroïdes, le remodelage du cytosquelette d'actine mais aussi la colonisation métastatique de l'os *in vivo* dans les modèles expérimentaux murins. C'est pourquoi une collaboration avec l'équipe du Dr. Bruno Robert (U896 - Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier), avec le soutien d'INSERM Transfert, a été mise en place dans le but de produire des anticorps humanisés dirigés contre ROBO4.

5-1- Production d'anticorps anti ROBO4

Les anticorps ont été générés par la technique du phage display à l'aide d'une banque exprimant des scFv humains. 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 la mise à disposition dans notre laboratoire, l'équipe du Dr. Robert, a purifié les anticorps produits puis, les a testés en cytométrie de flux dans les cellules B02-P et B02-KO, afin de vérifier leur spécificité. Dans un premier temps ils ont sélectionné six anticorps ciblant ROBO4 et un anticorps FC contrôle.

5-2- Tests fonctionnels avec les anticorps générés

Nous avons tout d'abord réalisé un test d'adhérence en 2D sur un tapis de pré-ostéoblastes murins non différenciés, les MC3T3-E1, avec des cellules tumorales qui expriment la luciférase (comme vu précédemment). Cette expérience a permis d'identifier trois anticorps qui provoquent, de façon plus importante que l'anticorps commercial, une perte d'adhérence des cellules B02 au MC3T3-E1 : G12.3, E11.3 et D3.1 (Figure 54 A).

Afin de confirmer ces résultats nous nous sommes intéressés à l'effet de ces anticorps sur la capacité des cellules à former des mammosphères en culture homotypique pendant 7

jours. Ces tests ont été réalisés à la fois sur la lignée B02-P mais également sur les cellules B02-KO de façon à vérifier leur spécificité.

Nous avons montré que tous les anticorps générés induisent bien une diminution de la taille des sphéroïdes formées par les cellules B02-P. Cependant l'anticorps contrôle fourni (CT) induit lui aussi une perte de la formation de sphères de grosses tailles, ce qui démontre une relative aspécificité. Cette observation est confirmée par l'expérience réalisée avec les cellules B02 déplétées en ROBO4, pour lesquelles on observe aussi une diminution de la taille des sphères formées avec un traitement par cet anticorps contrôle. De plus les anticorps D3.1, H11.1 et H9.1 semblent eux aussi être aspécifiques car ils inhibent partiellement la formation de sphères formées par les cellules B02-KO (Figure 54 B).

Pour la suite de cette étude, et compte tenu des résultats obtenus, nous nous sommes, d'une part, concentrés sur les anticorps G12.3 et E11.3 et d'autre part nous avons screené de nouveaux anticorps contrôles.

De ce fait, 4 nouveaux anticorps contrôle ont été produits, CT1 à CT4. Ces mêmes essais en 3D ont été reproduits sur les cellules B02-P, CTL et KO. Les datas générées ont permis de confirmer que les anticorps G12.3 et E11.3 ont bien un effet sur les cellules B02-P et B02-CTL. De plus les anticorps CT1 et CT2 semblent aspécifiques au vu de la perte de sphéroïdes de grosses tailles observées avec ces anticorps (Figure 54 C). Ceci n'est pas surprenant étant donné que l'anticorps CT1 est dirigé contre la protéine membranaire CD20, codées par le gène *MS4A1* (Membrane Spanning 4-Domains A1), et que CT2 cible ROR2 (Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2). L'analyse du transcriptome des cellules B02-P (non montré ici) nous indique que les transcrits de ces gènes sont bien exprimés par ces cellules. C'est donc sans surprise qu'on retrouve cet effet aspécifique sur les cellules invalidées en ROBO4. Contrairement à ce qui a été montré dans l'expérience précédente, l'anticorps E11.3 semble ici également avoir un effet aspécifique, au vu de la diminution de taille des sphéroïdes formées par les cellules B02-KO (Figure 54 C).

L'ensemble de ces divers essais nous a permis de conclure que l'anticorps G12.3 semble être le meilleur candidat pour être produit en masse et testé *in vivo* afin de déterminer si comme l'anticorps commercial, il induit une diminution de la colonisation osseuse par les cellules B02. Les anticorps contrôles, CT3 et CT4, pourront être utilisés comme isotypes contrôles.

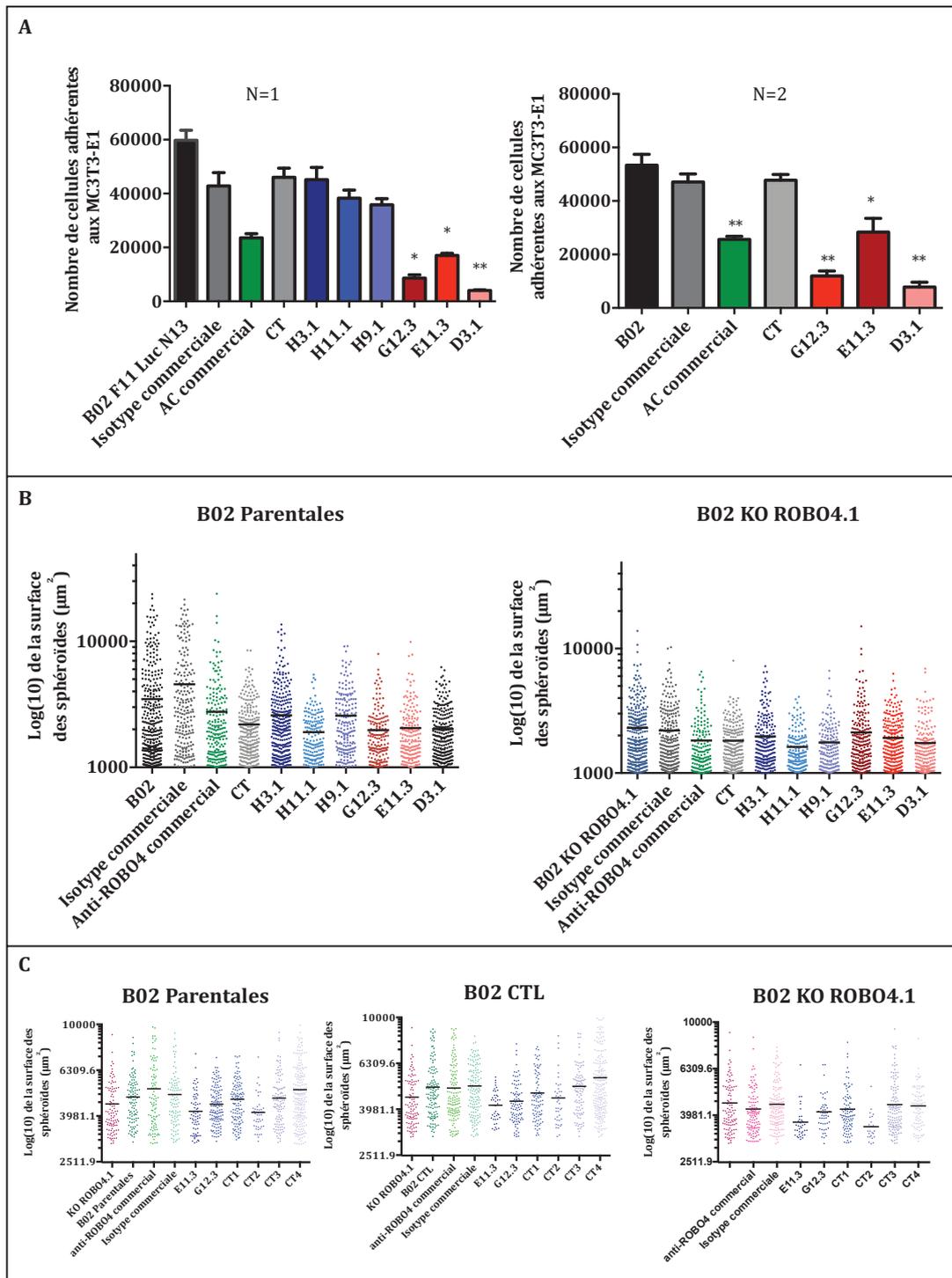


Figure 54 : Tests fonctionnels avec les anticorps humains générés, dirigés contre ROB04. (A) Tests d'adhérences sur des MC3T3-E1, avec des cellules B02 non traitées ou pré-incubées 1h avec de l'anticorps commercial, de l'isotype commercial ou les anticorps générés (CT, H3.1, H11.1, H9.1, G12.3, E11.3 et D3.1). Le nombre de cellules adhérentes aux MC3T3-E1 a été mesuré par lecture de l'activité luciférase. (B) Tests de formation de sphéroïdes homotypiques sur 7 jours, avec ou sans traitement par ces mêmes anticorps. (C) Même expérience avec de nouveaux anticorps contrôles CT1 à CT4. La taille des sphères a été analysées grâce au logiciel Fiji.

Chapitre 3 : Discussion & perspectives

Les cellules métastatiques capables d'envahir le microenvironnement osseux présentent une signature génique particulière associée à leur ostéotropisme. Dans ce cadre, une étude transcriptomique comparative entre les cellules MDA-MB-231 et leur sous clones ostéotropiques, a montré la surexpression de *ROBO4* dans les cellules B02. Ce récepteur appartient à la famille Roundabout, comprenant quatre membres initialement décrits dans le développement du système nerveux central en tant qu'acteurs du guidage axonal. Contrairement aux autres membres de sa famille, son implication dans le développement neuronal humain n'a jamais été démontrée. Il est en revanche abondamment présent dans les cellules endothéliales et a également été détecté dans les CSH. Au sein de la vasculature, *ROBO4* exerce des rôles contradictoires : pro-angiogénique pendant le développement (Kaur et al., 2006), puis stabilisateur des vaisseaux sanguins (Jones et al., 2009). Dans la moelle osseuse, *ROBO4* participe, mais n'est pas essentiel, au maintien des CSH sur les cellules résidentes de l'os (Smith-Berdan et al., 2011). En oncologie, *ROBO4* a davantage été étudié dans le phénomène de néoangiogenèse et semble avoir une fonction de suppresseur de tumeur en contrecarrant la formation de vaisseaux sanguins tumoraux (Cai et al., 2015b). En revanche la présence de *ROBO4* dans les cellules tumorales n'a que très rarement été décrite et étudiée, mais semble avoir un rôle pro-tumoral. Cela a notamment été mis en évidence dans le cadre du cancer de la vessie, où la croissance tumorale, après une greffe sous cutanée, est retardée par l'injection d'un anticorps anti-*ROBO4* (Li et al., 2015). Dans le cadre du cancer du sein et de la formation de métastases, aucune donnée publiée à ce jour ne démontre une corrélation entre l'expression de *ROBO4* et la croissance tumorale.

Ainsi de précédentes études réalisées au laboratoire, lors du travail de thèse de Bénédicte Eckel, ont montré pour la première fois, la corrélation significativement positive entre l'expression de *ROBO4* dans la tumeur primaire du sein et la rechute métastatique globale et à l'os plus particulièrement.

Mon travail de thèse s'est inscrit dans la continuité de ces travaux et a consisté à mettre en évidence le rôle de *ROBO4* dans la formation de tumeurs primaires et de métastases osseuses. Grâce à la construction d'un modèle cellulaire tumoral ostéotrope dépourvu de *ROBO4* et à l'obtention de données *in vivo* et *in vitro*, nous avons progressé dans la compréhension des mécanismes cellulaires sous-jacents à l'activité de *ROBO4*. Un second axe de travail portant sur le développement d'anticorps humanisés spécifiques de *ROBO4* a également été développé au cours de mon doctorat.

I- *ROBO4* est impliqué dans l'invasion tumorale et la formation de métastases osseuses dès les étapes précoces de dissémination

L'inactivation du gène *ROBO4* par technologie CRISPR/Cas9, dans les cellules B02, a été caractérisée. L'inactivation du gène a été démontrée tant au niveau génomique et transcriptomique qu'au niveau protéique pour les différents clones obtenus par dilutions limites. Ce projet repose essentiellement sur la génération des cellules B02 KO *ROBO4*.1 issues d'une population clonale. L'utilisation d'un système CRISPR/Cas9, menant à des réparations aléatoires, nécessite obligatoirement la sélection des cellules invalidées. En général celle-ci est réalisée par tri cellulaire. Ne disposant pas d'anticorps anti-*ROBO4* fonctionnel en FACS permettant l'obtention de deux populations cellulaires hétérogènes distinctes en fonction de la présence de *ROBO4*, nous avons été contraints de sélectionner les cellules par dilution limite. Cependant la suite des expériences *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées avec les cellules inhibées en *ROBO4* par génie génétique mais aussi par utilisation d'un anticorps spécifique, pour la majorité. Les résultats générés étant similaires à ceux obtenus avec le modèle cellulaire CRISPR/cas9 confirment que les effets observés sont bien liés à l'inhibition du récepteur et non pas à la clonogénicité des cellules B02-KO ce qui, par conséquent, valide notre modèle.

L'analyse de l'expression relative des autres membres de la famille *ROBO* dans les lignées B02-P, CTL et KO n'a pas mis en évidence de différences significatives sur les taux de *ROBO1* et *ROBO2* présents dans chaque lignée, *ROBO3* n'étant exprimé par aucune d'entre-elles. Ceci montre la spécificité du système CRISPR/Cas9 utilisé pour le gène *ROBO4* et démontre également qu'aucun phénomène de compensation de l'absence de *ROBO4*, par un autre membre de sa famille, n'a été induit dans les cellules B02-KO.

Par la suite, les caractéristiques intrinsèques fonctionnelles de chaque lignée ont été analysées *in vitro*. Les résultats obtenus démontrent que l'inhibition de ROBO4 ne perturbe pas le cycle cellulaire. Dans les cellules endothéliales ce récepteur impacte positivement ou négativement la migration selon le contexte développemental et pathologique. L'absence de ROBO4 ne modifie cependant pas les capacités migratoires des cellules B02, démontrant un rôle distinct du récepteur au sein des cellules tumorales. Enfin une tendance à la diminution de l'invasion cellulaire des B02-KO nous a conduit à étudier la capacité de ces cellules à former des tumeurs primaires *in vivo*.

L'injection orthotopique des cellules B02-P, CTL et KO a confirmé un retard de la croissance tumorale lorsque ROBO4 est inhibé dans les cellules B02. Les analyses immunohistochimiques des coupes de tumeurs réséquées n'ont pas mis en évidence de différence significative dans la vascularisation tumorale ni dans la division cellulaire *in vivo* suite à l'invalidation de *ROBO4*. De ce fait, la diminution de la prise tumorale ne peut pas être expliquée par un défaut de néoangiogenèse ou de prolifération cellulaire mais, serait le reflet d'une incapacité des cellules à envahir le tissu hôte. Les expériences de formation de métastases osseuses suite à l'injection des cellules tumorales dans la circulation sanguine démontrent également un important retard de croissance des tumeurs formées par les cellules B02-KO dans l'os. Les analyses de RT-PCR quantitative ont montré que les cellules B02 dépourvues de ROBO4 ont une capacité de production d'IL-6 réduite. Or, la surexpression de l'IL-6 induite par la présence de ROBO4 dans les cellules B02 permet, en partie, d'expliquer le phénotype invasif des cellules. En effet, il a été démontré que la sécrétion d'IL-6 par les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 participe à la croissance tumorale. Ainsi son inhibition provoque un retard de la prise tumorale et conduit donc à des tumeurs plus petites sur le long terme *in vivo* (Hartman et al., 2013). L'IL-6 agit de façon autocrine sur la cellule tumorale, et une fois liée à son récepteur, IL6ST, elle permet l'activation constitutive de STAT3, impliqué dans la résistance à l'apoptose et la croissance tumorale. Une autre étude montre que l'activation de Rac1 est responsable de l'expression de l'IL-6 et de son activité autocrine engendrant la phosphorylation de STAT3 (Faruqi et al., 2001). De façon intéressante, dans un cadre pro-angiogénique, il a été décrit que ROBO4 *via* son domaine intracellulaire est capable d'interagir et d'activer la signalisation Rac1 (Kaur et al., 2006). A l'inverse, les études présentant un rôle stabilisateur des vaisseaux sanguins démontrent que l'activation de

ROBO4 conduit à l'inactivation de Rac1 (Jones et al., 2009). Par conséquent, la détermination du statut d'activation de Rac1 dans les cellules B02-P/ CTL ou B02-KO pourrait être particulièrement pertinente. Au sein de la moelle osseuse, la sécrétion d'IL-6, lorsque ROBO4 est présent dans les cellules métastatiques, peut également expliquer les importantes plages de lyses observables. En effet, l'IL-6 est impliquée dans la différenciation ostéoclastique, en particulier en stimulant la production de RANKL par les ostéocytes (Wu et al., 2017), mais aussi dans l'inhibition de l'ostéoblastogenèse (Kaneshiro et al., 2014). Par conséquent une sécrétion accrue d'IL-6 par les cellules tumorales pourrait venir impacter l'équilibre entre formation et résorption osseuse. Des expériences d'ostéoblastogenèse et d'ostéoclastogenèse avec le milieu conditionné de cellules B02-P/CTL ou KO, se révèlent donc nécessaires.

Les essais menés à court terme sur le développement de micro-métastases ont toutes conclu un défaut de colonisation osseuse par les cellules tumorales, dès les étapes précoces, avant même le développement de lésions ostéolytiques et de tumeurs, lorsque ROBO4 est inhibé. Par conséquent, en dehors de son rôle dans l'envahissement tumoral, ROBO4 participe à la colonisation osseuse des cellules B02. Le récepteur ROBO4 interviendrait ainsi, dans l'ancrage et/ou la survie des cellules tumorales dans la moelle osseuse, à l'instar de son rôle dans les CSH (Smith-Berdan et al., 2011). De plus, lors de sa thèse, Bénédicte Eckel a démontré que l'inhibition de ROBO4 n'induisait pas la colonisation métastatique d'autres organes, ce qui a été confirmé ici par le suivi de la bioluminescence chez les animaux. Ces résultats semblent suggérer que l'inhibition de ROBO4 n'affecte pas l'ostéotropisme des cellules tumorales, mais bien la colonisation et/ou l'ancrage des cellules tumorales dans l'os. Il serait alors pertinent d'inhiber ROBO4 dans un autre modèle cellulaire, comme dans les cellules H278T, afin d'examiner si la colonisation d'autres organes secondaires est également réduite.

L'utilisation d'un biomatériau osseux humanisé greffé dans la souris renforce l'ensemble de ces observations en démontrant que la colonisation de ce dernier est plus efficace lorsque ROBO4 est présent dans les cellules tumorales. En conclusion, ce récepteur favorise également la dissémination métastatique dans un modèle d'os humanisé.

Cependant, les études menées ci-dessus présentent certaines limites expérimentales. Tout d'abord, le modèle cellulaire choisi pour notre étude est humain. Par conséquent, les

animaux utilisés dans nos protocoles sont immunodéprimés. Or, il est évident que le système immunitaire joue un rôle essentiel dans les processus de tumorigenèse. Par ailleurs, la méthode d'injection permet d'obtenir des métastases osseuses rapidement mais ne mime pas le processus physiologique de dissémination. De plus, les cellules B02 qui sont très mésenchymateuses, sont incapables de métastaser spontanément. Pour le futur, l'un des moyens de pallier ces limitations sera de développer un modèle syngénique. Les cellules 4T1 qui n'expriment pas *ROBO4* et métastasent spontanément permettraient de travailler dans un tel modèle. La surexpression de ce récepteur dans cette lignée, permettrait alors de mimer au mieux les étapes physiologiques de la dissémination, dans des souris avec un système immunitaire normal.

II- ROBO4 acteur de l'interaction cellulaire

Les expériences de co-cultures en 2D et 3D démontrent une perte d'interaction entre les cellules tumorales déplétées en *ROBO4* et les cellules résidentes de l'os : ostéoblastes, CSM et cellules de Schwann. Ces cellules de la moelle osseuse expriment toutes *SLIT2*, *ROBO1*, et *UNC5B*, des interacteurs connus de *ROBO4* (Jones et al., 2009; Koch et al., 2011; Sheldon et al., 2009). Or, comme nous l'avons vu précédemment l'interaction de *ROBO4* avec *SLIT2* est vivement controversée et les expériences de BiaCore n'ont pas mis en évidence d'interaction entre ces deux protéines (Suchting et al., 2005). De plus, une isoforme métastatique de *ROBO4* découverte au laboratoire ne présente pas le domaine de liaison à *SLIT2*, ce qui indique que l'interaction des cellules tumorales avec celles de la moelle osseuse ne passe pas par une signalisation directe *ROBO4/SLIT2*. Cependant certaines études ont montré que l'hétérodimérisation *ROBO4/ROBO1* est nécessaire à la signalisation *SLIT2* médiée par *ROBO4* dans les cellules endothéliales (Enomoto et al., 2016; Sheldon et al., 2009). Les cellules B02 exprimant *ROBO1*, des études de co-immunoprécipitations ont été réalisées au laboratoire mais n'ont à ce jour, pas permis de démontrer une interaction *ROBO4-ROBO1* dans les cellules B02. En revanche, la surexpression de *ROBO4* pourrait faciliter la détection d'une potentielle interaction entre ces deux récepteurs. Concernant *UNC5B*, l'isoforme métastatique de *ROBO4* ne possède pas non plus le domaine d'interaction avec ce récepteur. De plus, lors de sa thèse, Lise Clément-Demange a montré que l'inhibition de *UNC5B* dans les ostéoblastes ne perturbe

pas l'adhérence des cellules B02, suggérant que ce récepteur n'est pas impliqué dans ces interactions cellulaires.

Des études préliminaires réalisées au cours de ma thèse ont démontré que l'expression des molécules d'adhésion *ICAM1* et *VCAM1*, suite à la stimulation par du TNF- α , est significativement réduite dans les cellules B02 déplétées en ROBO4. Dans les cellules endothéliales, le TNF- α permet l'activation de Rac1 et la signalisation en aval permettant la transcription de *VCAM1* et *ICAM1* (Cernuda-Morollón and Ridley, 2006). Comme indiqué précédemment, dans un contexte pro-angiogénique ROBO4 permet l'activation de Rac1 (Kaur et al., 2006). Examiner, par la suite, le statut de phosphorylation de Rac1 dans les cellules B02-P/CTL et dans les KO apparaît ici de plus en plus pertinent. L'expression de *VCMA1* dans la moelle osseuse a été montrée, notamment dans les CSH. L'inhibition de cette molécule d'adhésion conduit à la mobilisation des CSH dans le sang périphérique, démontrant son rôle dans la maintenance de ces cellules dans la niche hématopoïétique (Ulyanova, 2005). Il est admis que pour s'ancrer aux cellules de la moelle osseuse, les cellules tumorales miment les moyens d'attachement des CSH, par conséquent *VCAM1* pourrait participer à l'interaction des cellules B02 avec les composants de la niche métastatique. Le principal ligand de *VCAM1* est l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, présente, entre-autres, dans les ostéoblastes (Keselowsky et al., 2005). De plus, dans le cadre de métastases osseuses, *VCAM1* est impliqué dans l'interaction hétérotypique des cellules tumorales avec l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ présente sur les pré-ostéoclastes et permet leur différenciation induisant le passage de la micro- à la macro-métastase (Lu et al., 2011). La présence d'*ICAM1* dans les cellules B02 pourrait également participer à l'interaction des cellules B02 avec les cellules résidentes de l'os par compétition avec les CSH. Ce phénomène a déjà été montré pour les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 (Dhawan et al., 2016). Reproduire les études de co-culture 2D et 3D en inhibant ces molécules dans les cellules B02-P/CTL ou en les surexprimant dans les cellules B02-KO nous renseignerait sur leur rôle dans les interactions hétérotypiques.

Par ailleurs, le TNF- α est une molécule sécrétée par les macrophages ainsi que les lymphocytes T dans un contexte inflammatoire et tumoral. Or les souris nude et NOD/SCID sont dépourvues de ces lymphocytes, de ce fait l'utilisation d'animaux avec un système immunitaire intact pourrait alors renforcer les résultats obtenus *in vivo*.

III- L'interaction homophile ROBO4-ROBO4 interfère-t-elle avec la formation de cluster de cellules B02 ?

Les expériences de formation de sphéroïdes en culture homotypique 3D montrent une diminution de l'interaction des cellules tumorales entre-elles lorsque ROBO4 est déplété ou inhibé par l'utilisation d'un anticorps spécifique le ciblant. De plus l'observation du cytosquelette d'actine des cellules B0-KO ou B02 traitées avec de l'anti-ROBO4 montre une différence de phénotype, avec des cellules moins étalées et plus isolées renforçant l'idée que ROBO4 est un acteur majeur de l'interaction cellulaire homotypique des cellules tumorales. La co-culture en 3D, B02-P-DiD/B02 CTL-DiO *versus* B02-P-DiD/B02 KO-DiO, montre une perte de 36% de sphères homotypiques formées lorsque ROBO4 est déplété dans les cellules B02. Ces résultats suggèrent donc une homodimérisation en trans du récepteur ROBO4 ainsi qu'un rôle direct en tant que molécule d'adhérence.

Récemment une interaction homophile CD44-CD44 entre cellules de cancer du sein a été mise en évidence, cette interaction promeut les processus de tumorigénèse et métastatique. La présence de cette molécule permet l'agrégation des cellules tumorales entre-elles dans la circulation sanguine et est nécessaire à la formation de métastases pulmonaires. De plus, *in vitro*, la capacité des cellules à former des grappes permet d'augmenter leur résistance à l'anoïkis (Liu et al., 2019). Nous avons également montré que ROBO4 était nécessaire à la croissance tumorale orthotopique et métastatique dans l'os suggérant un rôle similaire à celui du récepteur CD44. De plus, la signalisation sous-jacente de CD44 permet également l'activation de Rac1 et le remodelage du cytosquelette d'actine, indiquant un rôle redondant des deux récepteurs (Bourguignon, 2014). Ainsi nous proposons un modèle similaire, où les cellules tumorales KO ROBO4 seraient incapables d'interagir entre elles, de former une tumeur primaire cohésive, de former des amas dans le sang, diminuant leur capacité d'invasion, et finalement ne pourraient pas s'agréger dans l'organe secondaire. Une autre étude dans le cancer du sein démontre que les clusters cellulaires dans la circulation sanguine sont plus rapidement piégés dans les petits capillaires aux abords de l'organe secondaire, ce qui a pour conséquence de faciliter la croissance métastatique (Aceto et al., 2014). Des études plus approfondies d'imagerie intravitale suite à l'injection intra-artérielle de cellules B02 permettraient alors de mettre en évidence la formation de clusters cellulaires dépendants de la présence ROBO4 et ainsi,

confirmer les résultats obtenus *in vitro*. De plus, des tests de résistance à l'anoïkis pourraient également être pertinents.

IV- L'inhibition de ROBO4 dans les cellules B02 augmente-t-elle le phénotype mésenchymateux ?

Les cellules B02 présentent un phénotype extrêmement mésenchymateux. Or les images de microscopie confocale du cytosquelette d'actine montrent des cellules plus petites et moins jointives lorsque ROBO4 est inhibé par génétique inverse mais aussi par utilisation d'un anticorps anti-ROBO4. Le phénotype de ces cellules semble alors encore plus mésenchymateux. En parallèle, nous avons également montré une surexpression de gènes maîtres de la pluripotence : *OCT4*, *NOGGIN* et *NANOG* dans les cellules B02-KO en comparaison aux cellules B02-P et CTL. Or, plusieurs études ont mis en évidence que la transition épithélio-mésenchymateuse promeut l'acquisition du caractère souche des cellules cancéreuses (Mani et al., 2008). Ces données sont donc en accord avec l'idée d'un phénotype plus mésenchymateux des cellules invalidées en ROBO4.

Récemment, le Dr Blanpain et son équipe, ont mis en évidence que les cellules tumorales pouvaient être à différents stades de TEM, et qu'une TEM partielle augmente la capacité des cellules à migrer, coloniser l'organe secondaire (ici les poumons) et former des métastases (Pastushenko et al., 2018). Dans le cancer du sein, un stade d'EMT partielle permet aux cellules de migrer en cluster dans la circulation sanguine et par conséquent augmente leur résistance à l'anoïkis. *In vitro*, cette caractéristique est reflétée par une augmentation des capacités à former des sphéroïdes (Huang et al., 2013). De plus, le caractère cellule souche est corrélé à un stade de quiescence, où les cellules tumorales ne prolifèrent pas. Il a d'ailleurs été largement démontré que le processus de TEM induit un arrêt du cycle cellulaire en provoquant par exemple, la répression de cycline-D1 (Mejlvang et al., 2007). Les cellules quiescentes dans la tumeur primaire ou dans l'organe secondaire sont alors en dormance. Afin de proliférer, les DTC doivent réacquérir des propriétés épithéliales pour interagir entre-elles. Par exemple, les cellules MDA-MB-231 formant des métastases réexpriment la *E-Cadhérine* via l'hypométhylation de son promoteur *CDH1* (Graff et al., 2000).

L'ensemble des données collectées et les résultats obtenus pendant ma thèse, nous ont conduit à émettre l'hypothèse que l'inhibition de ROBO4 induit une TEM extrême des cellules B02. Leur incapacité à migrer en cluster les rendrait moins résistante à l'anoïkis et par conséquent peu de cellules seraient alors capables de coloniser un organe secondaire. Les cellules arrivant malgré tout à disséminer dans un site métastatique pourraient être bloquées en dormance sans réussir à réverser leur perte d'interaction et réactiver leur cycle cellulaire. Les cellules B02 étant déjà très mésenchymateuses, nous pouvons également imaginer que la présence de ROBO4 leur permet d'être cohésives et par conséquent de quitter l'état de dormance des DTC.

Afin de tester cette hypothèse plusieurs expériences se révèlent pertinentes. Premièrement si les cellules B02-KO sont, en réalité, des DTC, des essais de formation d'ostéolyse sur des temps plus long pourraient être réalisés. Cela nous permettrait de savoir si ces cellules sont capables de réverser leur phénotype et de donner des macro-métastases tardivement. Deuxièmement, il serait intéressant d'inhiber ROBO4 dans des cellules tumorales avec un phénotype épithélial, comme par exemple les MCF-7 et d'analyser leur évolution vers un état mésenchymateux. Si ROBO4 participe à l'augmentation de la TEM, il n'est pas impossible que son inhibition dans des cellules tumorales épithéliales les orientent vers un stade de TEM partielle les rendant alors plus agressives. Enfin, un autre point essentiel à prendre en considération est la chimiorésistance associée au caractère de cellules souches tumorales. Comme décrit précédemment, les cellules B02-KO ont une expression plus importante d'*OCT4* et de *NANOG*. Or, dans des cellules de carcinome épidermoïde oral résistantes à un traitement chimiothérapique de cisplatine, la présence de ces protéines est significativement augmentée (Tsai et al., 2011). Par conséquent, la chimiorésistance de cellules B02-KO pourrait être étudiée par l'analyse de leur profil SP, un index reflétant la capacité à effluer les drogues grâce à la présence de pompe ABC (ATP-Binding Cassette).

V- Vers une thérapie ciblée anti-ROBO4 ?

In vitro, la formation de sphéroïdes constituées de cellules B02-P est impactée par l'ajout d'un anticorps anti-ROBO4 dès la mise en culture ou après trois jours. En effet, cet anticorps induit une diminution de l'interaction cellulaire, à l'instar de celle observée pour les sphères formées par la lignée B02-KO. Par ailleurs, *in vivo*, l'incubation de cellules

MDA-MB-231 et B02 avec ce même anticorps, précèdent l'injection intra-artérielle des cellules, induit une diminution de la colonisation osseuse et de la niche ectopique humanisée respectivement. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de ROBO4 pourrait être une piste thérapeutique intéressante. Des données bibliographiques vont également dans ce sens. Une première étude démontre que l'immunisation de souris avec un vaccin contenant le domaine extracellulaire murin de ROBO4 couplé à des fragments Fc d'immunoglobulines humaines induit une réponse immunitaire et la sécrétion d'anticorps anti-ROBO4, sans effet secondaire. Chez les souris immunisées la prise tumorale, suite à l'injection de cellules de carcinome de Lewis syngéniques est alors fortement réduite (Zhuang et al., 2015). Une deuxième étude montre que l'injection d'un anticorps anti-ROBO4 tous les trois jours induit une diminution de la croissance tumorale de cellules humaines de cancer de la vessie injectées en sous-cutanée (Li et al., 2015). Ces résultats nous ont amenés à développer des anticorps humains anti-ROBO4, par le biais d'un travail collaboratif. Parmi tous les anticorps générés testés, trois paraissent pertinents car ils induisent une diminution de l'interaction cellulaire homotypique en culture 3D, au moins aussi importante que celle observée avec l'anticorps commercial. L'efficacité et la cytotoxicité de ces anticorps devront être testées *in vivo* dans un premier temps par l'injection intra-artérielle de cellules B02 pré-incubées avec ces anticorps. Selon les résultats que nous obtiendrons, une expérience avec injection orthotopique des cellules B02 suivie d'un traitement avec ces anticorps paraît judicieuse, compte tenu de l'effet inhibiteur de l'anticorps commercial sur des sphéroïdes déjà formées et sur les cellules de cancer de la vessie *in vivo*.

Cependant l'aspect clonal des cellules B02 ne reflète pas l'hétérogénéité tumorale présente chez les patientes. Il serait nécessaire de développer des modèles PDX avec des tumeurs de patientes, traitées avec de l'anticorps anti-ROBO4 avant injection chez la souris immunodéprimée. Le modèle de PDX est d'ores et déjà une technique innovante de médecine personnalisée permettant de prédire l'efficacité d'un traitement contre le cancer du sein chez la patiente en clinique (Punzi et al., 2019). Par conséquent l'utilisation d'un tel modèle dans notre étude renforcerait les données déjà acquises dans l'objectif futur de développer un outil thérapeutique.

Si les résultats de ces expériences à venir sont positifs, beaucoup de données seront cependant à prendre en considération avant d'envisager une thérapie ciblée contre

ROBO4. Tout d'abord ce récepteur est présent et participe à l'ancrage des CSH dans la moelle osseuse. Malgré une compensation de son inhibition par la surexpression du récepteur CXCR4, permettant également le maintien des CSH dans la niche hématopoïétique (Smith-Berdan et al., 2011), des études sur la mobilisation de ces cellules dans le sang périphérique des animaux, suite à un traitement anti-ROBO4, devront être réalisées. De même, le rôle de ROBO4 est essentiel au maintien de la vasculature. De ce fait une injection systémique d'anticorps anti-ROBO4 pourrait avoir des effets secondaires sur l'angiogenèse. Cependant une injection sous-cutanée pourrait être envisageable pour traiter la tumeur primaire mammaire. Dans le cas des métastases osseuses, des modèles d'éponges implantées dans l'os ont montré leur efficacité dans le cas d'un traitement SLIT3 pour l'ostéoporose et pourrait être transposable à notre modèle (Xu et al., 2018). Toutes ces perspectives demanderont donc de nombreuses mises au point à faire chez la souris.

Enfin, comme décrit dans le paragraphe ci-dessus il faudra au préalable tester l'effet de l'inhibition de ROBO4 sur d'autres lignées de cancer du sein hormono-dépendantes mais aussi avec un phénotype épithélial. Nous devons alors nous assurer qu'un traitement anti-ROBO4 n'induit pas la sélection de cellules souches tumorales, qui à terme, pourraient être plus agressives.

VI- Conclusion

Mon travail de doctorat a permis de démontrer le rôle majeur de ROBO4 dans la formation de tumeurs primaires mammaires mais surtout de métastases osseuses. Dès les stades précoces de dissémination osseuse, la présence de ROBO4 dans les cellules métastatiques B02 est nécessaire à la colonisation. Nous avons démontré que ROBO4 stimule l'expression des molécules d'adhésion *ICAM* et *VCAM* qui sont connues comme étant impliquées dans les interactions cellulaires hétérotypiques au sein de la moelle osseuse. L'expression de l'IL-6 ; cytokine pro-ostéoclastique, impliquée dans la croissance tumorale en favorisant la prolifération et la survie des cellules tumorales *via* STAT3, est également augmentée en présence de ROBO4. Enfin nous avons mis en évidence pour la première fois que l'interaction homophilique ROBO4-ROBO4 permet l'agrégation des

cellules tumorales entre-elles. Ces données nous suggèrent que cette interaction moléculaire permet i) aux cellules cancéreuses de former une tumeur primaire cohésive, ii) de migrer en cluster dans la circulation sanguine, leur permettant ainsi de résister à l'anoïkis, iii) d'être capable de coloniser la moelle osseuse et d'y former une tumeur secondaire (Figure 55).

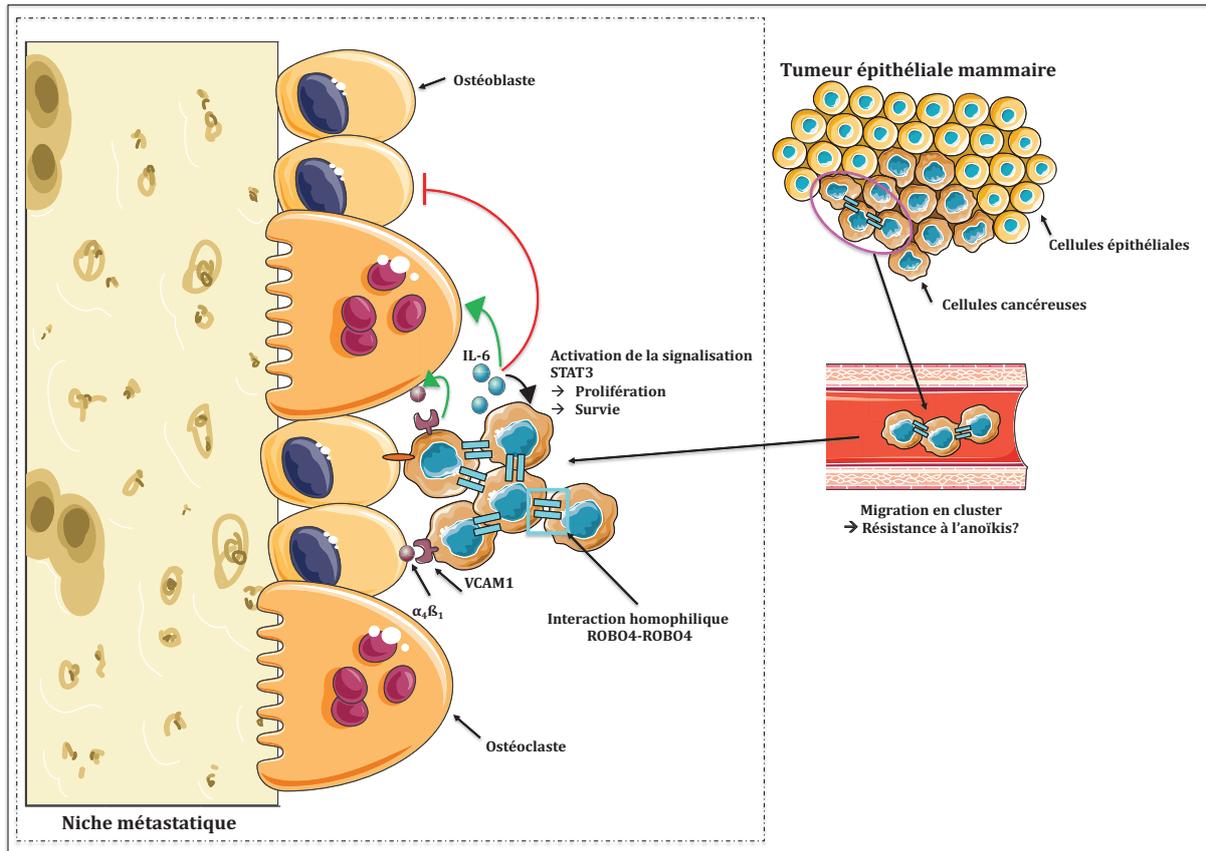


Figure 55 : Schéma hypothétique du rôle de la signalisation ROBO4 dans la formation de métastases osseuses. Les clusters de cellules formés par l'interaction ROBO4-ROBO4 s'échappent de la tumeur primaire et migrent en amas avec une meilleure résistance à l'anoïkis. Une fois dans l'os, les clusters pourront plus aisément former des macro-métastases. L'interaction des cellules tumorales avec les cellules résidentes de l'os pourrait se faire via la présence de VCAM1 et ICAM1. De plus la sécrétion d'IL-6 et la présence de VCAM1 stimulerait l'activation des ostéoclastes et donc la formation de plaque d'ostéolyse.

Dans un contexte pro-angiogénique, les données bibliographiques démontrent que dans les cellules endothéliales, la signalisation de ROBO4 conduit à l'activation de Rac1, induisant ainsi la formation de filopodes et lamellipodes. Or, les voies en aval de Rac1 permettent l'induction de la transcription de l'*IL-6*, *VCAM1* et *ICAM-1*. Par extrapolation, nous émettons maintenant l'hypothèse que dans les cellules tumorales, l'interaction homophile ROBO4-ROBO4 permet la signalisation du récepteur et donc l'activation de Rac1 par phosphorylation du GDP et par conséquent l'activation de la transcription des gènes précédemment cités.

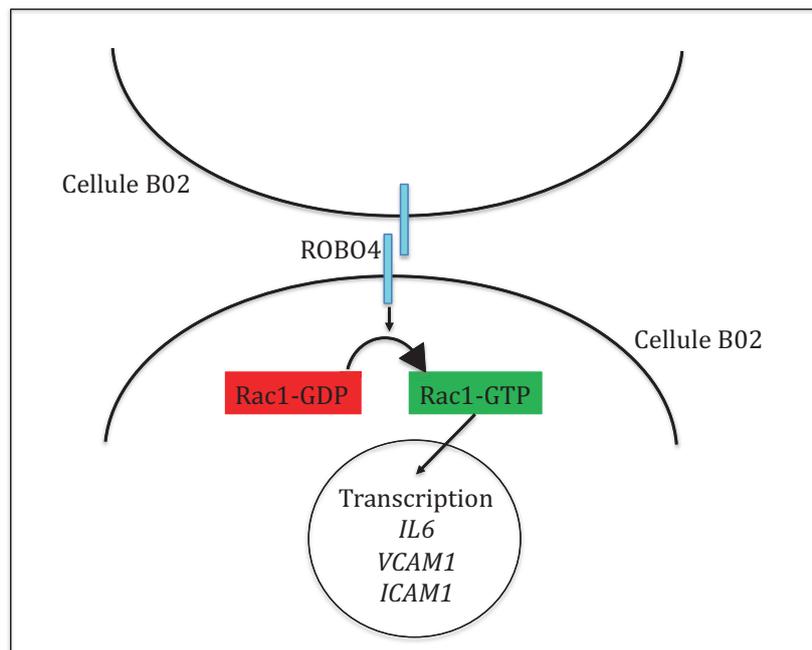


Figure 56 : Schéma hypothétique de la signalisation de ROBO4 induisant la transcription de l'*IL-6*, *VCAM1*, *ICAM1* dans les cellules B02. L'interaction ROBO4-ROBO4 permettrait la signalisation en aval du récepteur, passant par l'activation de Rac1.

Ces résultats très encourageants permettent d'envisager ROBO4 comme cible thérapeutique potentielle. Un traitement dirigé contre ce récepteur pourrait en effet, maintenir les cellules tumorales de cancer du sein triple négatif dans un état de dormance, les empêchant ainsi de proliférer et de former une tumeur.

Publications & communications scientifiques

Publications:

“Bone Metastases; Basic Aspects.”

Margaux Bernard, Paola Di Mauro, Caroline Reynaud, Chantal Diaz-Latoud, and Philippe Clézardin. (Encyclopedia of endocrine disease, 2019).

DOI: 10.1016/B978-0-12-812199-3.65819-X

“ROUNDAABOUT 4 MEDIATES THE HOMING OF HUMAN BREAST CANCER CELLS IN THE BONE MARROW.”

Margaux Bernard, François Le pape, Lise Clément-Demange, Lamia Bouazza, Sandra Geraci, Sofia Sousa, Martine Croset, Chantal Diaz-Latoud, Philippe Clézardin (Journal of Bone oncology, 2018)

DOI : [10.1016/j.jbo.2018.07.009](https://doi.org/10.1016/j.jbo.2018.07.009)

“ROBO4 mediates breast cancer metastasis to bone.”

Margaux Bernard^{1-3,9} Lise Clément-Demange,^{1-3,9} François Le Pape¹⁻³, Bénédicte Eckel,¹⁻³ Vincent Gonin,¹⁻³ Loïc Gaweda,¹⁻³ Casina Kan,¹⁻³ Vincent Oustric,⁴ Caroline Le-Bousse-Kerdilès,⁴ Keltouma Driouch,⁵ Françoise Descotes,⁶ Isabelle Treilleux,⁷ Martine Croset,¹⁻³ Chantal Diaz,^{1-3,*} and Philippe Clézardin^{1-3,8,*} , **soumis**.

Communications scientifiques :

Journée de l'école doctorale BMIC, POSTER

22 Novembre 2017, Lyon, France

“ROUNDAABOUT 4 RECEPTOR: NEW ACTOR IN BONE METASTATIC NICHE FORMATION.”

Journée Française des Maladies Osseuses (JFBTM), ORAL

21-23 Mars 2018, Monaco, France

“Roundabout 4 (ROBO4) Receptor: A new actor in bone metastasis formation.”

Cancer and Bone Society (CABS) annual meeting, ORAL

2-3 Juillet 2018, Oxford, Angleterre

“ROUNDAABOUT 4 (ROBO4) MEDIATES THE HOMING OF HUMAN BREAST CANCER CELLS IN THE BONE MARROW”

Références bibliographiques

- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D.T., Donaldson, M.C., Wittner, B.S., Spencer, J.A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., et al. (2014). Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell* 158, 1110–1122.
- Aiello, N.M., Maddipati, R., Norgard, R.J., Balli, D., Li, J., Yuan, S., Yamazoe, T., Black, T., Sahnoud, A., Furth, E.E., et al. (2018). EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Developmental Cell* 45, 681-695.e4.
- Aigner, K., Dampier, B., Descovich, L., Mikula, M., Sultan, A., Schreiber, M., Mikulits, W., Brabletz, T., Strand, D., Obrist, P., et al. (2007). The transcription factor ZEB1 (δ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 26, 6979–6988.
- Al-Mehdi, A.B., Tozawa, K., Fisher, A.B., Shientag, L., Lee, A., and Muschel, R.J. (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nature Medicine* 6, 100–102.
- Anderson, H.C., Sipe, J.B., Hessle, L., Dharmyramaju, R., Atti, E., Camacho, N.P., and Millán, J.L. (2004). Impaired Calcification Around Matrix Vesicles of Growth Plate and Bone in Alkaline Phosphatase-Deficient Mice. *The American Journal of Pathology* 164, 841–847.
- Arai, F., Miyamoto, T., Ohneda, O., Inada, T., Sudo, T., Brasel, K., Miyata, T., Anderson, D.M., and Suda, T. (1999). Commitment and Differentiation of Osteoclast Precursor Cells by the Sequential Expression of C-Fms and Receptor Activator of Nuclear Factor κ b (Rank) Receptors. *The Journal of Experimental Medicine* 190, 1741–1754.
- Aristokleous, I., and Saddiq, M. (2019). Quality of life after oncoplastic breast-conserving surgery: a systematic review. *ANZ Journal of Surgery*.
- Atkins, G.J., Anderson, P.H., Findlay, D.M., Welldon, K.J., Vincent, C., Zannettino, A.C.W., O’Loughlin, P.D., and Morris, H.A. (2007). Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: Evidence for autocrine and paracrine activities of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3. *Bone* 40, 1517–1528.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712.
- Bates, R.C., and Mercurio, A.M. (2003). Tumor Necrosis Factor- α Stimulates the Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Human Colonic Organoids. *Molecular Biology of the Cell* 14, 1790–1800.
- Bauer, K., Dowejko, A., Bosserhoff, A.-K., Reichert, T.E., and Bauer, R. (2011). Slit-2 facilitates interaction of P-cadherin with Robo-3 and inhibits cell migration in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Carcinogenesis* 32, 935–943.
- Bedell, V.M., Yeo, S.-Y., Park, K.W., Chung, J., Seth, P., Shivalingappa, V., Zhao, J., Obara, T., Sukhatme, V.P., Drummond, I.A., et al. (2005). roundabout4 is essential for angiogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 6373–6378.
- Bedi, B., Li, J.-Y., Tawfeek, H., Baek, K.-H., Adams, J., Vangara, S.S., Chang, M.-K., Kneissel, M., Weitzmann, M.N.,

and Pacifici, R. (2012). Silencing of parathyroid hormone (PTH) receptor 1 in T cells blunts the bone anabolic activity of PTH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, E725-733.

van Beek, E., Pieterman, E., Cohen, L., Löwik, C., and Papapoulos, S. (1999). Farnesyl Pyrophosphate Synthase Is the Molecular Target of Nitrogen-Containing Bisphosphonates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *264*, 108-111.

Bekker, P.J., Holloway, D.L., Rasmussen, A.S., Murphy, R., Martin, S.W., Leese, P.T., Holmes, G.B., Dunstan, C.R., and DePaoli, A.M. (2004). A Single-Dose Placebo-Controlled Study of AMG 162, a Fully Human Monoclonal Antibody to RANKL, in Postmenopausal Women. *Journal of Bone and Mineral Research* *19*, 1059-1066.

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 Research and Treatment* *101*, 135-148.

Bendre, M.S., Montague, D.C., Peery, T., Akel, N.S., Gaddy, D., and Suva, L.J. (2003). Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* *33*, 28-37.

Berry, D.A., Cronin, K.A., Plevritis, S.K., Fryback, D.G., Clarke, L., Zelen, M., Mandelblatt, J.S., Yakovlev, A.Y., Habbema, J.D.F., and Feuer, E.J. (2005). Effect of Screening and Adjuvant Therapy on Mortality from Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* *353*, 1784-1792.

Bhattacharya, R., Mukherjee, N., Dasgupta, H., Islam, Md.S., Alam, N., Roy, A., Das, P., Roychoudhury, S., and Panda, C.K. (2016). Frequent alterations of SLIT2-ROBO1-CDC42 signalling pathway in breast cancer: clinicopathological correlation. *Journal of Genetics* *95*, 551-563.

Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C.A., Engel, M.E., Arteaga, C.L., and Moses, H.L. (2001). Transforming Growth Factor- β 1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism. *Molecular Biology of the Cell* *12*, 27-36.

Bourguignon, L.Y.W. (2014). Matrix Hyaluronan-Activated CD44 Signaling Promotes Keratinocyte Activities and Improves Abnormal Epidermal Functions. *The American Journal of Pathology* *184*, 1912-1919.

Bowers, M., Zhang, B., Ho, Y., Agarwal, P., Chen, C.-C., and Bhatia, R. (2015). Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development. *Blood* *125*, 2678-2688.

Brix, G., Kiessling, F., Lucht, R., Darai, S., Wasser, K., Delorme, S., and Griebel, J. (2004). Microcirculation and microvasculature in breast tumors: Pharmacokinetic analysis of dynamic MR image series. *Magnetic Resonance in Medicine* *52*, 420-429.

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.

Brouns, S.J.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J.H., Snijders, A.P.L., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., and van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* *321*, 960-964.

Broxmeyer, H.E., Hangoc, G., Cooper, S., Campbell, T., Ito, S., and Mantel, C. (2007). AMD3100 and CD26 Modulate Mobilization, Engraftment, and Survival of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Mediated by the SDF-1/CXCL12-CXCR4 Axis. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1106*, 1-19.

Bu, G., Lu, W., Liu, 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. *International Journal of Cancer* 123, 1034–1042.

Buergy, D., Wenz, F., Groden, C., and Brockmann, M.A. (2012). Tumor-platelet interaction in solid tumors. *International Journal of Cancer* 130, 2747–2760.

Cadona, F.C. (2017). Overview of Locally Advanced Breast Cancer: A Huge Challenge to Science. *International Journal of Women's Health and Wellness* 3.

Cai, H., Liu, W., Xue, Y., Shang, X., Liu, J., Li, Z., Wang, P., Liu, L., Hu, Y., and Liu, Y. (2015a). Roundabout 4 Regulates Blood-Tumor Barrier Permeability Through the Modulation of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 Expression. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 74, 25–37.

Cai, H., Xue, Y., Li, Z., Hu, Y., Wang, Z., Liu, W., Li, Z., and Liu, Y. (2015b). Roundabout4 Suppresses Glioma-Induced Endothelial Cell Proliferation, Migration and Tube Formation *in Vitro* by Inhibiting VEGFR2-Mediated PI3K/AKT and FAK Signaling Pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry* 35, 1689–1705.

Cai, H., Xue, Y., Liu, W., Li, Z., Hu, Y., Li, Z., Shang, X., and Liu, Y. (2015c). Overexpression of Roundabout4 predicts poor prognosis of primary glioma patients via correlating with microvessel density. *Journal of Neuro-Oncology* 123, 161–169.

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.

Calvi, L.M., Bromberg, O., Rhee, Y., Weber, J.M., Smith, J.N.P., Basil, M.J., Frisch, B.J., and Bellido, T. (2012). Osteoblastic expansion induced by parathyroid hormone receptor signaling in murine osteocytes is not sufficient to increase hematopoietic stem cells. *Blood* 119, 2489–2499.

Cameron, M.D., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Nadkarni, K.V., Morris, V.L., Groom, A.C., Chambers, A.F., and MacDonald, I.C. (2000). Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 60, 2541–2546.

Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology* 2, 76–83.

Cappariello, A., Maurizi, A., Veeriah, V., and Teti, A. (2014). The Great Beauty of the osteoclast. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 558, 70–78.

Carioli, G., Malvezzi, M., Rodriguez, T., Bertuccio, P., Negri, E., and La Vecchia, C. (2017). Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality in Europe. *The Breast* 36, 89–95.

Cernuda-Morollón, E., and Ridley, A.J. (2006). Rho GTPases and Leukocyte Adhesion Receptor Expression and Function in Endothelial Cells. *Circulation Research* 98, 757–767.

Chambers, T.J., Chambers, J.C., Symonds, J., and Darby, J.A. (1986). The Effect of Human Calcitonin on the Cytoplasmic Spreading of Rat Osteoclasts*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 63, 1080–1085.

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. *Journal of Bone and Mineral Research* 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. *Molecular Cancer* 9, 179.

Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Bertucci, F., Cabaud, O., Wicinski, J., Finetti, P., Josselin, E., Adelaide, J., Nguyen, T.-T., Monville, F., et al. (2013). ALDH1-Positive Cancer Stem Cells Predict Engraftment of Primary Breast Tumors and Are Governed by a Common Stem Cell Program. *Cancer Research* 73, 7290–7300.

Chédotal, A. (2007). Slits and Their Receptors. In *Axon Growth and Guidance*, D. Bagnard, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 65–80.

Chen, C.-Y., Tsai, C.-H., Chen, C.-Y., Wu, Y.-H., and Chen, C.-P. (2016). Human placental multipotent mesenchymal stromal cells modulate placenta angiogenesis through Slit2-Robo signaling. *Cell Adh Migr* 10, 66–76.

Chen, Y.-K., Hou, H.-A., Tang, J.-L., Jhuang, J.-Y., Lai, Y.-J., Lee, M.-C., Kuo, Y.-Y., Chou, W.-C., Liu, C.-Y., Lin, C.-W., et al. (2015). Clinical and Prognostic Implications of Roundabout 4 (Robo4) in Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia. *PLOS ONE* 10, e0119831.

Cheng, Y., Liu, Z., Wang, S., Wang, C., Qi, S., Zhao, J., Tian, R., and Su, G. (2013). Effect of Robo4 on Retinal Endothelial Permeability. *Current Eye Research* 38, 128–136.

Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3, S131–S139.

Coleman, R., Cameron, D., Dodwell, D., Bell, R., Wilson, C., Rathbone, E., Keane, M., Gil, M., Burkinshaw, R., Grieve, R., et al. (2014). Adjuvant zoledronic acid in patients with early breast cancer: final efficacy analysis of the AZURE (BIG 01/04) randomised open-label phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 15, 997–1006.

Coleman, R.E., Smith, P., and Rubens, R.D. (1998). Clinical course and prognostic factors following bone recurrence from breast cancer. *Br. J. Cancer* 77, 336–340.

Cox, T.R., Rumney, R.M.H., Schoof, E.M., Perryman, L., Høye, A.M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N.A., Forrest, H., Evans, H.R., et al. (2015). The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature* 522, 106–110.

Croset, M., Goehrig, D., Frackowiak, A., Bonnelye, E., Ansieau, S., Puisieux, A., and Clézardin, P. (2014). *TWIST1* Expression in Breast Cancer Cells Facilitates Bone Metastasis Formation: TWIST AND BONE METASTASIS. *Journal of Bone and Mineral Research* 29, 1886–1899.

Croset, M., Pantano, F., Kan, C.W.S., Bonnelye, E., Descotes, F., Alix-Panabières, C., Lecellier, C.-H., Bachelier, R., Allioli, N., Hong, S.-S., et al. (2018). miRNA-30 Family Members Inhibit Breast Cancer Invasion, Osteomimicry, and Bone Destruction by Directly Targeting Multiple Bone Metastasis-Associated Genes. *Cancer Research* 78, 5259–5273.

Dallas, S.L., Rosser, J.L., Mundy, G.R., and Bonewald, L.F. (2002). Proteolysis of Latent Transforming Growth Factor- β (TGF- β)-binding Protein-1 by Osteoclasts: A CELLULAR MECHANISM FOR RELEASE OF TGF- β FROM BONE MATRIX. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21352–21360.

Dallol, A., Morton, D., Maher, E.R., and Latif, F. (2003). SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res.* 63, 1054–1058.

De Craene, B., van Roy, F., and Berx, G. (2005). Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cellular Signalling* 17, 535–547.

Delaissé, J.-M., Andersen, T.L., Engsig, M.T., Henriksen, K., Troen, T., and Blavier, L. (2003). Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities: MMPs and Cathepsin in Osteoclastic Activity. *Microscopy Research and Technique* 61, 504–513.

Dhawan, A., Friedrichs, J., Bonin, M. von, Bejestani, E.P., Werner, C., Wobus, M., Chavakis, T., and Bornhäuser, M. (2016). Breast cancer cells compete with hematopoietic stem and progenitor cells for intercellular adhesion molecule 1-mediated binding to the bone marrow microenvironment. *Carcinogenesis* 37, 759–767.

Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 457–462.

Dobnig, H., and Turner, R.T. (1995). Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 136, 3632–3638.

Dong, R., Wang, Q., He, X.L., Chu, Y.K., Lu, J.G., and Ma, Q.J. (2007). Role of nuclear factor kappa B and reactive oxygen species in the tumor necrosis factor-alpha-induced epithelial-mesenchymal transition of MCF-7 cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40, 1071–1078.

Dubrovskaya, A., Cojoc, M., Peitzsch, Trautmann, F., Polishchuk, and Telegeev (2013). Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *OncoTargets and Therapy* 1347.

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.

Enomoto, S., Mitsui, K., Kawamura, T., Iwanari, H., Daigo, K., Horiuchi, K., Minami, T., Kodama, T., and Hamakubo, T. (2016). Suppression of Slit2/Robo1 mediated HUVEC migration by Robo4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469, 797–802.

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.

Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J., and Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews* 38, 698–707.

Farrar, J.D., Katz, K.H., Windsor, J., Thrush, G., Scheuermann, R.H., Uhr, J.W., and Street, N.E. (1999). Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8+ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state. *J. Immunol.* 162, 2842–2849.

Faruqi, T.R., Gomez, D., Bustelo, X.R., Bar-Sagi, D., and Reich, N.C. (2001). Rac1 mediates STAT3 activation by autocrine IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 9014–9019.

Fife, C.M., McCarroll, J.A., and Kavallaris, M. (2014). Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis: Cytoskeleton and cancer metastasis. *British Journal of Pharmacology* 171, 5507–5523.

Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., and Cerri, P.S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015, 421746.

Flores, M.E., Norgård, M., Heinegård, D., Reinholt, F.P., and Andersson, G. (1992). RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin. *Experimental Cell Research* 201, 526–530.

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. *Journal of Biological Chemistry* 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.

Garcia, T., Jackson, A., Bachelier, R., Clément-Lacroix, P., Baron, R., Clézardin, P., and Pujuguet, P. (2008). A convenient clinically relevant model of human breast cancer bone metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* 25, 33–42.

Garimella, R., Bi, X., Anderson, H.C., and Camacho, N.P. (2006). Nature of phosphate substrate as a major determinant of mineral type formed in matrix vesicle-mediated in vitro mineralization: An FTIR imaging study. *Bone* 38, 811–817.

Gaur, T., Lengner, C.J., Hovhannisyann, H., Bhat, R.A., Bodine, P.V.N., Komm, B.S., Javed, A., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., et al. (2005). Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating *Runx2* Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* 280, 33132–33140.

Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B., Senn, H.-J., and Panel members (2011). Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology* 22, 1736–1747.

Gong, Q., Xie, J., Li, Y., Liu, Y., and Su, G. (2019a). Enhanced ROBO4 is mediated by up-regulation of HIF-1 α /SP1 or reduction in miR-125b-5p/miR-146a-5p in diabetic retinopathy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.

Gong, Q., Li, F., Xie, J., and Su, G. (2019b). Upregulated VEGF and Robo4 correlate with the reduction of miR-15a in the development of diabetic retinopathy. *Endocrine*.

Gonzalez-Angulo, A.M., Morales-Vasquez, F., and Hortobagyi, G.N. (2007). Overview of Resistance to Systemic Therapy in Patients with Breast Cancer. In *Breast Cancer Chemosensitivity*, D. Yu, and M.-C. Hung, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 1–22.

Gout, S., Tremblay, P.-L., and Huot, J. (2008). Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* 25, 335–344.

Graff, J.R., Gabrielson, E., Fujii, H., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2000). Methylation Patterns of the E-cadherin 5' CpG Island Are Unstable and Reflect the Dynamic, Heterogeneous Loss of E-cadherin Expression during Metastatic Progression. *Journal of Biological Chemistry* 275, 2727–2732.

Guaita, S., Puig, I., Francí, C., Garrido, M., Domínguez, D., Batlle, E., Sancho, E., Dedhar, S., de Herreros, A.G., and Baulida, J. (2002). Snail Induction of Epithelial to Mesenchymal Transition in Tumor Cells Is Accompanied by *MUC1* Repression and *ZEB1* Expression. *Journal of Biological Chemistry* 277, 39209–39216.

Guise, T.A., Yin, J.J., Taylor, S.D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B.F., Yoneda, T., and Mundy, G.R. (1996). Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *Journal of Clinical Investigation* 98, 1544–1549.

Halleen, J.M., Räsänen, S., Salo, J.J., Reddy, S.V., Roodman, G.D., Hentunen, T.A., Lehenkari, P.P., Kaija, H., Vihko, P., et al. (1999). Intracellular Fragmentation of Bone Resorption Products by Reactive Oxygen Species Generated by Osteoclastic Tartrate-resistant Acid Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 274,

22907–22910.

Hartman, Z.C., Poage, G.M., den Hollander, P., Tsimelzon, A., Hill, J., Panupinthu, N., Zhang, Y., Mazumdar, A., Hilsenbeck, S.G., Mills, G.B., et al. (2013). Growth of Triple-Negative Breast Cancer Cells Relies upon Coordinate Autocrine Expression of the Proinflammatory Cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Research* 73, 3470–3480.

Hassiotou, F., and Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy* 26, 29–48.

Hattersley, G., Owens, J., Flanagan, A.M., and Chambers, T.J. (1991). Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 177, 526–531.

Hessle, L., Johnson, K.A., Anderson, H.C., Narisawa, S., Sali, A., Goding, J.W., Terkeltaub, R., and Millan, J.L. (2002). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 9445–9449.

Holmgren, L., O'Reilly, M.S., and Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Medicine* 1, 149–153.

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.

Huang, R.Y.-J., Guilford, P., and Thiery, J.P. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science* 125, 4417–4422.

Huang, R.Y.-J., Wong, M.K., Tan, T.Z., Kuay, K.T., Ng, A.H.C., Chung, V.Y., Chu, Y.-S., Matsumura, N., Lai, H.-C., Lee, Y.F., et al. (2013). An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death & Disease* 4, e915–e915.

Huminiecki, L., Gorn, M., Suchting, S., Poulos, 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. *Journal of Biological Chemistry* 281, 39693–39698.

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. *Journal of Biological Chemistry* 284, 14637–14644.

Itkin, T., Gur-Cohen, S., Spencer, J.A., Schajnovitz, A., Ramasamy, S.K., Kusumbe, A.P., Ledergor, G., Jung, Y., Milo, I., Poulos, M.G., et al. (2016). Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature* 532, 323–328.

Jensen, A.B., Wynne, C., Ramirez, G., He, W., Song, Y., Berd, Y., Wang, H., Mehta, A., and Lombardi, A. (2010). The Cathepsin K Inhibitor Odanacatib Suppresses Bone Resorption in Women With Breast Cancer and Established Bone Metastases: Results of a 4-Week, Double-Blind, Randomized, Controlled Trial. *Clinical Breast Cancer* 10, 452–458.

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., et al. (2008). Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. *Nature Medicine* 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.

Jung, Y., Wang, J., Song, J., Shiozawa, Y., Wang, J., Havens, A., Wang, Z., Sun, Y.-X., Emerson, S.G., Krebsbach, P.H., et al. (2007). Annexin II expressed by osteoblasts and endothelial cells regulates stem cell adhesion, homing, and engraftment following transplantation. *Blood* 110, 82–90.

Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation* 119, 1420–1428.

Kaneshiro, S., Ebina, K., Shi, K., Higuchi, C., Hirao, M., Okamoto, M., Koizumi, K., Morimoto, T., Yoshikawa, H., and Hashimoto, J. (2014). IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 32, 378–392.

Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Cordon-Cardo, C., Guise, T.A., and Massagué, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3, 537–549.

Karsdal, M.A., Larsen, L., Engsig, M.T., Lou, H., Ferreras, M., Lochter, A., Delaissé, J.-M., and Foged, N.T. (2002). Matrix Metalloproteinase-dependent Activation of Latent Transforming Growth Factor- β Controls the Conversion of Osteoblasts into Osteocytes by Blocking Osteoblast Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44061–44067.

Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.-M., Hidalgo, A., Peired, A.J., Thomas, S.A., and Frenette, P.S. (2006). Signals from the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress from Bone Marrow. *Cell* 124, 407–421.

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. *Journal of Biological Chemistry* 281, 11347–11356.

Keselowsky, B.G., Collard, D.M., and Garcia, A.J. (2005). Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 5953–5957.

Khosla, S. (2001). Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 142, 5050–5055.

Kim, W., Takyar, F.M., Swan, K., Jeong, J., VanHouten, J., Sullivan, C., Dann, P., Yu, H., Fiaschi-Taesch, N., Chang, W., et al. (2016). Calcium-Sensing Receptor Promotes Breast Cancer by Stimulating Intracrine Actions of Parathyroid Hormone-Related Protein. *Cancer Research* 76, 5348–5360.

Kim, Y.-N., Koo, K.H., Sung, J.Y., Yun, U.-J., and Kim, H. (2012). Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis. *International Journal of Cell Biology* 2012, 1–11.

Kini, U., and Nandeesh, B.N. (2012). Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*, I. Fogelman, G. Gnanasegaran, and H. van der Wall, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 29–57.

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.

Kotsakis, A., Ardavanis, A., Koumakis, G., Samantas, E., Psyrris, A., and Papadimitriou, C. (2019). Epidemiological characteristics, clinical outcomes and management patterns of metastatic breast cancer patients in routine clinical care settings of Greece: Results from the EMERGE multicenter retrospective chart review study. *BMC Cancer* 19.

Krafft, U., Reis, H., Ingenwerth, M., Kovalszky, I., Becker, M., Niedworok, C., Darr, C., Nyirády, P., Hadaschik, B., and Szarvas, T. (2018). Nuclear Localization of Robo is Associated with Better Survival in Bladder Cancer. *Pathology & Oncology Research*.

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.

Lee, S.K., and Lorenzo, J.A. (1999). Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140, 3552–3561.

Leung, P., Pickarski, M., Zhuo, Y., Masarachia, P.J., and Duong, L.T. (2011). The effects of the cathepsin K inhibitor odanacatib on osteoclastic bone resorption and vesicular trafficking. *Bone* 49, 623–635.

Li, S., Lu, J., Chen, Y., Xiong, N., Li, L., Zhang, J., Yang, H., Wu, C., Zeng, H., and Liu, Y. (2017). MCP-1-induced ERK/GSK-3 β /Snail signaling facilitates the epithelial–mesenchymal transition and promotes the migration of MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cellular & Molecular Immunology* 14, 621–630.

Li, W., Chen, Z., Yuan, J., Yu, Z., Cheng, C., Zhao, Q., Huang, L., Hajjar, K.A., Chen, Z., Lo, E.H., et al. (2018). Annexin A2 is a Robo4 ligand that modulates ARF6 activation-associated cerebral trans-endothelial permeability. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 0271678X1877791.

Li, X., Loberg, R., Liao, J., Ying, C., Snyder, L.A., Pienta, K.J., and McCauley, L.K. (2009). A Destructive Cascade Mediated by CCL2 Facilitates Prostate Cancer Growth in Bone. *Cancer Research* 69, 1685–1692.

Li, X.-Q., Lu, J.-T., Tan, C.-C., Wang, Q.-S., and Feng, Y.-M. (2016). RUNX2 promotes breast cancer bone metastasis by increasing integrin $\alpha 5$ -mediated colonization. *Cancer Letters* 380, 78–86.

Li, Y., Cheng, H., Xu, W., Tian, X., Li, X., and Zhu, C. (2015). Expression of Robo protein in bladder cancer tissues and its effect on the growth of cancer cells by blocking Robo protein. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 9932–9940.

Liu, X., Taftaf, R., Kawaguchi, M., Chang, Y.-F., Chen, W., Entenberg, D., Zhang, Y., Gerratana, L., Huang, S., Patel, D.B., et al. (2019). Homophilic CD44 Interactions Mediate Tumor Cell Aggregation and Polyclonal Metastasis in Patient-Derived Breast Cancer Models. *Cancer Discovery* 9, 96–113.

Lord, B.I., Testa, N.G., and Hendry, J.H. (1975). The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood* 46, 65–72.

Lu, X., Wang, Q., Hu, G., Van Poznak, C., Fleisher, M., Reiss, M., Massague, J., and Kang, Y. (2009). ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes & Development* 23, 1882–1894.

Lu, X., Mu, E., Wei, Y., Riethdorf, S., Yang, Q., Yuan, M., Yan, J., Hua, Y., Tiede, B.J., Lu, X., et al. (2011). VCAM-1 Promotes Osteolytic Expansion of Indolent Bone Micrometastasis of Breast Cancer by Engaging $\alpha 4\beta 1$ -Positive Osteoclast Progenitors. *Cancer Cell* 20, 701–714.

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.

Maiti, G.P., Ghosh, A., Mondal, P., Ghosh, S., Chakraborty, J., Roy, A., Roychowdhury, S., and Panda, C.K. (2015). Frequent inactivation of SLIT2 and ROBO1 signaling in head and neck lesions: clinical and prognostic implications. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 119, 202–212.

Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct* 1, 7.

Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy* 10, 955–960.

Manalo, D.J. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659–669.

Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 133, 704–715.

Marraffini, L.A., and Sontheimer, E.J. (2008). CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA. *Science* 322, 1843–1845.

Matic, I., Matthews, B.G., Wang, X., Dymont, N.A., Worthley, D.L., Rowe, D.W., Grcevic, D., and Kalajzic, I. (2016). Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood: Bone Lining Cells and Osteogenesis. *STEM CELLS* 34, 2930–2942.

McNiven, M.A. (2013). Breaking away: matrix remodeling from the leading edge. *Trends in Cell Biology* 23, 16–21.

Mejlvang, J., Kriaevska, M., Vandewalle, C., Chernova, T., Sayan, A.E., Berx, G., Mellon, J.K., and Tulchinsky, E. (2007). Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. *Mol. Biol. Cell* 18, 4615–4624.

Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., and Frenette, P.S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 452, 442–447.

Mendoza-Villanueva, D., Zeef, L., and Shore, P. (2011). Metastatic breast cancer cells inhibit osteoblast differentiation through the Runx2/CBF β -dependent expression of the Wnt antagonist, sclerostin. *Breast Cancer Research* 13.

Mitri, Z., Nanda, R., Blackwell, K., Costelloe, C.M., Hood, I., Wei, C., Brewster, A.M., Ibrahim, N.K., Koenig, K.B., Hortobagyi, G.N., et al. (2016). TBCRC-010: Phase I/II Study of Dasatinib in Combination with Zoledronic Acid for the Treatment of Breast Cancer Bone Metastasis. *Clinical Cancer Research* 22, 5706–5712.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 14923–14928.

Mullard, A. (2016). Merck & Co. drops osteoporosis drug odanacatib. *Nature Reviews Drug Discovery* 15, 669–669.

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.

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.

Nather, A., Ong, H.J.C., and Aziz, Z. (2005). Structure of Bone. In *Bone Grafts And Bone Substitutes*, (WORLD SCIENTIFIC), pp. 3–17.

Nishio, Y., Dong, Y., Paris, M., O’Keefe, R.J., Schwarz, E.M., and Drissi, H. (2006). Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene* 372, 62–70.

Nowell, P. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.

Nur Husna, S.M., Tan, H.-T.T., Mohamud, R., Dyhl-Polk, A., and Wong, K.K. (2018). Inhibitors targeting CDK4/6, PARP and PI3K in breast cancer: a review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 10, 175883591880850.

Ocaña, O.H., Córcoles, R., Fabra, Á., 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.

O’Carrigan, B., Wong, M.H., Willson, M.L., Stockler, M.R., Pavlakis, N., and Goodwin, A. (2017). Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

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. *Circulation Research* 100, 1712–1722.

Okada, Y., Naruse, H., Tanaka, T., Funahashi, N., Regan, E.R., Yamakawa, K., Hino, N., Ishimoto, K., Doi, T., and Aird, W.C. (2015). Expression of the Robo4 receptor in endothelial cells is regulated by two AP-1 protein complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467, 987–991.

Okubo, Y., Bessho, K., Fujimura, K., Kusumoto, K., Ogawa, Y., and Iizuka, T. (2000). Effect of Elcatonin on Osteoinduction by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269, 317–321.

Pacifici, R. (2009). Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 11, 1043–1051.

Park, H.R., Min, S.K., Cho, H.D., Kim, D.H., Shin, H.S., and Park, Y.E. (2003a). Expression of Osteoprotegerin and RANK Ligand in Breast Cancer Bone Metastasis. *Journal of Korean Medical Science* 18, 541.

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. (2003b). Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Developmental Biology* 261, 251–267.

Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S., et al. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* 556, 463–468.

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. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 64, 124–131.

Pereira, R.M.R., Delany, A.M., and Canalis, E. (2001). Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone* 28, 484–490.

Peyruchaud, O., Serre, C.-M., NicAmhlaoibh, R., Fournier, P., and Clézardin, P. (2003). Angiostatin Inhibits Bone Metastasis Formation in Nude Mice through a Direct Anti-osteoclastic Activity. *Journal of Biological Chemistry* 278, 45826–45832.

Phimphilai, M., Zhao, Z., Boules, H., Roca, H., and Franceschi, R.T. (2006). BMP Signaling Is Required for RUNX2-Dependent Induction of the Osteoblast Phenotype. *Journal of Bone and Mineral Research* 21, 637–646.

Pircher, A., Schäfer, G., Eigentler, A., Pichler, R., Pühr, M., Steiner, E., Horninger, W., Gunsilius, E., Klocker, H., and Heidegger, I. (2019). Robo 4 - the double-edged sword in prostate cancer: impact on cancer cell aggressiveness and tumor vasculature. *International Journal of Medical Sciences* 16, 115–124.

Poole, K.E.S., van Bezooijen, R.L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., Löwik, C.W., and Reeve, J. (2005). Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *The FASEB Journal* 19, 1842–1844.

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. *Journal of Biological Chemistry* 279, 9115–9124.

Price, T.T., Burness, M.L., Sivan, A., Warner, M.J., Cheng, R., Lee, C.H., Olivere, L., Comatas, K., Magnani, J., Kim Lyerly, H., et al. (2016). Dormant breast cancer micrometastases reside in specific bone marrow niches that regulate their transit to and from bone. *Science Translational Medicine* 8, 340ra73-340ra73.

Punzi, S., Meliksetian, M., Riva, L., Marocchi, F., Pruneri, G., Criscitiello, C., Orsi, F., Spaggiari, L., Casiraghi, M., Della Vigna, P., et al. (2019). Development of Personalized Therapeutic Strategies by Targeting Actionable Vulnerabilities in Metastatic and Chemotherapy-Resistant Breast Cancer PDXs. *Cells* 8, 605.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013a). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 8, 2281–2308.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., et al. (2013b). Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell* 154, 1380–1389.

Rauch, A., Seitz, S., Baschant, U., Schilling, A.F., Illing, A., Stride, B., Kirilov, M., Mandic, V., Takacz, A., Schmidt-Ullrich, R., et al. (2010). Glucocorticoids Suppress Bone Formation by Attenuating Osteoblast Differentiation via the Monomeric Glucocorticoid Receptor. *Cell Metabolism* 11, 517–531.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111.

Ribatti, D., Mangialardi, G., and Vacca, A. (2006). Stephen Paget and the ‘seed and soil’ theory of metastatic dissemination. *Clinical and Experimental Medicine* 6, 145–149.

Robey, P.G., Fedarko, N.S., Hefferan, T.E., Bianco, P., Vetter, U.K., Grzesik, W., Friedenstein, A., van der Pluijm, G., Mintz, K.P., Young, M.F., et al. (2009). Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *Journal*

of Bone and Mineral Research 8, S483–S487.

Salo, J. (1997). Removal of Osteoclast Bone Resorption Products by Transcytosis. *Science* 276, 270–273.

Saltel, F., Chabadel, A., Bonnelye, E., and Jurdic, P. (2008). Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: A model to decipher transmigration and matrix degradation. *European Journal of Cell Biology* 87, 459–468.

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. *Journal of Biological Chemistry* 286, 30740–30747.

Sanchez-Tillo, E., de Barrios, O., Siles, L., Cuatrecasas, M., Castells, A., and Postigo, A. (2011). -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 19204–19209.

Savci-Heijink, C.D., Halfwerk, H., Koster, J., and van de Vijver, M.J. (2016). A novel gene expression signature for bone metastasis in breast carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment* 156, 249–259.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.

Schoppmann, S.F., Bayer, G., Aumayr, K., Taucher, S., Geleff, S., Rudas, M., Kubista, E., Hausmaninger, H., Samonigg, H., Gnant, M., et al. (2004). Prognostic Value of Lymphangiogenesis and Lymphovascular Invasion in Invasive Breast Cancer: *Annals of Surgery* 240, 306–312.

Schott, A.F., Barlow, W.E., Van Poznak, C.H., Hayes, D.F., Moinpour, C.M., Lew, D.L., Dy, P.A., Keller, E.T., Keller, J.M., and Hortobagyi, G.N. (2016). Phase II studies of two different schedules of dasatinib in bone metastasis predominant metastatic breast cancer: SWOG S0622. *Breast Cancer Research and Treatment* 159, 87–95.

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.

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. *The FASEB Journal* 23, 513–522.

Shevde, N.K., Bendixen, A.C., Dienger, K.M., and Pike, J.W. (2000). Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 7829–7834.

Shi, R., Yang, Z., Liu, W., Liu, B., Xu, Z., and Zhang, Z. (2014). Knockdown of Slit2 promotes growth and motility in gastric cancer cells via activation of AKT/ β -catenin. *Oncology Reports* 31, 812–818.

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* 27, 183–190.

Shirakura, K., Ishiba, R., Kashio, T., Sakai, M., Fukushima, Y., Yamamoto, N., Manabe, S., Shigesada, N., Tanaka, T., Hino, N., et al. (2018). Endothelial Robo4 regulates IL-6 production by endothelial cells and monocytes via a crosstalk mechanism in inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495, 801–806.

Shirakura, K., Ishiba, R., Kashio, T., Funatsu, R., Tanaka, T., Fukada, S., Ishimoto, K., Hino, N., Kondoh, M., Ago, Y., et al. (2019). The Robo4–TRAF7 complex suppresses endothelial hyperpermeability in inflammation. *Journal of Cell Science* 132, jcs220228.

Smid, M., Wang, Y., Zhang, Y., Sieuwerts, A.M., Yu, J., Klijn, J.G.M., Foekens, J.A., and Martens, J.W.M. (2008). Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Research* 68, 3108–3114.

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., Nguyen, A., Hong, M.A., and Forsberg, E.C. (2015). ROBO4-Mediated Vascular Integrity Regulates the Directionality of Hematopoietic Stem Cell Trafficking. *Stem Cell Reports* 4, 255–268.

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 10869–10874.

Steeve, K.T., Marc, P., Sandrine, T., Dominique, H., and Yannick, F. (2004). IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15, 49–60.

Stopeck, A.T., Lipton, A., Body, J.-J., Steger, G.G., Tonkin, K., de Boer, R.H., Lichinitser, M., Fujiwara, Y., Yardley, D.A., Viniegra, 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. *Journal of Clinical Oncology* 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. *The FASEB Journal* 19, 121–123.

Sundaram, K., Nishimura, R., Senn, J., Youssef, R.F., London, S.D., and Reddy, S.V. (2007). RANK ligand signaling modulates the matrix metalloproteinase-9 gene expression during osteoclast differentiation. *Experimental Cell Research* 313, 168–178.

Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., et al. (2002). Induction and Activation of the Transcription Factor NFATc1 (NFAT2) Integrate RANKL Signaling in Terminal Differentiation of Osteoclasts. *Developmental Cell* 3, 889–901.

Tan, C.-C., Li, G.-X., Tan, L.-D., Du, X., Li, X.-Q., He, R., Wang, Q.-S., and Feng, Y.-M. (2016). Breast cancer cells obtain an osteomimetic feature *via* epithelial-mesenchymal transition that have undergone BMP2/RUNX2 signaling pathway induction. *Oncotarget* 7.

Tanaka, T., Maekawa, N., Kashio, T., Izawa, K., Ishiba, R., Shirakura, K., Ishimoto, K., Hino, N., Aird, W.C., Doi, T., et al. (2017). Tumor Necrosis Factor α Induces the Expression of the Endothelial Cell-Specific Receptor Roundabout4 through the Nuclear Factor- κ B Pathway. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 40, 504–509.

Tanaka, T., Izawa, K., Maniwa, Y., Okamura, M., Okada, A., Yamaguchi, T., Shirakura, K., Maekawa, N., Matsui, H., Ishimoto, K., et al. (2018). ETV2-TET1/TET2 Complexes Induce Endothelial Cell-Specific Robo4 Expression via Promoter Demethylation. *Scientific Reports* 8.

Tang, Y., Wu, X., Lei, W., Pang, L., Wan, C., Shi, Z., Zhao, L., Nagy, T.R., Peng, X., Hu, J., et al. (2009). TGF- β 1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nature Medicine* 15, 757–765.

Thomas, R.J., Guise, T.A., Yin, J.J., Elliott, J., Horwood, N.J., Martin, T.J., and Gillespie, M.T. (1999). Breast Cancer Cells Interact with Osteoblasts to Support Osteoclast Formation ¹. *Endocrinology* 140, 4451–4458.

Tian, R., Liu, Z., Zhang, H., Fang, X., Wang, C., Qi, S., Cheng, Y., and Su, G. (2015). Investigation of the Regulation of Roundabout4 by Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Microvascular Endothelial Cells. *Investigative*

Ophthalmology & Visual Science 56, 2586.

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.

Tsai, L.-L., Yu, C.-C., Chang, Y.-C., Yu, C.-H., and Chou, M.-Y. (2011). Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma: Stemness markers and chemo-resistance. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 40, 621–628.

Ulyanova, T. (2005). VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin. *Blood* 106, 86–94.

VanderVorst, K., Dreyer, C.A., Konopelski, S.E., Lee, H., Ho, H.-Y.H., and Carraway, K.L. (2019). Wnt/PCP Signaling Contribution to Carcinoma Collective Cell Migration and Metastasis. *Cancer Research*.

Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J.H., and Raman, V. (2008). Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 367, 235–241.

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, H., Zhang, G., Zhang, H., Zhang, F., Zhou, B., Ning, F., Wang, H.-S., Cai, S.-H., and Du, J. (2014). Acquisition of epithelial–mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/ β -catenin/Snail signaling pathway. *European Journal of Pharmacology* 723, 156–166.

Wang, Y., Nishida, S., Elalieh, H.Z., Long, R.K., Halloran, B.P., and Bikle, D.D. (2006). Role of IGF-I Signaling in Regulating Osteoclastogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research* 21, 1350–1358.

Wu, M., Chen, G., and Li, Y.-P. (2016). TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Research* 4.

Wu, Q., Zhou, X., Huang, D., Ji, Y., and Kang, F. (2017). IL-6 Enhances Osteocyte-Mediated Osteoclastogenesis by Promoting JAK2 and RANKL Activity *In Vitro*. *Cellular Physiology and Biochemistry* 41, 1360–1369.

Xia, Y., Wang, L., Xu, Z., Kong, R., Wang, F., Yin, K., Xu, J., Li, B., He, Z., Wang, L., et al. (2019). Reduced USP33 expression in gastric cancer decreases inhibitory effects of Slit2-Robo1 signalling on cell migration and EMT. *Cell Proliferation* 52, e12606.

Xian, L., Wu, X., Pang, L., Lou, M., Rosen, C.J., Qiu, T., Crane, J., Frassica, F., Zhang, L., Rodriguez, J.P., et al. (2012). Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. *Nature Medicine* 18, 1095–1101.

Xu, R., Yallowitz, A., Qin, A., Wu, Z., Shin, D.Y., Kim, J.-M., Debnath, S., Ji, G., Bostrom, M.P., Yang, X., et al. (2018). Targeting skeletal endothelium to ameliorate bone loss. *Nature Medicine* 24, 823–833.

Yadav, S.S., and Narayan, G. (2014). Role of ROBO4 signalling in developmental and pathological angiogenesis. *Biomed Res Int* 2014, 683025.

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.

Yin, J.J., Selander, K., Chirgwin, J.M., Dallas, M., Grubbs, B.G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G.R., and Guise, T.A. (1999). TGF- β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases

development. *Journal of Clinical Investigation* *103*, 197–206.

Yin, X., Bern, M., Xing, Q., Ho, J., Viner, R., and Mayr, M. (2013). Glycoproteomic Analysis of the Secretome of Human Endothelial Cells. *Molecular & Cellular Proteomics* *12*, 956–978.

Yoshikawa, M., Mukai, Y., Okada, Y., Yoshioka, Y., Tsunoda, S., 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 Expression and Purification* *61*, 78–82.

Ypsilanti, A.R., and Chedotal, A. (2014). Roundabout receptors. *Adv Neurobiol* *8*, 133–164.

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 Communication and Signaling* *12*, 25.

Yu, S., Zhu, K., Lai, Y., Zhao, Z., Fan, J., Im, H.-J., Chen, D., and Xiao, G. (2013). ATF4 Promotes β -Catenin Expression and Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Biological Sciences* *9*, 256–266.

Zaidi, S.K., Javed, A., Choi, J.Y., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B., and Stein, G.S. (2001). A specific targeting signal directs Runx2/Cbfa1 to subnuclear domains and contributes to transactivation of the osteocalcin gene. *J. Cell. Sci.* *114*, 3093–3102.

Zallen, J.A., Yi, B.A., and Bargmann, C.I. (1998). The conserved immunoglobulin superfamily member SAX-3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in *C. elegans*. *Cell* *92*, 217–227.

Zelina, P., Blockus, H., Zagar, Y., Péres, A., Friocourt, F., Wu, Z., Rama, N., Fouquet, C., Hohenester, E., Tessier-Lavigne, M., et al. (2014). Signaling Switch of the Axon Guidance Receptor Robo3 during Vertebrate Evolution. *Neuron* *84*, 1258–1272.

Zhang, B., Dietrich, U.M., Geng, J.-G., Bicknell, R., Esko, J.D., and Wang, L. (2009). Repulsive axon guidance molecule Slit3 is a novel angiogenic factor. *Blood* *114*, 4300–4309.

Zhang, C., Cho, K., Huang, Y., Lyons, J.P., Zhou, X., Sinha, K., McCrea, P.D., and de Crombrughe, B. (2008). Inhibition of Wnt signaling by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 6936–6941.

Zhang, F., Prahst, C., Mathivet, T., Pibouin-Fragner, L., Zhang, J., Genet, G., Tong, R., Dubrac, A., and Eichmann, A. (2016). The Robo4 cytoplasmic domain is dispensable for vascular permeability and neovascularization. *Nature Communications* *7*.

Zhang, L., Huang, G., Li, X., Zhang, Y., Jiang, Y., Shen, J., Liu, J., Wang, Q., Zhu, J., Feng, X., et al. (2013). Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAIL1 by hypoxia-inducible factor -1 α in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* *13*.

Zhang, Q.-Q., Zhou, D.-L., Lei, Y., Zheng, L., Chen, S.-X., Gou, H.-J., Gu, Q.-L., He, X.-D., Lan, T., Qi, C.-L., et al. (2015). Slit2/Robo1 signaling promotes intestinal tumorigenesis through Src-mediated activation of the Wnt/ β -catenin pathway. *Oncotarget* *6*, 3123–3135.

Zhao, C., Irie, N., Takada, Y., Shimoda, K., Miyamoto, T., Nishiwaki, T., Suda, T., and Matsuo, K. (2006). Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metabolism* *4*, 111–121.

Zhao, H., Ahirwar, D.K., Oghumu, S., Wilkie, T., Powell, C.A., Nasser, M.W., Satoskar, A.R., Li, D.Y., and Ganju, R.K. (2016a). Endothelial Robo4 suppresses breast cancer growth and metastasis through regulation of tumor angiogenesis. *Molecular Oncology* *10*, 272–281.

- Zhao, S., Zhang, Y.K.Y., Harris, S., Ahuja, S.S., and Bonewald, L.F. (2002). MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J. Bone Miner. Res.* *17*, 2068–2079.
- Zhao, S.-J., Shen, Y.-F., Li, Q., He, Y.-J., Zhang, Y.-K., Hu, L.-P., Jiang, Y.-Q., Xu, N.-W., Wang, Y.-J., Li, J., et al. (2018). SLIT2/ROBO1 axis contributes to the Warburg effect in osteosarcoma through activation of SRC/ERK/c-MYC/PFKFB2 pathway. *Cell Death & Disease* *9*.
- Zhao, Y., Zhou, F.-L., Li, W.-P., Wang, J., and Wang, L.-J. (2016b). Slit2-Robo1 signaling promotes the adhesion, invasion and migration of tongue carcinoma cells via upregulating matrix metalloproteinases 2 and 9, and downregulating E-cadherin. *Molecular Medicine Reports* *14*, 1901–1906.
- Zheng, W., Geng, A., Li, P.-F., Wang, Y., and Yuan, X. (2012). Robo4 Regulates the Radial Migration of Newborn Neurons in Developing Neocortex. *Cerebral Cortex* *22*, 2587–2601.
- Zhuang, X., Ahmed, F., Zhang, Y., Ferguson, H.J., Steele, J.C., Steven, N.M., Nagy, Z., Heath, V.L., Toellner, K.-M., and Bicknell, R. (2015). Robo4 vaccines induce antibodies that retard tumor growth. *Angiogenesis* *18*, 83–95.