



HAL
open science

Comparaison des rôles de la lysyl oxydase (LOX) et de la lysyl oxydase like 2 (LOXL2) dans la progression tumorale des cancers du sein

Paola Di Mauro

► **To cite this version:**

Paola Di Mauro. Comparaison des rôles de la lysyl oxydase (LOX) et de la lysyl oxydase like 2 (LOXL2) dans la progression tumorale des cancers du sein. Cancer. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1288 . tel-03285451

HAL Id: tel-03285451

<https://theses.hal.science/tel-03285451>

Submitted on 13 Jul 2021

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 NNT : 2019LYSE1288

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale ED 340
BIOLOGIE MOLECULAIRE INTEGRATIVE ET CELLULAIRE

Spécialité de doctorat : Science de la vie
Discipline : Cancérologie

Soutenue publiquement le 10/12/2019, par :
Paola Di Mauro

Comparaison des rôles de la lysyl oxydase (LOX) et de la lysyl oxydase like 2 (LOXL2) dans la progression tumorale des cancers du sein

Devant le jury composé de :

Valcourt Ulrich, Pr
Auguste Patrick, MCU
Cabon Florence, DR INSERM
Laffargue Muriel, DR CNRS
Clézardin Philippe, DR INSERM
Reynaud Caroline, CNRS

Université de Lyon
Université de Bordeaux
CRCT Toulouse
I2MC Toulouse
Université de Lyon
Université de Lyon

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

Résumé

Les lysyl oxydases (LOX, LOXL1-4) sont une famille d'enzymes matricielles qui catalysent la réticulation de l'élastine et des collagènes fibrillaires. En plus, de leurs fonctions de structuration de la matrice extracellulaire, elles sont impliquées dans la tumorigénèse et dans les différentes étapes du développement des métastases.

Nous avons montré récemment dans un modèle de cancer colorectal, que l'expression de LOX était associée à une diminution de la survie chez les patients. LOX agit en favorisant la dissémination métastatique au site osseux, et notamment les étapes précoces de ce processus (Reynaud et al., 2017).

Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents, nous avons choisi d'étudier le rôle de LOX et LOXL2 dans un modèle plus ostéotrope, le cancer du sein. Différentes études ont en effet montré que l'expression de LOX et/ou LOXL2 est corrélée avec le potentiel invasif et une diminution de l'espérance de vie chez les patients atteints de cancer du sein hormono-indépendants. LOX participe également à la formation de lésions pré-métastatiques pulmonaires et osseuses dans ce modèle.

Nous avons donc réprimé l'expression de LOX ou LOXL2 par shRNA dans différentes lignées invasives et surexprimé LOX ou LOXL2 dans les cellules de cancer du sein peu invasives. Nous avons confirmé le rôle promoteur de LOX dans la formation des métastases osseuses, pas celui de LOXL2. Les deux enzymes auraient donc des rôles différents au cours du processus particulier de formation des métastases osseuses dans le cancer du sein.

Abstract

Lysyl oxidases (LOX, LOXL1-4) are matrix enzymes, which catalyze the reticulation of collagens and elastin fibers in the extracellular matrix. Besides their roles in the tensile strength and structural integrity of many tissues, LOX and LOXL2 are also involved in tumourigenesis, especially in metastases development.

We showed recently that LOX expression is associated with a poor overall and relapse-free survival of patients suffering from a colorectal cancer. In this model, LOX facilitates attachment and survival of the tumour cells in the bone marrow, and disrupts the bone homeostasis by enhancing osteoclast differentiation and inhibiting the osteoblasts (Reynaud et al., 2017). As colorectal cancers are not highly osteotropic, we decided to study the role of LOX and LOXL2 in bone dissemination in the breast cancer model. Indeed, bone is the most common site of metastatic recurrence in breast cancer and bone metastases are a major cause of morbidity for patients with metastatic breast cancer. Furthermore, both LOX and LOXL2 expression are correlated with a decrease in life expectancy of breast cancer patient. LOX and LOXL2 are only expressed in invasive human breast cancer cell lines. Therefore we have repressed the expression of LOX or LOXL2 in different invasive cell lines and overexpressed LOX or LOXL2 in weakly invasive breast cancer cells by a shRNA strategy.

We have confirmed that LOX enhances bone metastasis formation from breast cancer cells. Surprisingly, LOXL2 has no effect. Thus both enzymes may thus have opposite functions during bone metastasis formation.

Remerciements

Bien que mes remerciements apparaissent en premier, ceux-ci sont rédigés à la fin de l'écriture de ce manuscrit. Une étape de plus pour moi qui exprime rarement mes sentiments, mais une étape nécessaire car il faut se l'avouer, je ne serais probablement pas arrivée ici sans vous.

En premier lieu, je tiens à remercier le **Dr Philippe Clézardin** pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire dès mon stage de Master 2, et de m'avoir fait confiance pour continuer au sein de l'équipe en doctorat. Je voulais tout particulièrement le remercier de m'avoir apporté tout son soutien scientifique et de m'avoir permis de participer à plusieurs congrès en France ou à l'étranger.

J'adresse mes remerciements au **Dr Auguste Patrick** ainsi qu'au **Dr Cabon Florence** pour avoir accepté de consacrer un temps précieux à la lecture de mon manuscrit ainsi que pour leur avis à son sujet. Je tiens à remercier le **Dr Laffargue Muriel** d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse ainsi qu'au **Pr Valcourt Ulrich**, pour avoir accepté de présider mon jury, mais aussi pour ses nombreux conseils et son soutien lors de mes comités de suivi de thèse. Mes remerciements s'adressent également au **Dr Monnot Catherine** pour l'intérêt, les conseils prodigués et le soutien durant mes comités de suivi de thèse.

C'est tout naturellement, que mes pensées vont ensuite vers ma co-directrice et encadrante le **Dr Caroline Reynaud**, qui m'a dès le début fait confiance et emmené dans cette folle aventure qu'est la thèse. Je pense qu'aucune de nous ne s'imaginait que le chemin allait aussi être aussi sinueux, mais je suis heureuse de l'avoir parcouru avec elle. Merci pour ton soutien scientifique, mais aussi pour tes nombreuses qualités humaines : ta patience, tes encouragements, ton soutien, ta disponibilité, mais surtout pour ta présence dans les moments les plus compliqués.

Je tiens aussi à remercier le **Dr Martine Croset**, sans qui ce projet n'aurait pu exister. Je voulais te remercier pour ton implication et le temps que tu as accordé à mon projet. Tu as été un pilier pour moi durant ces quatre années au sein de l'équipe, autant scientifiquement qu'humainement. Merci pour ton soutien.

Je voulais remercier toutes les personnes qui ont croisé mon chemin au laboratoire. « Les garçons » : **François** et **Geoffrey** qui m'ont directement intégrée au laboratoire, merci pour votre bonne humeur, et les premiers conseils scientifique que vous m'avez accordé. **Sacha**, collègue devenue amie, merci pour tous ces bons moments (souvent autour de nourriture haha), merci pour ton soutien toujours présent dans nos fous rires comme dans mes larmes. **Sandra**, qui nous a quittés en cours de route et à qui je souhaite beaucoup d'épanouissement et de réussite dans cette nouvelle carrière. Merci à **Lamia** et **Soumaya**, sans qui les protocoles *in vivo* n'auraient pu être réalisés, merci de m'avoir accordé autant de temps notamment lors de cette course qu'est la dernière année. **Sofia**, pour ta gentillesse, toi qui n'as jamais hésité à partager tes connaissances, et à qui je souhaite plein de bonheur de l'autre côté de l'Atlantique. L'équipe de l'hôpital : **Evelyne** pour le temps qu'elle m'a accordé, sa gentillesse et sa bienveillance. **Marjorie**, « merci d'avoir parlé » , merci d'avoir ramené de ta bonne humeur, ta générosité, ton honnêteté, et même de m'avoir suivi dans de folle vidéos de remerciements de thèse. Les acolytes du RU qui m'ont énormément entendu me plaindre ces dernières années : **François** ; **Maxime** ; **Jean-Paul** qui nous a émerveillé tous les midis avec son savoir et ses anecdotes, à qui je dois probablement des milliers d'euros pour toutes les fois où il faisait des devis imaginaires ; **Martin** pour ton amitié et tes conseils. L'équipe du 6^{ème} : **Benjamin**, **Diane**, **Léa**, **Marc**, **Sébastien**, **Wendy**, qui n'ont jamais hésité à partager leur bonne humeur autour d'une pause ou d'un verre. **Loïc**, petit dernier arrivé au laboratoire, je suis heureuse que tu n'aies pas fait brûler le laboratoire jusqu'ici, ce fut un réel plaisir de partager ces derniers mois de thèse en ta compagnie, je te souhaite plein de réussite.

Je remercie également tous les autres membres du laboratoire, **Edith**, **Chantal**, **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 ne pourrais pas faire de remerciement sans citer « la plus belle du labo », ma petite **Margaux**. Je nous revois encore il y a 5 ans de ça, rentrée de master, quelques centimètres de cheveux en plus, des cernes et des petites rides en moins (et probablement des kilos aussi haha), assise sur ton canapé en train de nous dire qu'on était persuadé qu'on allait bien s'entendre toutes les deux, on ne pouvait pas imaginer à quel point cela allait être vrai. Cette thèse n'aurait jamais été la même sans toi et je tiens à t'en remercier, je n'aurais voulu la partager avec personne d'autre. Tu es devenu ce genre d'amie que l'on compte sur les doigts

de la main. J'appréhende un peu la suite, après avoir passé mes journées, weekends, et vacances en ta compagnie, mais je sais que l'on pourra toujours compter l'une sur l'autre malgré la distance. Et ne t'inquiète pas, je serai toujours là pour partager les trésors de mon île avec toi, et surtout pour te courir après pour que tu goûtes (encore une fois) mon muscat corse ! Je voulais aussi te remercier de m'avoir présenté **la petite bande MPG3**, merci à vous TOUS de m'avoir accueilli dans votre petite bande lyonnaise, l'adaptation à cette ville n'aurait jamais été la même sans vous, elle aurait surtout été beaucoup moins drôle, merci pour ces bons moments ! Je voulais tout particulièrement remercier **Alexandra, Dorian et Florian** pour leur présence et leur soutien (même quand il s'agit de porter des cartons). Je voudrais aussi remercier **Iseulys et Lisa**, sans qui les soirées lyonnaises n'auraient pas la même saveur, j'ai hâte de ressortir avec vous ! **Julia**, pour ta bienveillance, les séances de yoga et les nombreuses glaces qui m'ont fait le plus grand bien durant cette dernière année !

Je voulais remercier mes lourdauds. **Alizé** mon binôme de plongée, bien que la distance nous sépare, les fonds marins nous ont permis de tisser un lien à jamais, merci d'avoir été tout le temps là pour moi. **Anaïs E.**, ce fut un plaisir de t'avoir fait découvrir mon île, je ne regretterais jamais cette invitation spontanée qui m'a permis de faire connaissance avec une sublime personne, merci d'avoir été là pour moi, ne lâche rien pour ta dernière ligne droite. **Fabien**, merci de me supporter depuis 5 années maintenant, bien que tu sois devenu parisien, tu as toujours été là pour moi, je t'en serais toujours reconnaissante.

Je voulais remercier ceux qui me suivent à distance depuis le lycée ou la licence: **Antoine**, tu as tout du meilleur pote rêvé, toujours là pour moi malgré la distance, tu fais partie des vrais. Je ne veux pas te mettre de pression hein, mais j'aimerais bien être à ton enterrement de vie de garçon ! **Céline**, je voulais te remercier de toujours être là malgré la distance, pour ta bienveillance, nos discussions dans les moments les plus compliqués, je te souhaite beaucoup de courage pour la suite de ta thèse! Ma petite **Émilie**, bientôt docteur en biologie végétale, de nos révisions de partiels à maintenant nos thèses, quel chemin parcouru ! Je suis très heureuse d'avoir partagé ces moments avec toi, mention spéciale pour les messages pendant nos nuits blanches de fin de parcours ! Mais aussi **Alicia**, ma **Catali**, **Chloé**, **Leslie**, **Morgane**, **Nicolas**, **Thibaut**, d'avoir toujours gardé contact malgré la distance et le temps qui passe.

Je voulais remercier mes super copines corses. **Andreia & Eugénia**, autant d'années à se suivre : en passant par Porto-Vecchio, Nancy et maintenant Lyon. Bien qu'il faut se l'avouer, nous n'aurions pas misé sur notre amitié au lycée haha, nous avons incroyablement tort, je fus heureuse de vous découvrir durant ces 10 années et j'espère d'autres encore, vous avez toujours été d'un énorme soutien, je ne pense pas que je serais arrivée là sans vous ! **Anaïs.F**, celle dont je ne douterais jamais de l'amitié ! Merci d'être dans ma vie, de ton soutien à chaque moment, pour ton entièreté qui nous a valu quelques prises de tête, mais qui nous font aussi réaliser à quel point notre amitié est importante.

Finalement, je concluais mes remerciements, pour remercier ceux qui comptent le plus, sans qui je ne serais jamais arrivée là, mes parents et mon frère. **Ma maman**, ce petit bout de femme bien plus forte qu'elle ne le pense, un exemple pour moi. Je me suis toujours demandé comment une si petite personne pouvait contenir autant d'amour. **Mon papa**, cette figure paternelle que j'admire tant, de qui j'ai probablement hérité de ce foutu caractère, mais caractère qui m'a permis de persévérer jusqu'alors. Je voulais vous remercier tous les deux, d'avoir cru en moi à chaque moment, d'avoir toujours été là pour moi (même quand j'étais insupportable), vous êtes des piliers dans ma vie. **Antonio**, mon grand frère, je ne sais pas si cette passion à m'embêter m'aura endurcie, mais je pense pas que je ne serais pas arrivée au bout de cette thèse sans cette patience acquise durant toutes ces années. Même si on ne se le dit pas forcément voire jamais, merci d'être un super frère, toujours là pour moi. Je voulais aussi te remercier (avec **Laure**), de m'avoir apporté les deux plus magnifiques et cools neveux **Hugo** et **Jules**. J'adresse également une pensée à tous **mes tontons, tatas, cousins, cousines, filleul et mes grands-parents**.

Table des matières

Résumé	2
Abstract	3
Remerciements	4
Table des matières	8
Liste des abréviations	14
Liste des figures	17
Liste des tableaux	21
Chapitre I: Introduction	22
I. Le cancer du sein	23
A. Épidémiologie, facteurs de risque et classification	23
1. L'anatomie du sein.....	23
2. Épidémiologie	24
3. Facteurs de risque.....	24
4. Les différentes classifications du cancer du sein	26
a) Les grades du cancer du sein	26
b) Les stades du cancer du sein	27
c) Les classifications moléculaires du cancer du sein, pronostic et traitement	28
B. Biologie du cancer	30
1. Les grandes étapes de la tumorigénèse.....	30
a) Du carcinome in situ aux métastases en général.....	30
b) Les grandes étapes de développement du cancer du sein	31
2. Les aspects moléculaires du développement tumoral	33
a) Initiation tumorale et acquisition du potentiel invasif.....	33
b) Croissance tumorale, rupture de la membrane basale et migration	34
c) L'angiogenèse et l'intravasation	37
d) L'extravasation, la formation de la niche pré-métastatique et la colonisation.....	38
II. La formation des métastases osseuses	41
A. La physiologie osseuse	41
1. La structure.....	41

2.	La composition cellulaire du tissu osseux.....	43
a)	Les cellules osseuses dérivées des cellules souches mésenchymateuses.....	43
(1)	Les ostéoblastes	44
(2)	Les ostéocytes	45
b)	Les cellules osseuses dérivées des cellules souches hématopoïétiques : Les ostéoclastes	46
3.	La composition matricielle du tissu osseux	49
a)	La matrice organique	49
b)	La matrice non organique	50
4.	Le remodelage osseux	50
5.	Les niches osseuses	52
a)	La niche endostéale	52
b)	La niche vasculaire et périvasculaire.....	54
B.	Les métastases osseuses	55
1.	L'ostéotropisme	56
2.	L'ostéomimétisme	58
	La localisation dans les niches métastatiques	58
3.	Les différents types de métastases.....	59
4.	Le cercle vicieux des métastases osseuses	60
5.	Le traitement des métastases osseuses	62
III.	Les lysyl oxydases	65
A.	La famille des lysyl oxydases	65
1.	Généralités.....	65
2.	Activité enzymatique des lysyl oxydases	67
3.	Les différentes isoformes de la famille des lysyl oxydases	69
a)	Profil d'expression des membres de la famille des lysyl oxydases	69
(1)	LOX	69
(2)	LOXL1.....	70
(3)	LOXL2.....	70
(4)	LOXL3.....	71
(5)	LOXL4.....	72
b)	L'invalidation des lysyl oxydases chez la souris.....	72
(1)	LOX	72
(2)	LOXL1.....	73
(3)	LOXL2.....	73
(4)	LOXL3.....	73
(5)	LOXL4.....	74
4.	Pathologie associées aux lysyl oxydases.....	74

5.	Les rôles biologiques des lysyl oxydases.....	77
a)	La matrice extracellulaire des tissus conjonctifs, structure, fonction et réticulation	77
(1)	La matrice extracellulaire	77
b)	Fonctions des LOXs	82
(1)	LOX	82
(2)	LOXL2.....	84
(3)	LOXL1, LOXL3, LOXL4.....	85
B.	LOX et LOXL2 : Cancer	86
1.	Le rôle anti-tumoral	86
2.	Rôle dans la progression tumoral	87
a)	La surexpression de LOX et LOXL2 dans les cancers	87
b)	Les mécanismes d'action	88
(1)	Le développement de la tumeur primaire	89
(2)	La prolifération.....	90
(3)	L'hypoxie	91
(4)	L'angiogenèse tumorale.....	92
(5)	La transition épithélio-mésenchymateuse	93
(6)	La migration et l'invasion	93
(7)	La niche pré-métastatique, métastases et métastases osseuses	95
3.	Les inhibiteurs ciblant LOX et LOXL2.....	99
	Chapitre II: Sujet de thèse.....	102
I.	Résultats publiés	103
II.	Perspectives de recherche.....	108
	Chapitre III: Matériel et méthodes.....	112
I.	Matériel et méthodes	113
A.	Études in vitro.....	113
1.	Culture cellulaire.....	113
2.	Génération des lignées Hs-578T, MDA-MB-231 et B02 dont l'expression de LOX ou LOXL2 est inhibée, par stratégie lentivirale shERWOOD-UltramiR shRNA	114
a)	Génération des lignées cellulaires exprimant la luciférase2.....	115
b)	Génération des lignées cellulaires de cancer du sein dont l'expression de LOX ou LOXL2 est inhibée.....	115
3.	Génération des lignées B02-Luc2 et MCF-7Luc2 surexprimant LOX ou LOXL2.....	117
4.	Construction des vecteurs plasmidiques	118
a)	Plasmides lentiviraux d'inhibition d'expression : pZIP-hCMV-UltramiRshRNA.....	118

(1) Amplification et purification des plasmides	121
b) Plasmide rétroviraux de surexpression	122
(1) pQCXIN-Lox	122
(2) pQCXIN-LOXL2	126
5. RT-qPCR quantitative	127
6. Western Blot	128
7. Tests fonctionnels	129
a) Test colorimétrique de prolifération cellulaire	129
b) Test de migration	130
c) Test d'adhérence avec les cellules résidentes de la moelle osseuse	130
d) Test de formation de sphéroïde.....	130
e) Test d'ostéoclastogénèse.....	131
B. Expérimentation animale	131
1. Formation des micro-métastases dans la moelle osseuse des souris : étude par microscopie bi-photonique.....	131
2. Formation des micro-métastases dans la moelle osseuse des souris : étude par isolement des cellules tumorales de la moelle.....	132
3. Ostéolyse	132
4. Tumorigénèse	133
5. Niches osseuses humanisées	133
6. Immunohistochimie, histologie osseuse et histomorphométrie	133
C. Analyses statistiques.....	134
Chapitre IV: Résultats.....	135
I. Expression de LOX et LOXL2 dans différentes lignées de cancer du sein.....	136
II. Validation et sélection des lignées cellulaires dont l'expression de LOX et LOXL2 inhibée.....	138
III. Caractérisation fonctionnelle des lignées cellulaire inhibées en LOX ou LOXL2	143
A. Effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur la prolifération	143
B. Effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur la migration.....	144
C. Effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire	146
D. L'effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur l'adhésion aux cellules de la niche endostéale	148

E.	Effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur la formation des organoïdes homotypiques ou hétérotypiques en culture 3D.....	150
IV.	<i>Impact de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur la colonisation osseuse et la formation de métastases in vivo.....</i>	152
A.	Effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur l'ancrage précoce des cellules tumorales dans la moelle osseuse	152
B.	Effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur la formation de micrométastases osseuses.....	154
C.	Étude de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur la formation de métastases osseuses.....	156
V.	<i>Les effets de la surexpression de LOX ou LOXL2 dans la lignée B02 et MCF-7.....</i>	158
A.	Validation de la surexpression de LOX ou LOXL2 dans la lignée B02.....	158
B.	Validation de la surexpression de LOX ou LOXL2 dans la lignée MCF-7	158
VI.	<i>Caractérisation fonctionnelle des lignées cellulaires qui surexpriment LOX ou LOXL2</i>	160
A.	Effet de la surexpression sur la prolifération	161
B.	Effet de la surexpression sur la migration.....	161
C.	Effet de la surexpression de LOX ou LOXL2 sur l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire	162
D.	Effet de la surexpression de LOX ou LOXL2 sur l'adhésion aux cellules de la niche endostéale	164
E.	Effet de la surexpression de LOX ou LOXL2 sur la capacité des cellules à former des organoïdes homotypiques ou hétérotypiques en culture 3D.....	165
VII.	<i>Étude de l'impact de la surexpression de LOX ou de LOXL2 sur la tumorigénèse in vivo</i>	166
A.	Étude de la surexpression de LOX ou LOXL2 sur la formation de la lyse osseuse	166
1.	Étude des effets de la surexpression de LOX sur la formation de métastases osseuses	166
2.	Étude des effets de LOXL2 sur la formation de métastases osseuses	168
3.	Injection en sous-cutanée des lignées B02 shLOX, LOX+, shLOXL2, LOXL2+	169
4.	Les effets de LOX ou LOXL2 secrétées sur l'invasion de la niche osseuse	171

5. Les effets de LOX ou LOXL2 sur la différenciation ostéoclastique	173
Chapitre V : Bilan & discussion	175
Bibliographies	190
Annexes 1 & 2	228

Liste des abréviations

- AAS : α -aminoadipic- δ -semialdehydes
- A β : peptide bêta-amyloïde
- ALP: Alkaline Phosphatase
- AMT : aminométhylènethiophène
- Ang-1 : Angiopoïétine
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- ATP7A : Cu²⁺-transporting ATPase-alpha
- β APN : β -aminopropionitrile
- BMDCs : Bone Marrow-Derived Dendritic Cells
- BMP: protéines morphogéniques osseuses
- BRU : Bone Remodeling Unit
- BSP: Sialoprotéine osseuse
- Ca: Calcium
- CAF: Fibroblastes Associés au Cancer
- CAR : Cellules Réticulaires Abondantes
- CCL2 : C-C motif Chemokine Ligand 2
- CD : Cadhérine
- CK: Cytokératine
- Coll I: Collagène de type I
- CRL: Cytokine Receptor Like
- CSH: Cellule souche hématopoïétique
- CTC: Cellule Tumorale Circulante
- CXCL12: Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12
- DMP-1 : Dentin matrix acidic phosphoprotein 1
- DTC: Cellule Tumorale Disseminée
- EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
- EMT : Epithélial-Mésenchymateuse Transition
- E-Cadh: E-Cadhérine

- ER : Oestrogènes
- FAK : Focal Adhesion kinase
- FGF : Fibroblast Growth Factor
- FGFR1 : Fibroblast Growth Factor Receptor 1
- GAG : Glycosaminoglycanes
- HER : Epidermique humain
- HIF : Hypoxia Inducible Factor
- HNSCC : carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou
- IL : Interleukine
- IGF : Insuline-like Growth Factor
- KO: Knockout
- LOX : Lysyl Oxydase
- LOXL : Lysyl Oxydase-Like
- LP : Lactogen placentaire
- LTQ : Lysyl Tyrosylquinone
- Luc2= Luciférase2
- M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating
- MEC : Matrice Extracellulaire
- MET : Mesenchymau-Epithéliale Transition
- MMP : métalloprotéinases matricielle
- mTLD : mammalian Tolloid
- mTLL : mammalian Tolloid Like
- N-Cadh: N-Cadhérine
- NFATc1 : Nuclear Factor Of Activated T Cells 1
- OCN : Ostéocalcine
- OPG : Ostéoprotégérine
- OSP :Ostéopontine
- OSX : Ostérix
- PDGF : Platelet Derived Growth Factor
- PDGFR β : Platelet-derived growth factor receptor β
- PGE : Prostaglandine
- PIGF : Placenta Growth Factor

- PP : Pro-Péptide
- PR : Progestérone
- PS : Plaques Séniles
- PtHrP : Parathyroïde hormone
- RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand
- shRNA – Short hairpin RNA
- SRC: Steroid Receptor Coactivator
- TAF10 - TATA-box binding protein associated factor 10
- TFIID : Transcription Factor II D
- THPO : thrombopoïétine
- TRAP : Tartrate Resistant Acid Phosphatase
- TGF β : transforming growth factor β
- TNF : Tumor Necrosis Factor
- TNM : Tumor Node Metastasis
- SRCR : Scavenger receptor cysteine-rich
- VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Liste des figures

Figure 1: La glande mammaire.....	23
Figure 2: Part représentant le nombre de cas et la mortalité mondiale pour chaque cancer en 2018	24
Figure 3: La cascade métastatique.....	31
Figure 4: Histologies des étapes du développement d'un cancer du sein	32
Figure 5: Voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire du cancer du sein.....	33
Figure 6: Représentation schématique d'un programme d'EMT.....	35
Figure 7: La voie TGF β dans la régulation de l'EMT	36
Figure 8: Anatomie macroscopique d'un os long.....	43
Figure 9: L'ostéoblastogénèse	46
Figure 10: L'ostéoclastogénèse.....	48
Figure 11: Représentation schématique de l'action d'un ostéoclaste mature	49
Figure 12: Le remodelage osseux.....	52
Figure 13: Les niches osseuses.....	55
Figure 14: Les différentes étapes du développement de métastases osseuses	56
Figure 15: Compétition entre les cellules souches hématopoïétiques et les cellules tumorales disséminées au sein des niches	59
Figure 16 : Homéostasie osseuse et effet des déséquilibres dans la formation des métastases	60
Figure 17: Le cercle vicieux des métastases osseuses	62
Figure 18: Structure des membres de la famille des lysyl oxydases	65
Figure 19: Structure du cofacteur de la Lysyl Tyrosylquinone	67
Figure 20: Stœchiométrie de la réaction catalysée par les lysyl oxydases.....	68
Figure 21: Les différentes étapes de déamination oxydative catalysée par les lysyl oxydases	69
Figure 22: Les composants de la matrice extracellulaire	79
Figure 23: Régulation du comportement cellulaire par la matrice extracellulaire	80
Figure 24: Résumé des interactions et des cibles connues de LOX-PP	87
Figure 25: LOX et LOXL2 sont impliquées dans différentes étapes de la tumorigénèse.....	89

Figure 26: Les influences de HIF-1 α sur LOX et LOXL2	92
Figure 27: Le rôle de LOX dans la formation de la niche pré-métastatique pulmonaire dans le cancer du sein	96
Figure 28: Rôle de LOX lors de la formation de métastases osseuses de cancer du cancer du colon	97
Figure 29: Le rôle de LOXL2 dans la formation de la niche pré-métastatique pulmonaire de carcinome hépatocellulaire	98
Figure 30: Schéma récapitulatif des nombreuses voies de signalisation utilisées par LOX et LOXL2 pour favoriser la progression tumorale et le développement de métastases	99
Figure 31: Expression de LOX et issue clinique	104
Figure 32: Expression de LOX dans les carcinomes colorectaux primaires humains et leurs métastases osseuses correspondantes.....	104
Figure 33: La libération systémique de LOX sécrétée par la tumeur favorise l'ostéolyse et la croissance des cellules tumorales dans la moelle osseuse	105
Figure 34: LOX stimule l'ostéoclastogénèse et inhibe l'ostéoblastogénèse	106
Figure 35: La libération systémique de LOX sécrétée favorise la colonisation de la moelle osseuse par les cellules de cancer colorectal.....	107
Figure 36: Expression de LOX/LOXL2 et issue clinique.....	110
Figure 37: Les vecteurs pZIP-hCMV-UltramiRshRNA utilisés dans la stratégie d'ARN interférant (transOMIC technologies Inc.).....	119
Figure 38: Caractéristiques du plasmide rétroviral pQCXIN utilisé pour exprimer LOX, LOXL2 dans les lignées cellulaires de cancer du sein	123
Figure 39: Caractérisation des différentes lignées de cancer du sein.....	137
Figure 40: Validation de l'inhibition de LOX ou LOXL2 dans les lignées MDA-MB-231 et B02 par RT-qPCR et Western Blot	139
Figure 41: Impact de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur les autres membres de la famille des lysyl oxydases dans la lignée B02 et MDA-MB-231.....	141
Figure 42: Validation de l'inhibition de LOX ou LOXL2 dans la lignée Hs578t par RT-qPCR et Western Blot	142
Figure 43: Test d'incorporation de BrDu en présence ou non de LOX ou LOXL2.....	143
Figure 44: Étude de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur les capacités migratoires de nos cellules	145

Figure 45: Étude de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur les capacités d'adhésion des lignées cellulaires aux composants de la matrice extracellulaire	147
Figure 46: Étude de l'effet de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur l'adhésion aux cellules des niches osseuses – Protocol expérimentale	148
Figure 47: Étude de l'effet de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur l'adhésion aux cellules des niches osseuses.....	149
Figure 48: Étude de l'effet de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur la capacité des cellules tumorales B02 et MDA-MB-231 à former des organoïdes homotypiques ou hétérotypiques en présence de cellules constituant la niche osseuse	151
Figure 49: Effet de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur l'implantation précoce des cellules tumorales dans l'os.....	153
Figure 50: Effet de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur la colonisation de la moelle osseuse ..	155
Figure 51: Effet de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur la formation de métastases ostéolytique	157
Figure 52: Validation de la surexpression de LOX ou de LOXL2 dans la lignée B02	159
Figure 53: Validation de la surexpression de LOX ou LOXL2 dans la lignée MCF-7.....	160
Figure 54: Test d'incorporation de BrDu en présence ou non de LOX ou LOXL2.....	161
Figure 55: Étude de la surexpression de LOX ou de LOXL2 sur la migration.....	162
Figure 56: Étude la surexpression de LOX ou LOXL2 sur les capacités d'adhésion des lignées cellulaires aux composants de la matrice extracellulaire	163
Figure 57: Étude de l'effet de la surexpression de LOX ou LOXL2 dans la lignée B02 sur l'adhésion aux cellules composant les niches osseuses.....	164
Figure 58: Étude de l'effet de la surexpression de LOX ou LOXL2 sur la capacité des cellules tumorales B02 et MCF-7 à former des organoïdes homotypiques ou hétérotypiques en présence de cellules constituant la niche osseuse	165
Figure 59: Effet de la surexpression de LOX sur la formation de métastases ostéolytiques	167
Figure 60: Effet de la surexpression de LOXL2 sur la formation de métastases ostéolytiques	168
Figure 61: Implication de LOX et LOXL2 dans la formation tumorale	170
Figure 62: Étude des effets de LOX et LOXL2 sur la colonisation d'os ectopique humanisée par les cellules B02.....	172

Figure 63: Étude de la modulation de LOX ou LOXL2 sur la différenciation des ostéoclastes in vitro.....	174
Figure 64: Courbe schématique de prolifération cellulaire	178
Figure 65: Les intégrines : liens entre la matrice extracellulaire, les cellules et LOX.....	185

Liste des tableaux

Tableau 1: Les différents grades de cancer du sein basés sur l'évaluation par grade d'Elston et Ellis.....	27
Tableau 2: Classification moléculaire, pronostic et traitements du cancer du sein	29
Tableau 3 : Fréquence des sites métastatiques chez les patients avec un cancer du sein invasif	40
Tableau 4: Caractéristiques des lignées cellulaires et leur milieu de culture	113
Tableau 5: Génération des lignées B02-Luc2 qui expriment fortement la LOX ou la LOXL2 et de leur lignée contrôle.....	118
Tableau 6: séquence des plasmides pZIP-hCMV-UltramiRshRNA utilisés pour inhiber l'expression de LOX et LOXL2 dans les lignées cellulaires.....	121
Tableau 7: Séquence des amorces Sens et Antisens utilisées pour la recombinaison homologue.....	126
Tableau 8: Primer utilisés en RT-qPCR	128
Tableau 9: Anticorps utilisés en western-blot	129

Chapitre I: Introduction

I. Le cancer du sein

A. Épidémiologie, facteurs de risque et classification

1. L'anatomie du sein

Dans le but de permettre une meilleure compréhension de la genèse des tumeurs mammaires et des différents types de cellules impliquées, voici une description de l'anatomie du sein.

La glande mammaire est un organe dynamique qui subit d'importants changements au cours du développement, du cycle menstruel, de la grossesse, de la lactation, et de l'involution. Ces changements sont principalement régulés par les hormones. Ils impliquent des phénomènes de prolifération et de différenciation qui peuvent rendre les cellules de la glande mammaire plus sensibles à la transformation tumorale.

La glande mammaire, est une structure en forme d'arbre constituée d'un réseau de canaux dit galactophores et de lobules. L'épithélium est constitué principalement de deux types de cellules : basales et luminales. L'épithélium basal est constitué de cellules myoépithéliales qui génèrent la couche externe de la glande et d'une petite population de cellules souches. L'épithélium luminal quant à lui forme les canaux et les alvéoles sécrétoires et contient des populations de cellules définies par l'expression de récepteurs hormonaux. Le lait est produit par les cellules luminales sécrétoires des lobules. C'est la contraction des muscles lisses et des cellules myoépithéliales canalaire et lobulaires, qui est responsable de sa libération (Macias et Hinck 2012; Skibinski et Kuperwasser 2015) (fig.1).

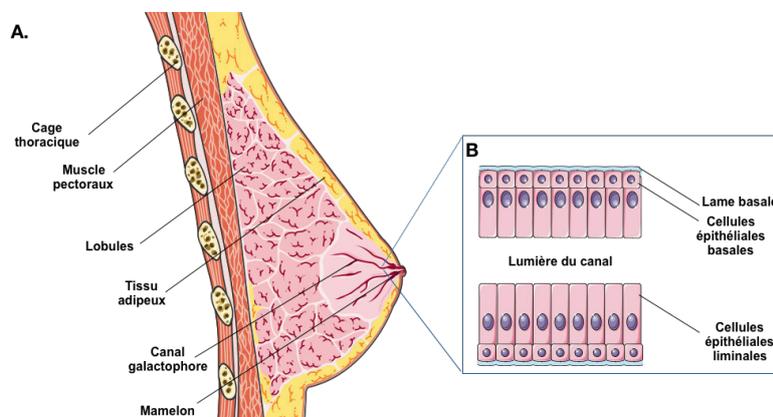


Figure 1: La glande mammaire

(A) Schéma de l'anatomie du sein chez la femme. (B) Illustration de la stratification de l'épithélium mammaire. (Adapté de (Ali et Coombes 2002).

2. Épidémiologie

Le cancer du sein est le plus répandu des cancers féminins. Il se place juste devant les cancers colorectaux et pulmonaires.

Mondialement, 2,1 millions de nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués en 2018. Cela représente près d'une femme sur 10 touchée par cette maladie. Le cancer du sein est une maladie essentiellement féminine. En effet, la proportion de cancer du sein diagnostiquée chez les hommes est comprise entre 0,5% à 1% (Ruddy et Winer 2013).

C'est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué dans la majorité des pays. Il est aussi la principale cause de décès par cancer dans plus de 100 pays. En 2018, 626 679 personnes sont décédées suite à un cancer du sein (voir fig.2)(Bray et al. 2018).

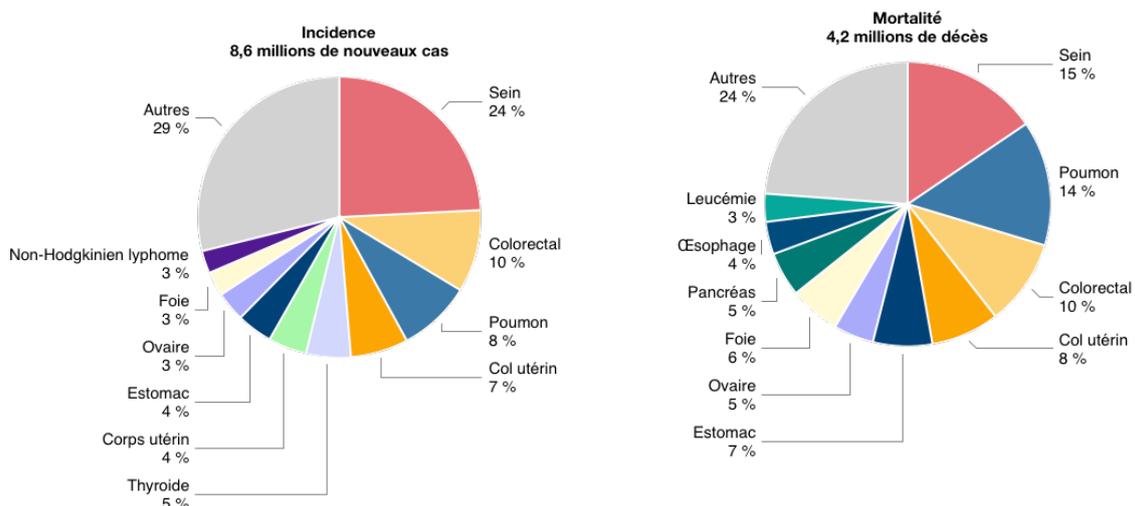


Figure 2: Part représentant le nombre de cas et la mortalité mondiale pour chaque cancer en 2018

En France, 54 000 nouveaux cas de cancer du sein sont diagnostiqués chaque année. Le taux d'incidence du cancer du sein a tendance à augmenter, en partie à cause des campagnes de dépistage systématique mises en place. A contrario, le taux de mortalité est en baisse. Dans les pays développés comme la France, le taux de survie à 5 ans après le diagnostic varie de 80 à 90% selon l'âge et le type de cancer du sein ; le taux de survie globale quant à lui est inférieur à 35% dans les 5 ans en cas de rechute métastatique (chiffres de la Ligue contre le cancer).

3. Facteurs de risque

A l'heure actuelle, il existe différents facteurs de risque de cancer du sein connus tels que : l'âge, les antécédents personnels de maladie, les antécédents familiaux de cancers ou encore, les risques liés à la reproduction.

Le principal facteur de risque pour ce cancer est l'âge. En effet, chez les femmes jeunes l'incidence est peu élevée. Seuls 20% des cas de cancer du sein se manifestent chez les femmes âgées de moins de 50 ans. Près de 50% des cancers du sein sont diagnostiqués entre 50 et 69 ans et environ 28% sont diagnostiqués après 69 ans.

En ce qui concerne les antécédents personnels, il existe plusieurs risques, notamment le risque de récurrence. En effet, une femme ayant déjà eu un cancer du sein spécifiquement a 3 à 4 fois plus de risques de rechuter par rapport à une personne n'ayant jamais été touchée par cette maladie (Institut National du Cancer).

Aussi, d'autres maladies augmentent le risque de cancer du sein, telles que les hyperplasies. L'hyperplasie dans le sein est une infection bénigne qui correspond à la prolifération anormale de cellules qui tapissent les canaux ou les lobules du sein. Les personnes atteintes d'hyperplasie atypique ont un risque accru de développer un cancer de 4 à 5 fois, et environ 10 fois supérieur si le patient possède des antécédents familiaux (Hartmann et al. 2015).

Les antécédents familiaux sont des facteurs de risque très importants dans le dépistage du cancer. Près de 20 à 30% des cancers se manifestent chez des patients ayant des antécédents familiaux de cancer. Pour le cancer du sein, il a été démontré que les femmes possédant une parente au premier degré ayant déjà eu un cancer du sein, ont un risque plus élevé de développer ce type de cancer, et d'autant plus si le membre de la famille a été diagnostiqué à un jeune âge. A titre d'exemple, une femme avec une parente au premier degré diagnostiquée d'un cancer du sein avant l'âge de 40 ans, a un risque 5,7 fois plus élevé de développer un cancer du sein avant l'âge de 40 ans qu'une personne sans antécédents familiaux (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2001). Deux gènes ont été impliqués dans le cancer du sein familial : BRCA1 et BRCA2. Les mutations BRCA sont les plus fréquentes et sont fortement liées au cancer du sein chez les jeunes femmes non ménopausées. 10% des femmes diagnostiquées avec un cancer du sein avant l'âge de 40 ans possèdent une mutation BRCA contre 2% pour la population générale atteinte de ce type de tumeur (Teng, Zheng, et Wang 2008).

Outre les facteurs familiaux, il existe aussi des facteurs personnels qui entrent en compte, notamment les facteurs liés à la reproduction. En effet, les femmes ayant eu leurs menstruations à un jeune âge ou qui ont un retard de ménopause, ont un risque plus élevé de développer un cancer du sein. Les femmes ménopausées naturellement après l'âge de 55 ans sont deux fois plus susceptibles de développer un cancer du sein que celles ménopausées avant l'âge de 45 ans. L'absence ou l'âge tardif de la première grossesse a aussi été montré comme un facteur de risque élevé, tandis que l'allaitement semble lui diminuer les risques. Le risque de cancer du sein chez les femmes qui ont leur premier enfant après l'âge de 30 ans, est environ deux fois plus élevé que celui des femmes qui ont leur premier enfant avant l'âge de 20 ans. Le groupe le plus à risque est celui du premier enfant après l'âge de 35 ans : ces femmes semblent présenter un risque encore plus élevé que les femmes nullipares. De plus il a été démontré, qu'avoir un deuxième enfant à un jeune âge, réduit davantage le risque de cancer du sein (McPherson, Steel, et Dixon 2000).

En plus de ces facteurs connus, il a été démontré que le risque de développer un cancer du sein comme pour les autres cancers va être influencé par le mode de vie : la consommation de tabac, d'alcool, l'obésité, la prise de traitements hormonaux...

4. Les différentes classifications du cancer du sein

Il existe plusieurs types de classification des tumeurs mammaires, basées sur différents critères histologiques ou moléculaires. L'évaluation clinique habituelle consiste à étudier la taille des tumeurs, leur grade, et le statut ganglionnaire. Cela est complété par une identification moléculaire qui permet un diagnostic plus précis et l'émergence de traitements ciblés qui améliorent la survie des patients.

a) Les grades du cancer du sein

La détermination du grade a été définie par Elston et Ellis en 1991. Elle est basée sur l'apparence des cellules tumorales et se définit par l'évaluation de 3 critères (Elston et Ellis 1991)(Tableau 1).

Grade 1 ou bas grade	Grade 2 ou grade intermédiaire	Grade 2 ou grade intermédiaire
Score de 3 à 5	Score 6-7	Score 8-9
La formation de tubules	Le pléomorphisme nucléaire	Le comptage mitotique
Cellules très différenciées avec une division lente Tissu mammaire d'apparence normale Cellules tumorales contenant des structures en forme de tubules.	Noyau de chaque cellule cancéreuse différent de celui des cellules normales Noyaux uniformes ou plus grands Cellules ayant une apparence située entre le grade 1 et 3	Fréquence des mitoses importante (cellules qui se divisent activement dans la tumeur) Cellules cancéreuses peu différenciées ou indifférenciées Tissu mammaire d'apparence anormal

21A Tableau 1: Les différents grades de cancer du sein basés sur l'évaluation par grade d'Elston et Ellis

b) Les stades du cancer du sein

En plus du système de classification par grades, les cancers du sein peuvent être classés par stade d'avancement de la maladie. Ce système est couramment utilisé par les cliniciens. Il détermine l'état d'avancement du cancer ce qui permet de donner des informations sur la gravité et sur la meilleure façon de traiter le cancer. Les médecins utilisent également le stade du cancer pour parler de statistique de rechute ou de survie.

La classification par stade, aussi appelée TNM (Tumor Node Metastasis de l'American Joint Committee on Cancer) est basée sur 3 caractéristiques :

- La taille de la tumeur (**T**) : T suivi d'un chiffre de 0 à 4 indique si elle s'est propagée à la peau ou à la paroi thoracique sous le sein. Des nombres T plus élevés signifient une tumeur plus grande et/ou une propagation plus large vers les tissus proches du sein.
- L'atteinte ganglionnaire (**N**) : N suivi d'un chiffre compris entre 0 et 3 indique si le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques proches du sein et, si c'est le cas, combien de ganglions lymphatiques sont atteints.
- La présence de métastases (**M**) : M suivi de 0 ou 1 indique si le cancer s'est propagé à des organes distants tel que les poumons, le foie ou les os.

c) Les classifications moléculaires du cancer du sein, pronostic et traitement

Lors de la 8^{ème} édition de la commission de classification de l'American Joint Committee on Cancer, le comité a reconnu la nécessité d'intégrer des facteurs biologiques moléculaires dans le système de classification en plus des paramètres cliniques, tels que l'expression des récepteurs des œstrogènes (ER) et de la progestérone (PR), et l'expression du facteur de croissance épidermique humain (HER2). En effet, l'hétérogénéité des cancers du sein est reflétée par la présence de ces marqueurs pathologiques.

Les études génomiques réalisées par l'équipe de Perou et al. sur 8102 gènes dans 65 tumeurs, ont permis d'établir quatre sous-types majeurs de cancers du sein : Luminal A, Luminal B, Her2+, ou triple négatif. Chacun de ces sous-types est associé à une issue clinique et à une réponse aux traitements différente (Perou et al. 2000).

Les cancers de type Luminal A (ER+/PR+, HER2-) : ils représentent 50 à 60% des cancers du sein. Les cellules cancéreuses expriment ER et PR, mais ne possèdent pas d'amplification de HER2. Ils sont également caractérisés par un faible taux de marqueurs de prolifération et un taux de mutation de p53 faible. Ces cancers sont généralement de bas grade histologique. La croissance tumorale est lente et peu agressive et les tumeurs sont donc considérées comme de bon pronostic (Blows et al. 2010; Gao et Swain 2018).

Les cancers de type Luminal B (ER+/PR+, HER2+) : Ils représentent 10 à 20% des cancers du sein. Les cellules cancéreuses expriment ER et PR, comme dans les cancers de type Luminal A, mais HER2 est également surexprimé. Leur phénotype est plus agressif que les cancers de type Luminal A et s'accompagne d'une plus forte expression de différents marqueurs de la prolifération tel que Ki67, la Cycline B1 et EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Le pronostic est intermédiaire (Dai et al. 2016).

Les cancers HER2+ (ER-/PR-, HER2+) : Ils représentent 15 à 20% des cancers. Les cellules cancéreuses expriment comme le nom l'indique très fortement HER2, mais sont négatives quant à l'expression de ER et PR. Les tumeurs ont un taux de croissance très important et se répandent de manière très agressive. Ce sont des cancers de mauvais pronostic (Blows et al. 2010; Hernández-Blanquissett et al. 2016).

Les cancers triple négatifs (ER-/PR-, HER2-) : ils représentent 10 à 20% des cancers. Les cellules cancéreuses n'expriment aucun des récepteurs hormonaux de type ER, PR et HER2. Elles expriment également des gènes que l'on retrouve généralement dans les cellules myoépithéliales, tels que les gènes des cytokératines 5 et 17 (CK5 et CK17), la P-Cadhérine, CD44, et le récepteur EGFR. Ces cancers sont aussi appelés « basal-like ». Ils touchent plus sensiblement les femmes noires, pré-ménopausées, ou avec une mutation BRCA. C'est le cancer du sein le plus agressif, qui est aussi de très mauvais pronostic (Diana et al. 2018; Perou et al. 2000).

Ces différences moléculaires vont cliniquement influencer la prise en charge de la maladie tumorale. En effet, pour accompagner la chirurgie, un traitement concomitant d'hormono- ou de chimiothérapie est souvent proposé. Il sert à réduire la masse tumorale avant résection, dans le but de réduire au maximum le risque de dissémination métastatique. Les traitements vont différer en fonction du profil d'expression des récepteurs hormonaux, voir tableau 2.

Forme	Sous-type	Caractéristiques moléculaires	Pronostic	Traitement
Luminal	A	ER+, PR+, HER2-	Bon	Hormonothérapie
	B	ER+, PR+, HER2+	Intermédiaire	Hormonothérapie +/- chimiothérapie Anti-HER2
HER2+		ER-, PR-, HER2+	Défavorable	Chimiothérapie +anti-HER2
Triple négatif		ER-, PR-, HER2-	Très défavorable	Chimiothérapie Sels de platine anti-angiogénique

Cette classification moléculaire permet d'améliorer la survie des patients. Or, la biologie

Tableau 2: Classification moléculaire, pronostic et traitements du cancer du sein
(ER : récepteur aux œstrogènes, PR : récepteur à la progestérone, HER2 : onco-protéine HER2)

tumorale ne peut malheureusement pas se réduire à l'expression ou la surexpression de quelques récepteurs. De plus, cela reste peu efficace en cas développement métastatique. C'est pourquoi il est nécessaire de comprendre les étapes précoces de la formation des métastases afin de ralentir leur développement et d'améliorer le pronostic vital des patients.

B. Biologie du cancer

1. Les grandes étapes de la tumorigénèse

a) *Du carcinome in situ aux métastases en général*

La tumorigénèse chez l'homme est un processus à plusieurs étapes. Ces étapes reflètent l'altération génétique qui entraîne une transformation progressive des cellules humaines normales en dérivées malignes.

L'équipe de Weinberg et collaborateurs a défini cette transformation comme étant une manifestation de six modifications cellulaires qui dictent collectivement la croissance maligne : l'autosuffisance en signaux de croissance, une insensibilité aux signaux inhibiteurs de la prolifération, l'échappement à la mort cellulaire programmée (apoptose), un potentiel de réplication illimité, une angiogenèse soutenue, et des capacités d'invasion des tissus qui favorisent le développement de métastases. Quelques années plus tard, ce groupe identifie deux capacités de plus : la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire et la capacité à éviter une destruction par le système immunitaire. Ils mettent aussi en évidence deux caractéristiques favorisant les cancers (mais qui ne sont pas qualifiées de capacités distinctives) ; il s'agit de l'inflammation favorisant les tumeurs ainsi que l'instabilité et les mutations du génome (D. Hanahan et Weinberg 2000; Douglas Hanahan et Weinberg 2011).

Il a été mis en évidence que toutes ces modifications favorisent la mise en place de la cascade métastatique. Celle-ci est composée du développement du carcinome et de l'acquisition par les cellules tumorales d'un potentiel invasif, de la néo-angiogenèse tumorale, de l'invasion de la membrane basale et des tissus adjacents puis de l'intravasation des cellules tumorales dans la circulation sanguine ou lymphatique, de leur extravasation dans un site secondaire, et finalement de la colonisation du tissu secondaire avec la formation de micro ou macro-métastases (Jiang et al. 2015) (voir fig.3).

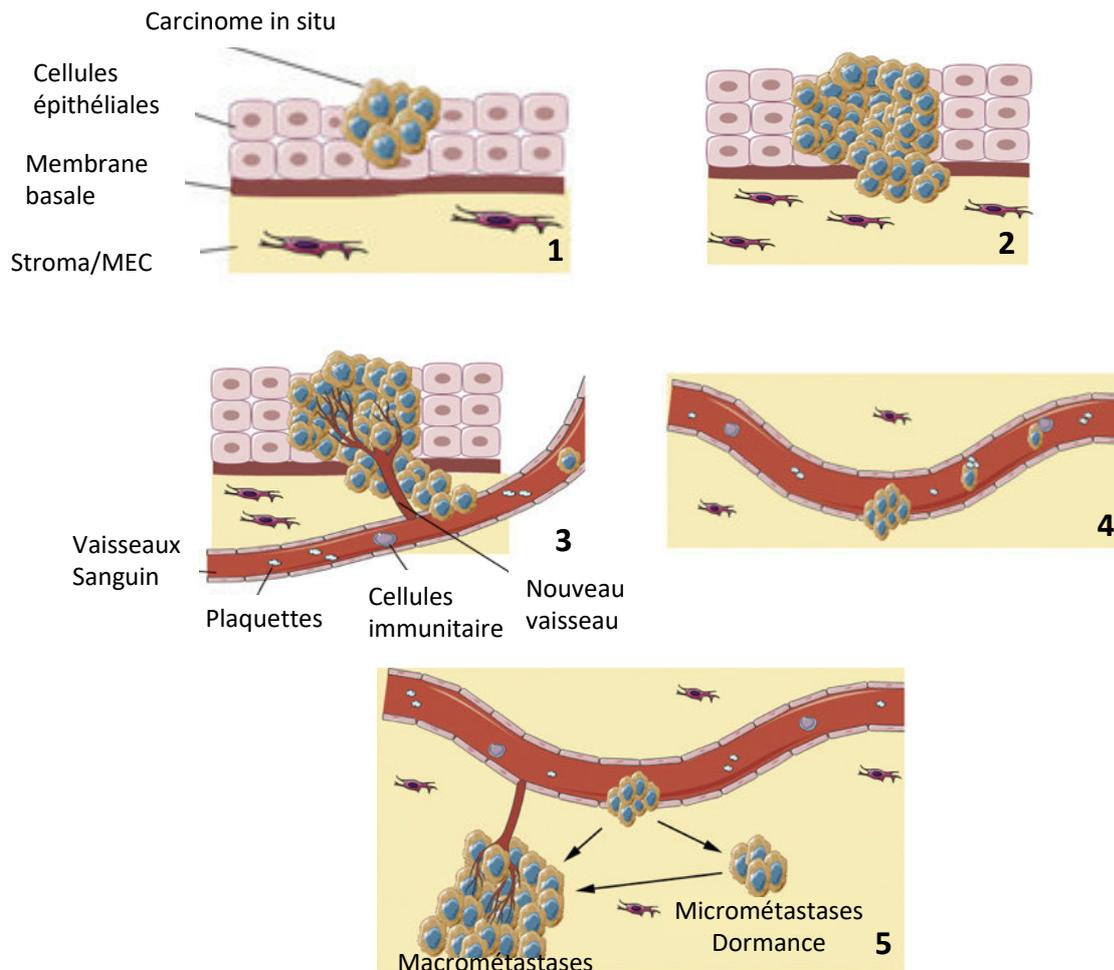


Figure 3: La cascade métastatique

1. Le carcinome se développe, les cellules expriment des mutations qui vont permettre l'acquisition d'un phénotype invasif. 2. Croissance importante dans la tumeur et invasion de la membrane basale afin d'atteindre les tissus environnants. L'augmentation de la mobilité est permise grâce à la modification des jonctions cellulaires (contact cellule-cellule ; cellule-matrice). 3. La néo-angiogenèse tumorale permet l'intravasation et le transport des cellules via la circulation. 4 Les cellules survivent dans la circulation en étant protégées par les plaquettes jusqu'à l'arrêt dans un site secondaire permis par un phénomène d'extravasation. 5. Invasion des tissus secondaires et formation de micro ou macro-métastases : les cellules tumorales migrent dans les tissus secondaires où elles interagissent et s'adaptent au microenvironnement, elles rentreront ensuite en dormance ou formeront des tumeurs secondaires.

b) Les grandes étapes de développement du cancer du sein

Les étapes précédemment décrites peuvent être superposées avec les études histologiques du cancer du sein qui permettent d'analyser les phénotypes morphologiques et cytologiques.

La première étape de la formation d'une tumeur mammaire consiste en l'apparition d'une hyperplasie canalaire atypique souvent due à une surexpression d'œstrogène et à l'absence des cytokératines 5/6 et 14. Ceci se traduit par l'apparition d'une couche cellulaire anormale due à la prolifération accrue des cellules épithéliales canalaire basales ou lumenales. Les

cellules épithéliales vont ensuite continuer de proliférer et d'acquérir des altérations géniques au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs ou d'oncogènes, ainsi que des modifications structurelles et fonctionnelles qui les conduisent vers un phénotype plus mésenchymateux. Le cancer en est au stade de carcinome canalaire ou lobulaire *in situ*. Les cellules tumorales sont relativement différenciées, avec une polarité cellulaire apico-basale, et expriment des molécules de jonction cellulaire telle que l'E-cadhérine (E-Cadh). A ce stade, les cellules ne sont pas infiltrées au-delà de la couche de cellules d'où elles proviennent.

Les carcinomes *in situ* peuvent évoluer vers des carcinomes invasifs également appelés « infiltrants ». Un processus de dédifférenciation se met alors en place. A cette étape les cellules tumorales sont hautement prolifératives et accumulent les altérations génétiques. De plus, elles développent des capacités d'invasion, d'inhibition de contact, une perte d'adhérence et sécrètent des protéases. Cela va favoriser la rupture de la membrane basale permettant ainsi aux cellules tumorales de coloniser les tissus mammaires adjacents. Les cellules se disséminent dans les vaisseaux sanguins et les ganglions lymphatiques puis peuvent gagner d'autres organes où elles pourront former les métastases (Rivenbark, O'Connor, et Coleman 2013) (Voir fig.4).

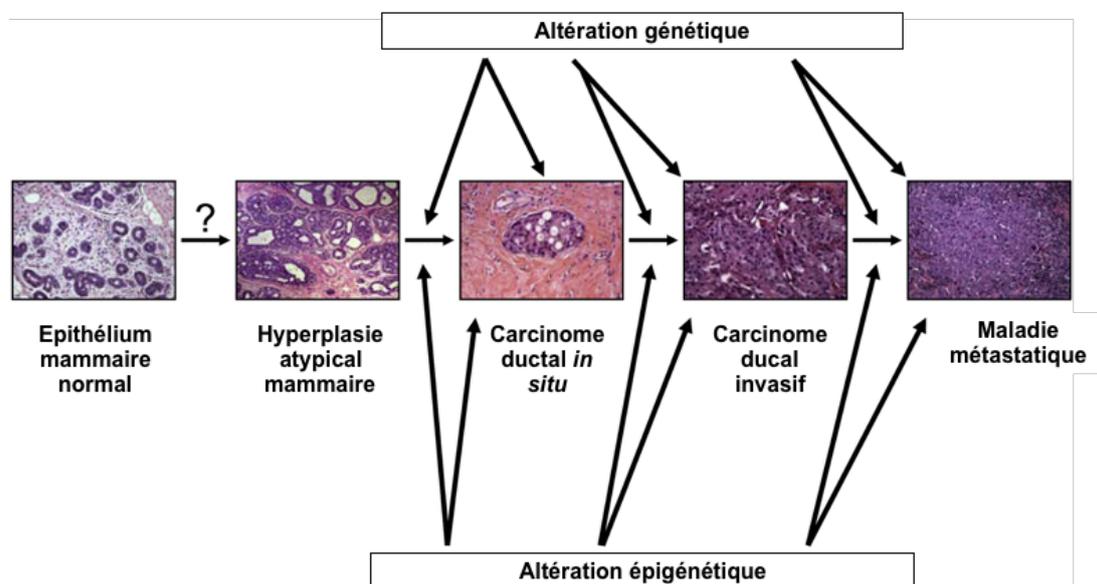


Figure 4: Histologies des étapes du développement d'un cancer du sein

*Le cancer du sein se développe à partir de cellules épithéliales normales qui développent une hyperplasie atypique (et éventuellement d'une dysplasie), d'un carcinome ductal (canalaire) *in situ* et d'un cancer du sein invasif (Tiré de (Rivenbark, O'Connor, et Coleman 2013)).*

2. Les aspects moléculaires du développement tumoral

a) Initiation tumorale et acquisition du potentiel invasif

Tout commence par l'initiation tumorale, qui peut être spontanée ou due à une exposition à un agent cancérigène. Une cellule ou un petit groupe de cellules subissent des modifications génétiques et/ou épigénétiques qui altèrent leurs phénotypes et/ou leurs fonctions.

Les cellules cancéreuses échappent à la mort cellulaire programmée par l'activation d'oncogènes tels que p53, HER2 et BRCA1/2, qui favorisent la survie des cellules et conduisent à une prolifération incontrôlée. Les cellules de cancer du sein peuvent alors surexprimer des récepteurs hormonaux qui vont influencer leur survie et leur prolifération. Il va y avoir alors une perte des agents protecteurs de dommages à l'ADN, accompagné d'une activation des voies de signalisation qui favorisent la survie, telle que les voies PI3K/Akt ou ras/MAPK (Toss et Cristofanilli 2015) (Voir fig.5).

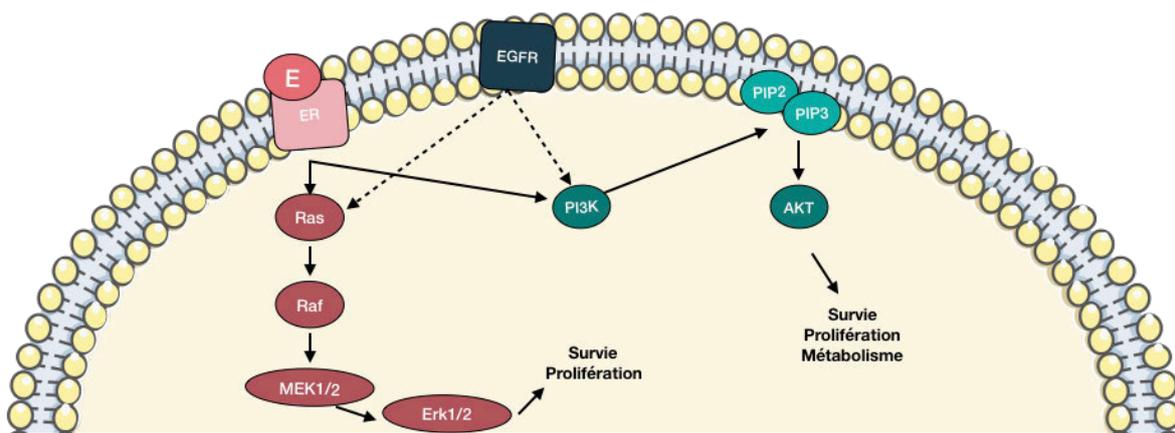


Figure 5: Voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire des cellules tumorales mammaires

(E : Œstrogène ; ER : Œstrogène récepteur ; EGFR : Récepteur de croissance épidermique) L'induction des voies RAS/MAPK et PI3K/Akt influencent la prolifération et la survie cellulaire. (Adapté de (Toss et Cristofanilli 2015)).

La rigidité de la matrice extracellulaire (MEC) influence aussi l'initiation et la progression tumorale. En effet, les propriétés mécaniques de l'environnement matriciel jouent un rôle important dans la régulation de la prolifération et des propriétés morphologiques des cellules cancéreuses. L'interaction entre les cellules et la MEC environnante implique classiquement l'expression d'intégrines à la surface des cellules qui interagissent et se lient aux composants de la MEC. L'interaction entre les intégrines et la MEC déclenche une série d'événements qui

d'une part aboutit à l'adhésion de la cellule à la MEC, mais également active des voies de signalisation intracellulaire favorables à la survie et à la prolifération comme la voie des MAPK, ou la voie Src/FAK. Cette interaction entre les intégrines et la MEC sert donc de mécanisme de communication. Ce processus d'adhésion cellule-matrice est essentiel pour la fixation des cellules cancéreuses à la matrice environnante et, par la suite, à la dégradation de la barrière matricielle (Pickup, Mouw, et Weaver 2014).

b) Croissante tumorale, rupture de la membrane basale et migration

Les cellules prolifératives au centre de la tumeur vont rapidement se retrouver en hypoxie, donc en manque d'oxygène. L'hypoxie est le stress le plus toxique du corps humain, il entraîne la mort cellulaire, pouvant aller jusqu'à la formation de nécroses. Les acteurs clé du mécanisme de survie à l'hypoxie sont les facteurs de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor), notamment HIF-1. En condition hypoxique, HIF-1 active plusieurs gènes impliqués dans l'angiogenèse tumorale, l'inhibition de l'apoptose, la survie cellulaire, la transition épithéliaux-mésenchymateuse (EMT) et la résistance aux traitements (Keith B. et al. 2011).

Il a également été démontré que l'hypoxie favorisait l'expression de protéine réticulant la matrice extracellulaire, comme les lysyl oxydases LOXs, et que la rigidité matricielle influençait le changement de phénotype cellulaire, notamment l'EMT (Pickup, Mouw, et Weaver 2014). Le rôle des LOXs dans ce processus sera abordé dans la suite de ce manuscrit.

Le phénotype cellulaire acquis par les cellules tumorales lors de l'EMT va se rapprocher de celui des cellules mésenchymateuses présentes dans les tissus de soutien de la glande mammaire. Ces cellules possèdent des capacités de pluripotence, moins de jonctions cellulaires plus souples, une polarité antéro-postérieure, et expriment des marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la vimentine, ou l'actine de muscle lisse (α SMA) (Lamouille, Xu, et Derynck 2014) (fig.6)

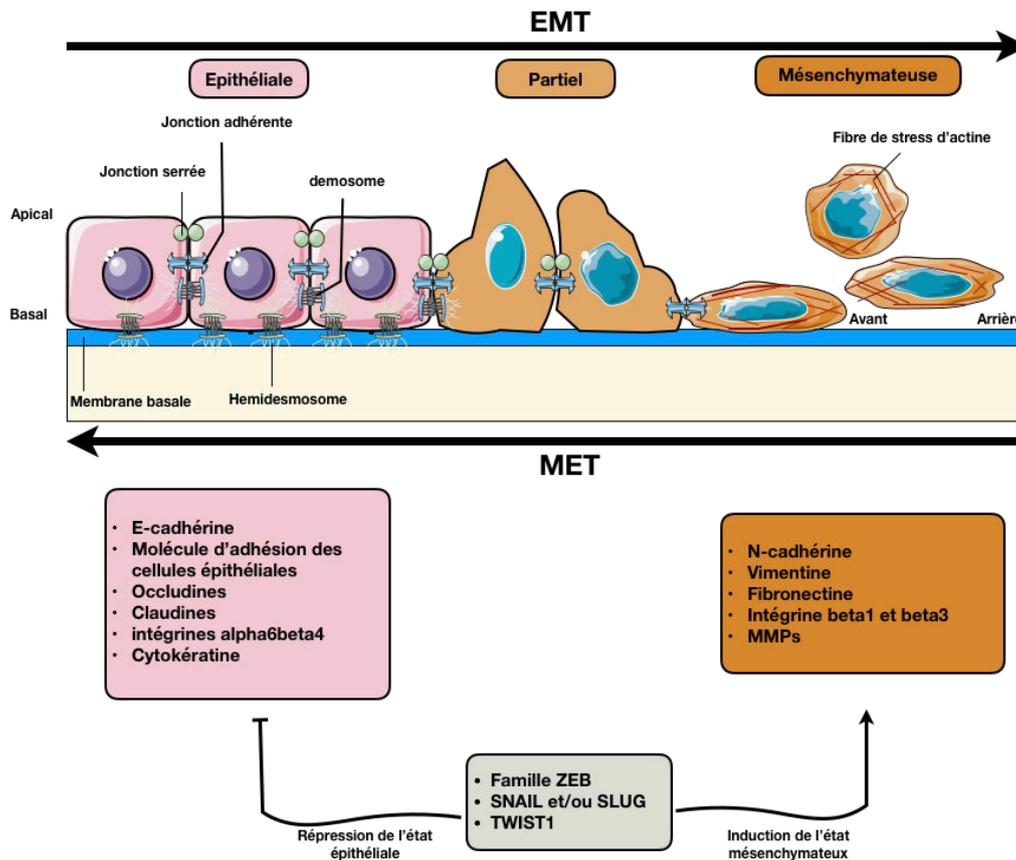


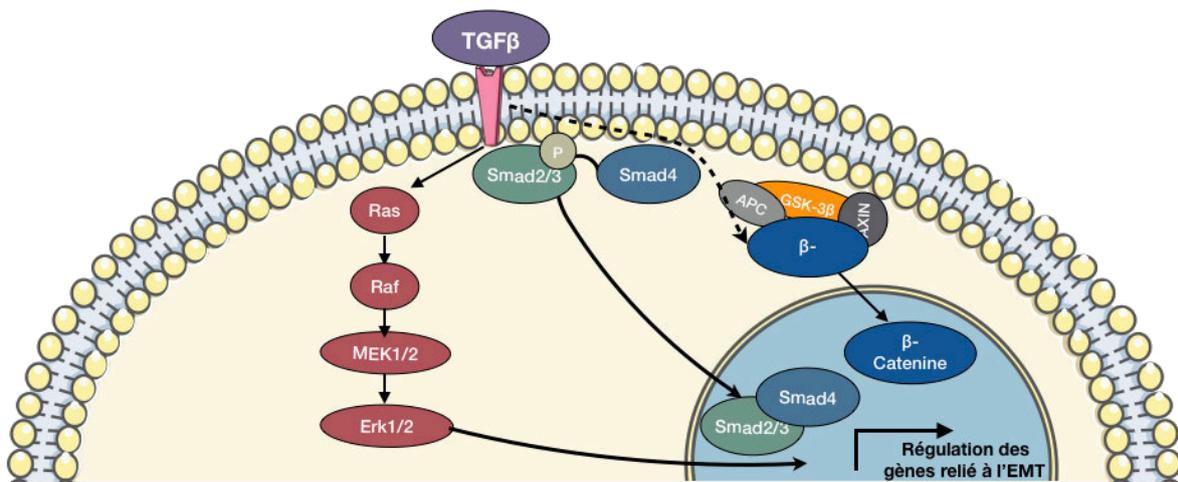
Figure 6: Représentation schématique d'un programme d'EMT

Les cellules épithéliales présentent une polarité apico-basale. Elles sont maintenues ensemble par des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes et sont attachées à la membrane basale sous-jacente par des hémidesmosomes. Ces cellules expriment des molécules associées à l'état épithélial qui aident à maintenir la polarité cellulaire (énumérées dans les cases roses). Lors de l'EMT, les cellules expriment des gènes associés à l'état mése nchymateux (énumérés dans la case orange foncé) et perdent leurs polarités cellulaires ce qui leur permet d'acquérir un phénotype plus migratoire. (Tiré de (Dongre et Weinberg 2019)).

L'EMT est un processus essentiellement embryonnaire présent lors de la gastrulation, de la formation du cœur et de la fermeture du palais. Chez l'adulte, elle est impliquée dans des fibroses rénales et pulmonaires (H. Y. Kim, Jackson, et Davidson 2017).

Pendant l'EMT, les cellules régulent à la baisse l'expression des protéines épithéliales. Il a été mis en évidence une implication majeure de TGFβ dans ses phénomènes : le TGFβ active la voie Smad qui inhibe E-Cadh (qui joue un rôle dans le maintien cellule/cellule et dans la régulation du cycle cellulaire) via la signalisation Snail/Slug/Twist. La répression de E-Cadh entraîne une libération de β-caténine qui se localise dans le noyau et active l'expression des marqueurs mése nchymateux qui coopèrent avec les molécules matricielles et les protéines

d'adhésion à la MEC, ce qui modifie les comportements cellulaires (Vallée et al. 2017; Yang et Yang 2017)(voir fig.7).



Marqueurs mésenchymateux:	Répresseur de la transcription:	Marqueur épithéliaux
Vimentine	Snail	E-cadhérine
N-Cadhérine	Slug	ZO-1
αSMA	Twist1	Claudines
MMPs	ZEB2	Occludines
...

Figure 7:La voie TGFβ dans la régulation de l'EMT

TGFβ déclenche l'activation de l'expression de gènes liés à l'EMT, comme les gènes codant pour des marqueurs mésenchymateux ou pour des facteurs de transcription qui régulent négativement l'expression des gènes codant pour les marqueurs épithéliaux. L'activation de la transcription peut être à la fois dépendante et indépendante des Smads, par l'activation de la voie Ras / ERK mais aussi par la translocation de la β-caténine dans le noyau. Adapté de (Vallée et al. 2017; Yang et Yang 2017)

Les cellules réorientent les programmes d'expression génique afin de promouvoir des modifications de l'architecture du cytosquelette via les voies de signalisations FAK/Src ce qui induit une perte de leurs jonctions (les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions lacunaires) et de leur polarité apico-basale, et permet alors la réorganisation du cytosquelette. Cette réorganisation conduit à l'élongation dynamique des cellules et à la mobilité directionnelle : les cellules vont former des projections membranaires riches en actine, les lamellipodes, qui facilitent le mouvement et agissent comme des extensions sensorielles du cytosquelette. Des extensions en forme de pointe appelées filopodes se trouvent au bord des lamellipodes. Lamellipodes et filopodes forment des invadopodes, qui exercent une fonction protéolytique principalement assurée par les

métalloprotéinases (MMP). Ceci permet la destruction de la lame basale favorisant ainsi l'invasion tumorale dans les tissus adjacents (Alexander et al. 2008; Lodillinsky et al. 2016).

Le passage de la membrane basale par les cellules cancéreuses est donc permis via l'activité protéolytique des cellules, mais aussi grâce au remodelage local de la membrane basale par des forces mécaniques et une synthèse anormale de la membrane basale autour de la tumeur primaire (Glentis, Gurchenkov, et Vignjevic 2014).

c) L'angiogenèse et l'intravasation

Un autre phénomène va jouer un rôle primordial dans le développement tumoral, l'angiogenèse. Cette dernière est dédiée à l'apport d'oxygène et de nutriments. Ce phénomène vital pour la survie tumorale est intrinsèquement reliée à l'invasion. Cette angiogenèse est permise par l'induction de facteurs pro-angiogéniques pouvant provenir des cellules stromales, tumorales, du sang ou de la matrice. L'acteur clé dans l'angiogenèse est le facteur de croissance VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Il est régulé à la hausse par l'expression d'oncogènes, par une variété de facteurs de croissance et également par l'hypoxie. La production de VEGF par la tumeur entraîne un « changement angiogénique ». Un nouveau système vasculaire est alors formé dans et autour de la tumeur, lui permettant de croître de manière exponentielle. On parle de néo-angiogenèse tumorale. Les nouveaux vaisseaux sanguins apportent une quantité croissante de nutriments et d'oxygène aux tumeurs en croissance, ce qui permet de recruter davantage de vaisseaux. Il a été démontré que plus une tumeur est vascularisée, plus les cellules tumorales sont susceptibles de rentrer dans la circulation sanguine. En effet, les vaisseaux sanguins nouvellement formés possèdent de nombreuses anomalies. Ils sont plus tortueux et plus perméables, ce qui favorise l'entrée des cellules tumorales (Magalhães et Dias 2019).

Un autre facteur de l'angiogenèse est le FGF (Fibroblaste Growth Factor) qui est impliqué dans la croissance vasculaire ainsi que dans l'augmentation du nombre de cellules tumorales pénétrant dans la circulation sanguine (Y. Zhao et Adjei 2015)

En plus de la formation d'une nouvelle vasculature, l'intravasation va être facilitée encore une fois par l'expression de métalloprotéinases et par la formation d'invadopodes qui permettent le passage de l'endothélium (Roh-Johnson et al. 2014). Il est également à noter que les macrophages, qui ont normalement pour rôle d'éliminer les cellules anormales

(endommagées ou mutées), peuvent être recrutés par les cellules tumorales, perdre leurs fonctions immunitaires, et induire une plus grande perméabilité des vaisseaux sanguins (Harney et al. 2015)

Une fois dans la circulation sanguine, les cellules tumorales alors appelée CTCs pour « Cellules tumorales circulantes » subissent un processus de sélection rigoureux. Dans la circulation, les CTCs vont donc interagir avec les plaquettes qui leur fournissent une protection en s'agrégeant tout autour d'elles. Les plaquettes recouvrent aussi les cellules tumorales de fibrine afin de les rendre non détectables par le système immunitaire (Alix-Panabières et Pantel 2014; Palumbo et al. 2007; Satelli et al. 2015).

d) L'extravasation, la formation de la niche pré-métastatique et la colonisation

L'extravasation est un mécanisme à la fois passif et actif. Celle-ci est active, car la circulation sanguine et lymphatique joue un rôle dans l'extravasation. En effet, les cellules après s'être détachées de la tumeur primaire, peuvent utiliser le système lymphatique ou la circulation sanguine, afin de voyager dans le corps pour coloniser d'autres organes. L'extravasation est un mécanisme qui peut aussi être passif, car la localisation de la tumeur primaire semble influencer les sites préférentiels de métastases. Par exemple, les cellules de cancer du sein ont tendance à métastaser préférentiellement dans l'os, le cerveau, le foie et les poumons (Yates et al. 2017). Alors que le cancer du côlon a quant à lui a tendance à former des métastases pulmonaires ou hépatiques (Riihimäki et al. 2016).

L'extravasation serait donc dirigée. C'est la théorie « Seed and soil » émise en 1889 par S. Paget selon laquelle les métastases ne se répartissent pas au hasard dans l'organisme, mais seulement dans un environnement approprié (Paget 1889). Il est ainsi supposé que les cellules tumorales possèderaient des affinités avec les protéines d'adhésion des cellules de l'organe cible ce qui favoriserait leur ancrage. Par exemple, les différents types de cancer du sein métastasent préférentiellement dans des sites distincts (Tableau 3).

Au niveau moléculaire, il a été défini que les différents sites de colonisation expriment des « patterns » de protéines spécifiques. A titre d'exemple, en ce qui concerne l'os, 15 protéines exprimées par les cellules cancéreuses mammaires ont été identifiées comme facteurs de médiation des métastases osseuses : la molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM-1), la cadhérine-11, l'osteoactivine, la sialoprotéine osseuse, le facteur de réseau de communication cellulaire 3 (CCN3), l'interleukine-11 (IL-11), le ligand de chimiokine 2 (CCL2), le récepteur de type 4 de chimiokine C-X-C (CXCR4), le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF), l'ostéopontine, le récepteur 1 de chimiokine CXC3 (CX3CR1), TWIST1, l'adrénomédulline et l'ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1). Déterminer le niveau d'expression de ces marqueurs dans les tumeurs pourrait donc permettre de mieux prévoir la ou les localisations des métastases (Awolaran, Brooks, et Lavender 2016).

Ce comportement pourrait aussi s'expliquer par le fait que la tumeur primaire serait capable de favoriser à distance la formation d'un microenvironnement favorable. C'est le concept de niche prémétastatique. Cet environnement serait mis en place avant l'arrivée des cellules tumorales. Le modèle expérimental du Dr. Kaplan illustre cette notion et montre que les cellules métastatiques de carcinomes pulmonaires injectées dans des souris traitées avec du milieu conditionné de mélanome métastasent dans des organes habituellement ciblés par les cellules métastatiques de mélanome (Kaplan, Psaila, et Lyden 2006). Différents facteurs ont été mis en évidence comme favorisant la formation de niches prémétastatiques. Dans le cancer du sein par exemple, VEGF-A et le PlGF (Placental Growth Factor) produits par la tumeur primaire ont été mis en évidence comme favorisant le recrutement, dans les poumons, de précurseurs hématopoïétiques exprimant le récepteur VEGFR1 ainsi que des progéniteurs endothéliaux et des macrophages. Cela modifie le microenvironnement local et entraîne la production d'autres molécules comme MMP9 et la chimiokine C-X-C motif Ligand 12 (CXCL12) qui seraient responsables du recrutement local des cellules tumorales circulantes (Kaplan et al. 2005). L'ostéoprotégérine, PtHRP (Parathyroïde Hormone-Related Protein), ou LOX produites par les cellules tumorales ont été montrées comme étant des acteurs majeurs dans la formation de cette niche prémétastatique en favorisant le recrutement des cellules tumorales dans la moelle osseuse, comme je l'expliquerai par la suite pour LOX (McAllister et al. 2008; X. Li et al. 2009; Ertler et al. 2009).

Les différentes parois des vaisseaux peuvent aussi jouer un rôle dans le choix des lieux de colonisation. En effet, la moelle osseuse par exemple sera plus facilement pénétrable car elle possède des vaisseaux avec une structure fenêtrée plus permissive à l'infiltration de cellules cancéreuses (Raymaekers et al. 2015).

Une fois dans le tissu secondaire, les cellules tumorales disséminées, appelées DTCs, vont établir une transition mesenchymato-épithéliale (MET). Ce phénotype épithélial va leur permettre de s'ancrer. Elles sécrètent alors des facteurs de croissance, des immunosuppresseurs et des facteurs pro-angiogéniques afin de s'adapter à leur nouvel environnement (Gunasinghe et al. 2012).

Tout au long de la cascade métastatique, les cellules subissent une sélection, à la fin il ne reste plus que les cellules cancéreuses les plus agressives. Le taux de mortalité due aux métastases est donc très important. Les cellules tumorales mammaires disséminent dans différents organes comme les poumons, le foie, le cerveau et les os. Les plus communes sont les métastases osseuses.

	Cérébrales	Osseuses	Pulmonaires	Hépatiques
Luminal A	6,6%	62,1 %	25,1 %	25,1 %
Luminal B	8,2 %	64,5 %	29,2 %	26 %
HER2	23,3 %	47,7 %	32,4 %	39,9 %
Triple négatif	18,1 %	32,2 %	35,2 %	23,8 %

Tableau 3 : Fréquence des sites métastatiques chez les patients avec un cancer du sein invasif (Tiré de(McGuire, Brown, et Kerin 2015)) .

Le principal problème posé par ce type de métastase, outre le fait qu'il n'existe pas de thérapie efficace, est la douleur et l'impact négatif qu'elles peuvent avoir sur la qualité de vie des patients. Il existe donc une nécessité de comprendre les mécanismes qui amènent à la formation de métastases osseuses afin de prévenir leur apparition.

II. La formation des métastases osseuses

Dans le but de mieux appréhender la description des processus impliqués dans le développement de métastases osseuses, il est essentiel de rappeler la physiologie et le fonctionnement de cet organe.

A. La physiologie osseuse

L'os est un tissu conjonctif solidifié qui forme le cartilage et le squelette. Le corps humain adulte est constitué de 206 os, de formes et de tailles variées. Il représente environ 1/5 du poids du corps humain. Contrairement aux autres tissus conjonctifs, ses composants extracellulaires sont minéralisés. Cela rend l'os fort et rigide et lui permet de remplir sa fonction la plus reconnue dans le corps, le support mécanique. C'est un tissu hautement spécialisé qui possède de nombreuses fonctions tant mécaniques que métaboliques : il charpente le corps et lui sert de structure de soutien ; il protège les organes vitaux et le système nerveux central ; il facilite le mouvement en servant d'insertion aux muscles, tendons et ligaments ; et il possède de nombreuses fonctions métaboliques, car il stocke le calcium, les sels minéraux, les facteurs de croissance et la graisse. Malgré son apparence inerte, l'os possède une structure complexe et dynamique, en perpétuel remodelage avec une architecture et une composition hétérogène.

1. La structure

L'os peut être classé suivant des critères morphométriques en trois catégories structurelles:

- Les os longs tels que le tibia, le fémur, le radius
- Les os courts, tels que les tarses, carpes et les vertèbres
- Les os plats, comme le crâne, le sternum ou les côtes

Nous ne décrivons en détail que la structure des os longs.

Un os long est divisé en 3 parties : l'épiphyse constitue l'extrémité de l'os, et est recouverte de cartilage articulaire. La métaphyse, la région intermédiaire de l'os, se situe entre l'épiphyse et la diaphyse. La diaphyse quant à elle est la partie la plus centrale de l'os, c'est la partie la

plus résistante. Elle est creusée par une cavité médullaire dans laquelle se loge la moelle osseuse. La moelle osseuse est un élément richement vascularisé, constitué de moelle jaune qui correspond au stockage de graisse, et de moelle rouge qui est responsable de l'hématopoïèse.

Les os sont recouverts de deux fines enveloppes conjonctives. Le périoste correspond à l'enveloppe externe de chaque os. Il est hautement vascularisé et hautement ostéogène, et il favorise la croissance et la cicatrisation de l'os. L'enveloppe interne quant à elle est appelée l'endoste. Elle est constituée des cellules ostéoprogénitrices et des cellules bordantes. L'espace entre le périoste et l'os quant à lui est appelé l'enveloppe périostée (fig. 8).

Les os peuvent aussi être divisés macroscopiquement en deux types distincts de tissu : l'os cortical (ou compact) et l'os trabéculaire aussi appelé os spongieux. Ces deux types de tissus ont la même composition matricielle, mais ils diffèrent par leur structure et leur fonction, et par leur répartition entre et dans les os. Macroscopiquement, l'os cortical correspond à l'os externe, constitué d'une couche lisse et dense. L'os trabéculaire quant à lui correspond à l'intérieur poreux de l'os.

L'os cortical représente 80% du squelette. C'est une structure compacte que l'on retrouve au niveau de la paroi externe de toutes les pièces osseuses, et au niveau de la diaphyse des os long. Il est responsable des propriétés de résistances mécaniques de l'os, en fournissant la force et la rigidité nécessaires à l'action musculaire et à la mise en charge, mais aussi la légèreté nécessaire pour une locomotion économe en énergie. Quant aux fonctions métabolique, l'os cortical ne semble pas jouer un rôle majeur dans l'hématopoïèse au-delà de la maturité squelettique (Fuchs, Thompson, et Warden 2019)

L'os trabéculaire quant à lui représente 20% du squelette. Il se situe au niveau du centre des épiphyses osseuses, et dans les zones métaphysaires. La forte porosité de l'os trabéculaire lui donne son apparence d'éponge. Il est constitué de travées osseuses interconnectées, des trabécules, formant un réseau tridimensionnel au contact de la moelle osseuse. Son rôle est essentiellement métabolique. Il constitue une surface d'échange entre les tissus interstitiels en fournissant une surface à la moelle rouge. Il facilite l'hématopoïèse et l'homéostasie

minérale. Il possède un petit rôle mécanique car il facilite la capacité de l'os à répartir uniformément les charges et à absorber de l'énergie, en particulier à proximité des articulations (Fuchs, Thompson, et Warden 2019) (voir fig.8).

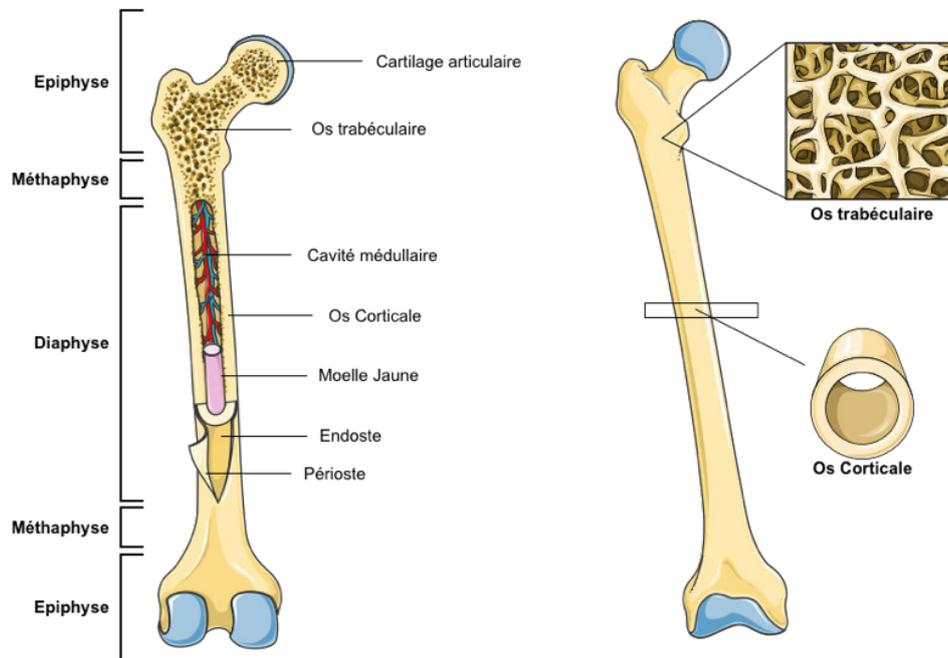


Figure 8: Anatomie macroscopique d'un os long

L'os long est constitué des épiphyses à chacune des extrémités qui sont elles-mêmes constituées d'os trabéculaire enfermé dans une coquille corticale plus mince. La métaphyse correspond à la zone entre l'épiphyse et la diaphyse. Au centre se trouve la diaphyse, constituée d'un os cortical, encerclant la cavité médullaire (moelle osseuse) constitué de moelle rouge et de moelle jaune. Les parois des os longs externes et internes correspondent respectivement au périoste et à l'endoste.

2. La composition cellulaire du tissu osseux

Le tissu osseux est composé d'une matrice extracellulaire qui représente 92 à 95% du volume osseux, le pourcentage restant correspond aux cellules osseuses : les ostéoblastes, les cellules bordantes, les ostéocytes et les ostéoclastes.

a) Les cellules osseuses dérivées des cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuse ont la capacité de se différencier en adipocytes, chondrocytes, myoblastes et en ostéoblastes (Garg et al. 2017). Les cellules de la lignée des ostéoblastes forment un groupe comprenant leurs progéniteurs mésenchymateux, les préostéoblastes, les ostéoblastes, les cellules bordantes et les ostéocytes.

(1) Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules productrices d'os. Ce sont des cellules mononuclées de forme cuboïde de 20 à 30 μm . Elles possèdent de nombreux ribosomes et mitochondries qui reflètent leurs fonctions de synthèse intensive de protéines nécessaires à la fabrication d'os nouveau. Elles sont disposées en monocouche à la surface osseuse (Blair et al. 2016).

Les ostéoblastes étaient autrefois considérés comme des cellules ayant pour seule fonction la production d'os, mais il a maintenant été démontré que leurs activités sont multiples. Ces cellules vont être responsable de la synthèse et du dépôt de collagène I (Coll I) et de protéines non collagéniques dans la matrice osseuse afin de produire une structure organique aussi appelée ostéoïde. Elles assurent la minéralisation par la production de cristaux d'hydroxyapatite, secrètent du phosphate de calcium, interviennent dans la régulation des ostéoclastes, dans l'hématopoïèse et possèdent des fonctions immunitaires (Ortner et Turner-walker 2003; Gosman 2012).

Les différentes étapes nécessaires à la maturation des ostéoblastes et à la formation de la matrice minéralisée, vont être marquées par l'expression de protéines, la synthèse du tissu ostéoïde puis par l'expression de marqueurs tardifs associés à la minéralisation osseuse.

Un des premiers activateurs de la différenciation ostéoblastique est l'activation des membres de la voie Wnt/ β -caténine, qui dirige le destin des cellules souches mésenchymateuses vers la lignée des ostéoblastes. Ceci est obtenu en inhibant l'expression des facteurs de transcription adipogéniques tout en induisant des facteurs de transcription ostéogéniques tel que Runx2 et Ostérix (OSX)(Wei et al. 2015; Joeng et al. 2017).

Runx2 intervient en début de différenciation. Il permet la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en pré-ostéoblaste et l'expression des gènes codant pour le Coll I, pour la phosphatase alcaline (ALP) et pour la sialoprotéine osseuse (BSP). Ostérix quant à lui est exprimé à des stades plus tardifs. Il agit en aval de Runx2 et permet la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures, capable de synthétiser différents composant de la matrice osseuse tel que le collagène de type I, l'ALP et plusieurs protéines non collagéniques, y compris l'ostéocalcine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse (Collins et al. 2017). A la

fin des processus de formation osseuse, 65% des ostéoblastes vont mourir par apoptose. Les cellules restantes deviennent des cellules bordantes inactives (Bonewald 2011) (voir fig.9). Ces cellules peuvent redevenir des ostéoblastes actifs si elles sont sollicitées. Elles possèdent une forme plate et allongée (en forme de fuseau) avec un noyau rond ou ovale, et peu d'organites. Elles recouvrent les surfaces osseuses qui à certains stades ne sont ni soumises à la formation, ni à la résorption osseuse, et sont reliées entre elles et avec les ostéocytes par des jonctions communicantes. La fonction principale des cellules bordantes est, de par leur position, d'assurer la communication entre la surface osseuse, l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse (Chow et al. 1998).

(2) Les ostéocytes

Les ostéoblastes qui ne sont pas morts par apoptose, ou inactivés en cellules bordantes vont subir une dernière étape de différenciation en ostéocyte. Ce sont les cellules les plus abondantes de l'os (90% à 95%) et les plus durables, atteignant des taux de survie allant jusqu'à 25 ans. Chaque ostéocyte possède un nombre élevé de prolongements dendritiques qui sont distribués dans les tissus environnants et atteignent la surface, en utilisant des canalicules à travers lesquels circulent de petites molécules, telles que l'oxyde nitrique et les prostaglandines. Elles participent à un vaste réseau de signalisation reconnu comme un élément fondamental dans le contrôle du remodelage osseux (Franz-Odenaal, Hall, et Witten 2006; Batra, Kar, et Jiang 2012). En effet, le réseau d'ostéocyte détecte les modifications mécaniques, les lésions osseuses profondes ou les modifications métaboliques afin d'établir un système de communication pour attirer les cellules nécessaires à l'adaptation de la charge, au lancement d'un remodelage dans le but de réparer les dommages, pour fournir un nouvel os, répondant aux besoins hormonaux systémiques comme l'homéostasie du calcium ou la fonction rénale (Atkins et Findlay 2012). Ces cellules possèdent une activité sécrétoire très importante. Pour activer un site de remodelage osseux en réponse à des stimuli mécaniques, elles vont libérer des molécules telles que RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor), Kappa-B Ligand et l'ostéoprotégérine (OPG). La libération d'ATP, qui module le taux de calcium intracellulaire, de Prostaglandine 2 (PGE 2) et d'oxyde nitrique va favoriser l'ostéo-formation et inhiber la résorption osseuse. Ceci va aussi entraîner la sécrétion de FGF, qui module la prolifération et la différenciation cellulaire, avec des actions analogues à celles des hormones

ou de DMP-1 (Dentin matrix acidic phosphoprotein 1) qui inhibe la minéralisation osseuse (Franz-Odendaal, Hall, et Witten 2006).

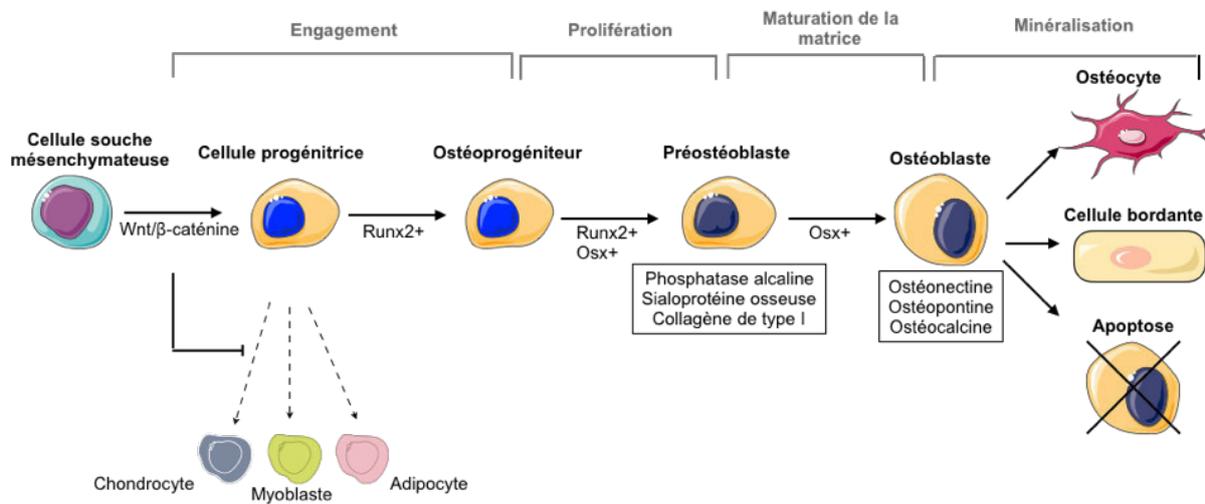


Figure 9: L'ostéoblastogénèse

Les protéines de la voie Wnt/ β -caténine exprimées dans les cellules souches mésenchymateuses stimulent l'expression du facteur de transcription RUNX2 qui va permettre la différenciation des précurseurs mésenchymateux en ostéoprogéniteur au détriment des lignées chondrocytaires, myoblastaires et adipocytaires. RUNX2 va ensuite participer à l'induction de la différenciation en pré-ostéoblastes. Par la suite OSX induit la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures capables de synthétiser la matrice osseuse et de minéraliser cette dernière. A la suite de cela, les ostéoblastes auront 3 destins possible : la différenciation en ostéocyte, devenir une cellules bordantes , ou l'apoptose (Adapté de (Collins et al. 2017))

b) Les cellules osseuses dérivées des cellules souches hématopoïétiques : Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules destructrices d'os dérivées des cellules souches hématopoïétiques, lignée commune aux monocytes et aux macrophages. Elles possèdent une morphologie très caractéristique quand elles sont activées, ce qui les rend reconnaissables dans les échantillons non décalcifiés. Ce sont des cellules géantes multinucléées et fortement polarisées, avec une région basale d'échange de signaux externes et une région liée à l'os calcifié sous forme de bordure en brosse. Ces cellules sont capables de se lier à l'os par l'intermédiaire des intégrines $\alpha\beta3$ exprimées à la surface de leurs podosomes. Elles ont aussi la propriété d'interagir avec les protéines de la matrice telles que l'ostéopontine et la vitronectine.

Plusieurs molécules de signalisation participent à l'activation et à la différenciation des ostéoclastes. L'intervention initiale de M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) est

nécessaire pour la différenciation. M-CSF secrété par les précurseurs ostéoblastiques (ostéoblastes et ostéocytes), se fixe sur son récepteur CSF1R/cfms (Colony Stimulating factor 1), ce qui stimule la prolifération et la survie des précurseurs ostéoclastiques et induit également la production du récepteur RANK, une protéine transmembranaire qui appartient à la famille des récepteurs du TNF (Tumor Necrosis Factor). Il a été démontré que les interleukines 6 (IL6) et 11 (IL11) pouvaient intervenir dans cette phase d'activation. Au cours de la seconde phase, l'expression de RANK sur la membrane caractérise la population destinée à se différencier en ostéoclaste. Lorsque ce récepteur lie son ligand RANKL, la cellule précurseur commence sa maturation après une migration à la surface osseuse et une fusion asynchrone. Elle devient une cellule polarisée multinucléée, capable d'activer l'ensemble du mécanisme de résorption. L'activation de RANK/RANKL augmente la fusion et la synthèse de protéines essentielles à la résorption osseuse. De plus, cette activation permet aussi la libération d'un signal intracellulaire de TRAF6, un facteur adaptateur, mais aussi l'activité de plusieurs cascades de signalisation parallèles telles que celles impliquant NF-KB, c-Fos, la phospholipase C et NFATc1. De plus, il a été démontré que les ostéoblastes et surtout les ostéocytes, fournissent un grand nombre de cytokines nécessaires à la différenciation des ostéoclastes (Asagiri et Takayanagi 2007; Arboleya et Castañeda 2013). Il a été aussi démontré que les ostéoblastes pouvaient inhiber cette différenciation ostéoclastique en sécrétant de l'ostéoprotégérine (OPG) qui est un récepteur leurre, inhibiteur naturel de RANK-L en empêchant son interaction avec RANK. Sa sécrétion augmente d'autant plus que le degré de différenciation des cellules est élevé. Le rapport OPG/RANK-L dans l'environnement, médié par les ostéoblastes, est donc un point de contrôle important dans le processus de résorption osseuse (Gasser et Kneissel 2017) (voir fig.10).

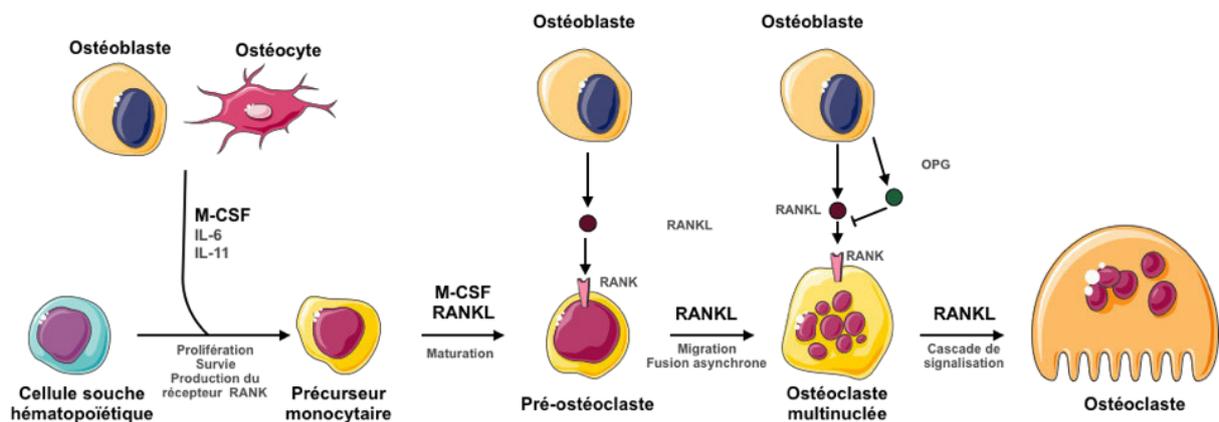


Figure 10: L'ostéoclastogénèse

Les cellules souches hématopoïétiques, sous l'action de M-CSF et de RANKL, vont se différencier en ostéoclaste mature. Cette différenciation commence sous l'action de M-CSF produit par les ostéoblastes et les ostéocyte. Les cellules souches hématopoïétique se différencient en précurseurs monocytaires, qui sous l'action de M-CSF et RANKL vont proliférer et maturer afin de former des pré-ostéoclastes. Ces pré-ostéoclastes vont migrer de façon asynchrone et fusionner afin de devenir des ostéoclastes multinuclés et matures (Adapté de (Gasser et Kneissel 2017)).

Après l'activation principale, la structure d'actine complexe de ces cellules permet la distribution des podosomes et la création d'une zone hermétiquement scellée de résorption qu'on appelle lacune de Howship, permettant l'échange d'ions, la libération d'enzyme lysosomales (Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP), la cathepsine K) et de métalloprotéases nécessaires à la résorption osseuse. Les lacunes de Howship sont très acides et peuvent atteindre un pH de 4,5 suffisant pour dissoudre la matrice osseuse. L'acidité de ce compartiment est entretenue par des pompes à protons ATPasiques spécifiques qui expulsent les ions H⁺. Alors que le pôle apical a pour rôle la dégradation de la matrice osseuse, le pôle basal de ces cellules a quant à lui pour fonction le maintien de l'équilibre électrochimique de l'ostéoclaste via des excréteurs d'acide et de base qui acidifient le cytoplasme (Ross 2013) (Fig.11).

Pôle basal

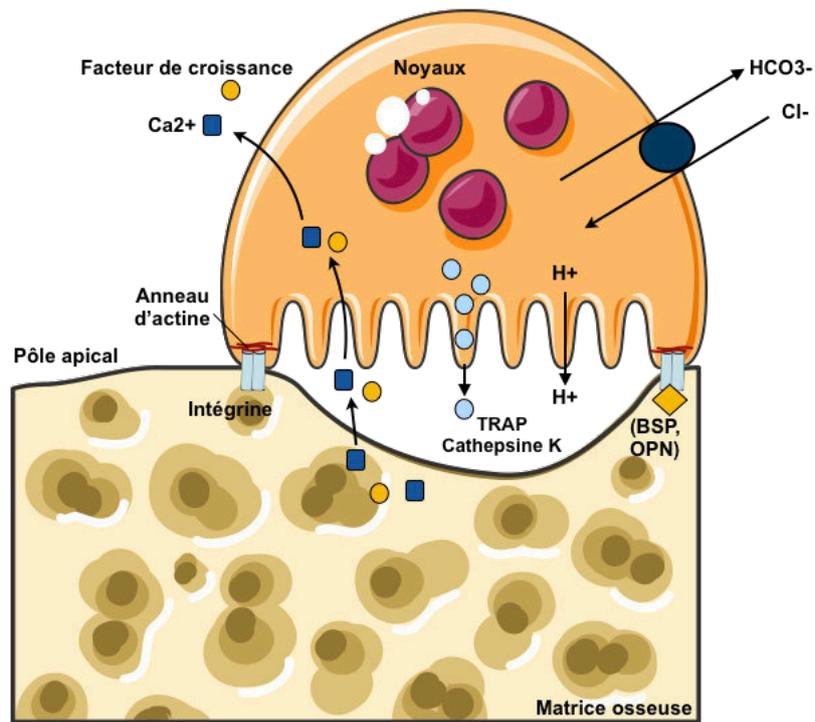


Figure 11: Représentation schématique de l'action d'un ostéoclaste mature

L'ostéoclaste adhérant à la matrice osseuse crée un environnement acide (libération de proton) au niveau de la chambre de résorption. Cette acidité va dissoudre la matrice minérale, entraînant un relargage de calcium et de facteurs de croissance. L'action des protéases spécifique des ostéoclastes TRAP et Cathepsine K, dégrade la matrice organique (Adapté de (Feher 2012)).

3. La composition matricielle du tissu osseux

a) La matrice organique

La matrice organique est composée principalement de collagène, notamment de collagène de type I (~ 90%), avec de plus petites quantités de collagène de type III, V, X et XII (Bhattacharjee et al. 2017). Les molécules de procollagène sont sécrétées par les ostéoblastes. La formation des fibres de collagène et notamment le rôle de la lysyl oxydase (LOX) dans cette formation sera abordé dans le chapitre suivant. Le collagène donne à l'os sa souplesse. En effet, sans collagène, l'os ne résisterait pas aux tensions et serait cassant comme de la craie. Il permet aussi la liaison des ions calciums à la matrice osseuse. En plus du collagène, les 10% restant de la matrice organique sont constitués de protéines non collagéniques telles que la fibronectine, l'ostéopontine, l'ostéocalcine et la sialoprotéine osseuse ainsi que de protéoglycanes tels que la décorine. La sialoprotéine osseuse et l'ostéopontine constituent la plus grande partie des protéines non collagéniques présentes dans la matrice osseuse. Bien que les protéines non

collagéniques ne contribuent que peu à la masse totale de la matrice organique, elles permettent l'échafaudage de l'os via la minéralisation osseuse en plus d'intervenir dans plusieurs fonctions importantes telles que la différenciation des ostéoblastes, l'adhésion cellulaire et le remodelage osseux (Kolb et Bussard 2019).

b) La matrice non organique

La matrice non organique aussi appelé « ostéoïde » est sécrétée par les ostéoblastes. Elle est la première réserve en minéraux dans l'organisme. Elle contient 99% du calcium, environ 85% du phosphore et entre 40% et 60% du sodium et du magnésium du corps. Les ions de cette matrice organique se logent autour et dans les fibres de collagène. L'ajout de ces minéraux au collagène fournit à l'os sa rigidité. Sans lui, le tissu serait très flexible, avec des propriétés similaires à celle d'un élastique. Ce mélange collagène/minéraux fournit à l'os sa capacité à trouver un équilibre entre sa flexibilité et ses exigences de rigidité (Seeman et Delmas 2006). Ces minéraux forment des cristaux d'os sous forme d'hydroxyapatite de calcium ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). La formation de ces cristaux implique l'ostéocalcine qui capte les ions Ca^{2+} , et les ostéoblastes qui génèrent les vésicules riches en phosphatases alcalines ce qui permet l'accumulation d'ions Ca^{2+} et PO_4^- . Ces cristaux d'hydroxyapatite peuvent être trouvés à la surface et imprégnés dans les zones de trous (lacunes) des fibrilles de collagène (Fuchs, Thompson, et Warden 2019).

4. Le remodelage osseux

Le tissu osseux est continuellement remodelé. Chez l'humain adulte, 5 à 10% d'os existant sont renouvelés chaque année. Le remodelage fait intervenir toutes les structures précédemment abordées. En effet, celui-ci est accompli par un groupe de cellules appelées collectivement l'unité de remodelage osseux (BRU ou Bone Remodeling Unit). Les cellules qui constituent le BRU sont les ostéoblastes, cellules qui comme on l'a vu précédemment produisent la matrice osseuse organique et facilitent la minéralisation osseuse; les ostéoclastes, cellules qui sont responsables de la dégradation des os et de la matrice extracellulaire; les ostéocytes, situées dans la matrice osseuse et qui jouent le rôle de mécanosenseurs et de cellules endocrines; et les cellules bordantes, cellules qui compartimentent de remodelage osseux au niveau de l'os trabéculaire et aident à coupler la formation osseuse à la résorption. Un cycle de remodelage osseux comprend quatre phases distinctes : l'initiation, la résorption, l'inversion et la formation (voir fig.12).

La phase d'initiation : celle-ci est induite par une contrainte mécanique, une lésion ou par des signaux cytokines ou des facteurs systémiques comme les estrogènes ou la Parathyroïde hormone (PTH). Cela génère des signaux locaux qui amènent les cellules qui tapissent l'os à se séparer de la surface de l'os et à former une voûte sur le site à résorber. Les ostéoclastes et leurs précurseurs sont ensuite recrutés sur le site du remodelage osseux à partir du système circulatoire via des capillaires étroitement associés au remodelage osseux. Les signaux précédemment décrits pour l'initiation de la différenciation des ostéoclastes et de la résorption sont mis en place (Sims et Martin 2014).

La résorption : une fois le processus de remodelage initié, la résorption de l'os se produit. Les ostéoclastes se fixent à la surface exposée de la matrice minéralisée où ils se polarisent et forment un microenvironnement scellé pour décomposer les composants inorganiques et organiques de l'os (Väänänen 2005). Le principal acteur de cette étape est RANKL. Il est sécrété par les ostéocytes et favorise la résorption osseuse. La Parathyroid Hormone related Protein (PTHrP) est aussi connue pour induire l'ostéoclastogénèse, par stimulation de l'expression de RANKL dans les ostéocytes. Une perte d'hormones sexuelles peut quant à elle favoriser la résorption osseuse en augmentant l'apoptose des ostéocytes, qui par un mécanisme encore inconnu sécrètent beaucoup de RANKL lors de leur mort (Fu, Manolagas, et O'Brien 2006; Xiong et O'Brien 2012).

L'inversion : après la résorption de l'os âgé, le processus est inversé. Ce qui a pour but de garantir le remplacement du volume de l'os enlevé. C'est un processus multiforme qui implique de nombreuses molécules régulatrices. Cette phase correspond au détachement des ostéoclastes qui meurent par apoptose. Des cellules d'inversion appelées ostéomacs, issus de la lignée macrophagique apparaissent et éliminent les débris. La résorption osseuse libère de nombreux facteurs de croissance qui vont activer les ostéoblastes qui pénètrent dans la fosse de résorption pour éliminer le collagène déminéralisé en déposant une nouvelle couche mince et produisent l'OPG (Simonet et al. 1997; Sims et Martin 2014).

La formation : la formation osseuse est un processus en deux étapes qui se déroule lentement. Elle prend environ 3 mois alors que la résorption prend généralement 3 semaines. L'ostéoblaste sécrète d'abord l'ostéoïde non minéralisé, lequel est ensuite minéralisé par l'incorporation d'hydroxyapatite. Lorsque l'ostéoblaste a terminé la formation de la matrice,

il subit les différents destins précédemment abordé (Caetano-Lopes, Canhão, et Fonseca 2007).

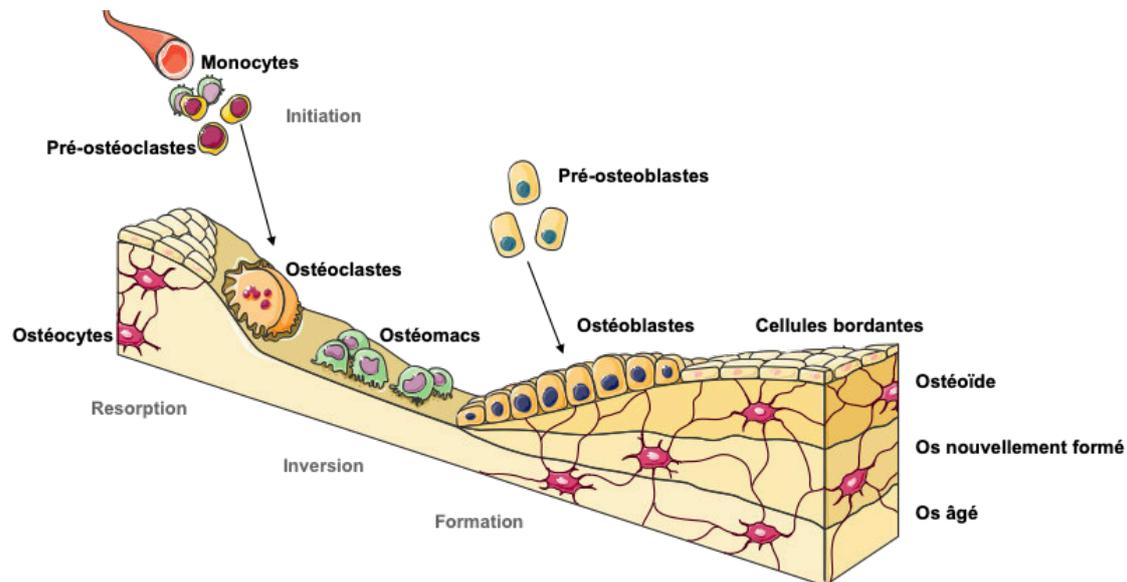


Figure 12: Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est constitué de 4 étapes: une phase d'initiation où les ostéoclastes vont être activés ; une phase de résorption de la matrice osseuse ; une phase d'inversion qui fait intervenir les ostéomacs et active les ostéoblastes ; et une phase de formation osseuse qui se terminera par l'apoptose des ostéoblastes, la transformation en cellules bordantes ou une différenciation en ostéocytes (Fuchs, Thompson, et Warden 2019).

5. Les niches osseuses

La niche est un concept proposé par Schofield en 1978 qui propose l'hypothèse d'un environnement capable de réguler la survie, la quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Schofield 1978).

De nos jours, cette théorie semble converger vers l'existence de deux types de niches distinctes non cloisonnées l'une de l'autre : la niche endostéale, aussi appelé niche ostéoblastique, et la niche vasculaire et périvasculaire.

a) La niche endostéale

La niche endostéale se trouve comme son nom l'indique au niveau de l'endoste. Cette région est bordée d'un groupe hétérogène de cellules ostéoblastiques à différents stades de différenciation, dont seule une fraction est constituée d'ostéoblastes complètement matures capables de synthétiser de l'os. Des ostéoclastes tapissent également l'endoste et équilibrent de manière dynamique la formation osseuse avec les ostéoblastes. Plusieurs études ont mis en évidence que les cellules ostéoblastiques interviennent dans le maintien et le soutien des

CSH dans la niche. Il a été démontré qu'une augmentation du nombre de cellules ostéoblastiques *in vivo* était en corrélation avec une augmentation du nombre de CSH. De plus, une co-greffe d'ostéoblastes et de CSH chez la souris améliore considérablement la prise de greffe (Taichman, Reilly, et Emerson 2000; Calvi et al. 2003; Jiwang Zhang et al. 2003).

Les cellules ostéoblastiques dans la niche endostéale synthétisent un certain nombre de cytokines qui contribuent au maintien et à la régulation des CSH, telle que la thrombopoïétine (THPO) et l'angiopoïétine (Ang-1), qui se lient aux récepteurs de surface cellulaire MPL et Tie2, respectivement, qui sont exprimés sur les CSH. Il a été montré qu'une absence de ces cytokines entraînait un nombre réduit ou un défaut de CSH dans la moelle osseuse. Il a également été démontré que l'interaction de Ang-1 avec son récepteur Tie2 améliore la quiescence et maintient la capacité de repeuplement à long terme des CSH, tout en protégeant contre l'apoptose en activant la voie PI3K (Arai et al. 2004; Qian et al. 2007).

En plus de sécréter des cytokines importantes dans la régulation des CSH, les ostéoblastes expriment également une gamme de récepteurs d'adhésion et de ligands qui contribuent au maintien des CSH dans la niche endostéale. C'est le cas de Jagged, un ligand des récepteurs Notch exprimé par les CSH (Varnum-Finney et al. 2011).

Les chimiokines et leurs récepteurs vont eux aussi contrôler le comportement des CSH en régulant la migration, la localisation et la libération des CSH de la moelle osseuse. La chimiokine, la plus étudiée dans ce processus est CXCL12. Celle-ci est sécrétée par les cellules du microenvironnement osseux et permet l'interaction avec les CSH qui expriment le récepteur CXCR4 (Link 2015).

Bien que les cellules ostéoblastiques soient les plus étudiées en termes de maintenance des CSH dans la niche endostéale, de nombreux autres types de cellules sont présents dans cette niche et semble être impliqués dans la régulation. De nombreuses preuves suggèrent que les ostéoclastes jouent un rôle important dans la régulation des CSH dans la moelle osseuse. En effet, la dégradation des os par les ostéoclastes libère des facteurs intégrés à la matrice osseuse comme le facteur de croissance TGF β 1, les protéines morphogéniques osseuses (BMP) et les ions calcium. Il a été mis en évidence que TGF β 1, BMP-2 et BMP-7 améliorent la quiescence et le maintien des CSH (Bhatia et al. 1999; Batard et al. 2000). Les ostéomacs quant à eux semblent favoriser la mobilisation des CSH de la moelle osseuse en agissant sur les

cytokines sécrétées par les ostéoblastes, telles que Ang-1, le ligand KIT et CXCL12 (Winkler et al. 2010)(voir fig.13).

b) La niche vasculaire et périvasculaire

La moelle osseuse est fortement vascularisée. L'artère médullaire alimente les artérioles, les capillaires, et les sinusoides. Les sinusoides sont des vaisseaux sanguins spécialisés, dotés de parois minces avec un agencement fenêtré de cellules endothéliales qui permettent le passage de cellules hématopoïétiques. Les sinusoides forment un réseau étendu dans toute la moelle osseuse. Des preuves indiquent que de nombreuses CSH sont situées près des sinusoides des niches vasculaires. En effet, la mobilisation rapide des CSH quelques minutes après l'administration d'un activateur de la libération des CSH de type G-CSF montre qu'une grande partie des CSH doivent être très proches des vaisseaux sanguins (Heissig et al. 2002). Les cellules endothéliales qui constituent les sinusoides sont donc un composant important de la niche vasculaire. Il a été montré que certaines populations de cellules endothéliales pouvaient soutenir l'expansion de CSH *in vitro* et que les cellules endothéliales jouent un rôle important dans l'hématopoïèse *in vivo*. En effet, les cellules endothéliales sont des composants essentiels de la niche des CSH et la signalisation endothéliale de gp130 est cruciale pour le maintien de l'hématopoïèse (Weiming Li et al. 2004; L. Yao et al. 2005).

La niche vasculaire est aussi constituée de cellules réticulaires abondantes ou CAR. Ces cellules forment un groupe de cellules situées autour de l'endothélium sinusoides, et jouent un rôle important dans la localisation et la fixation des CSH dans la moelle osseuse, du fait de leur abondante sécrétion de CXCL12 (Omatsu et al. 2010). D'autres cellules présentes à proximité des sinusoides ont été montrées comme intervenant sur les CSH dans la niche. C'est le cas des mégacaryocytes qui induisent la quiescence des CSH via la production de TGF- β (M. Zhao et al. 2014) (fig.13).

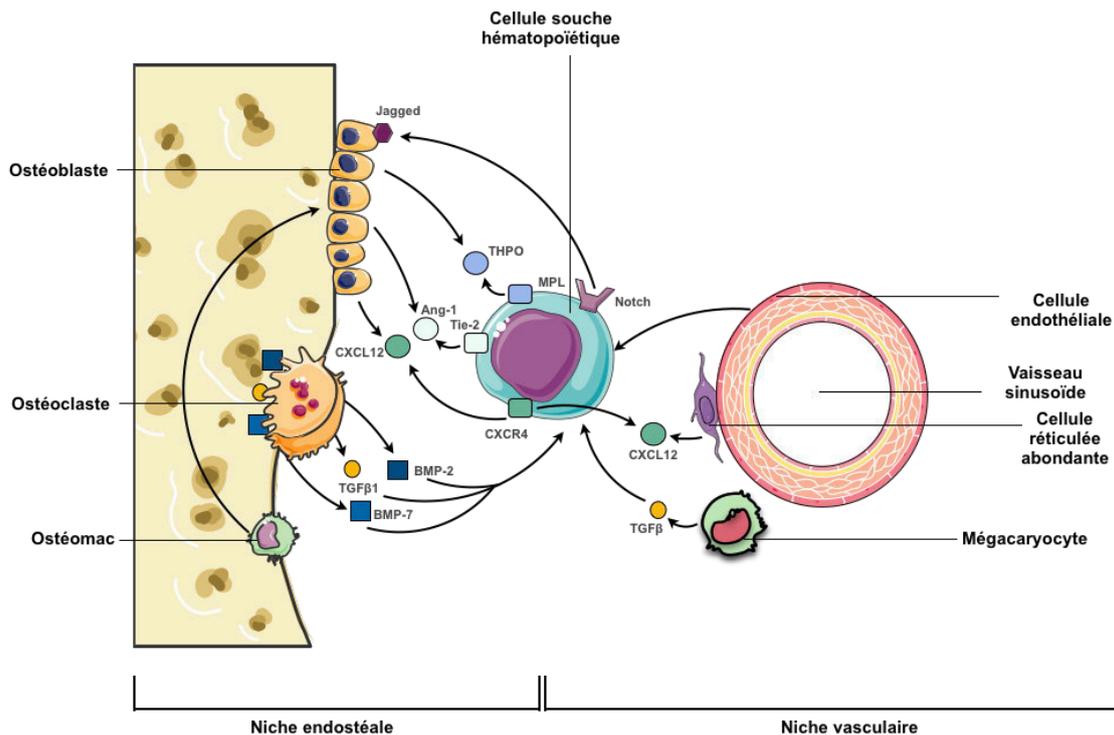


Figure 13: Les niches osseuses

Schéma représentant les niches osseuses endostéale et vasculaire. Chacun des acteurs de ces deux niches expriment ou sécrètent des facteurs qui vont favoriser l'attraction des cellules souches hématopoïétiques et leurs quiescences.

B. Les métastases osseuses

Les métastases osseuses surviennent le plus fréquemment dans les régions suivantes : les vertèbres, le bassin, les côtes, le fémur, l'humérus, et le crâne. Elles sont à l'origine d'une forte morbidité chez les patients. Elles sont responsables de nombreuses douleurs, fractures pathologiques, compressions médullaires et plus rarement d'hypercalcémie. Il existe une relation directe entre l'extension des métastases osseuses et la survie des patients. A l'heure actuelle, le traitement des métastases n'est que palliatif, c'est pourquoi il est nécessaire de comprendre leurs fonctionnements et leurs modes d'action afin de diminuer leur incidence et d'améliorer la prise en charge.

Ce type de métastases résulte d'une cascade d'événements dont certaines étapes sont communes à tous les mécanismes métastatiques abordés précédemment tels que la migration, l'intravasation, l'établissement d'une niche pré-métastatique, le chimiotactisme, et l'extravasation. Mais elles présentent aussi des caractéristiques spécifiques comme la colonisation de la moelle osseuse aussi appelé « l'ostéotropisme », l'ostéomimétisme, et la dérégulation des ostéoblastes et ostéoclastes.

Le processus de développement de métastases osseuses commence par la colonisation, lorsque les cellules tumorales en circulation pénètrent dans l'os et s'ancrent dans les niches osseuses. La deuxième étape implique la survie et la dormance. Les cellules tumorales s'adaptent à leur nouveau microenvironnement, échappent au système immunitaire et restent à l'état dormant pendant de longues périodes. La troisième étape est la réactivation des cellules dormantes et le développement de micrométastases. La dernière étape est la croissance des cellules tumorales et la formation de tumeurs secondaires proprement dites. Lorsque la métastase se développe les cellules deviennent indépendantes du microenvironnement et agissent sur les composants osseux afin d'en modifier l'activité donc la structure osseuse (Fig.14).

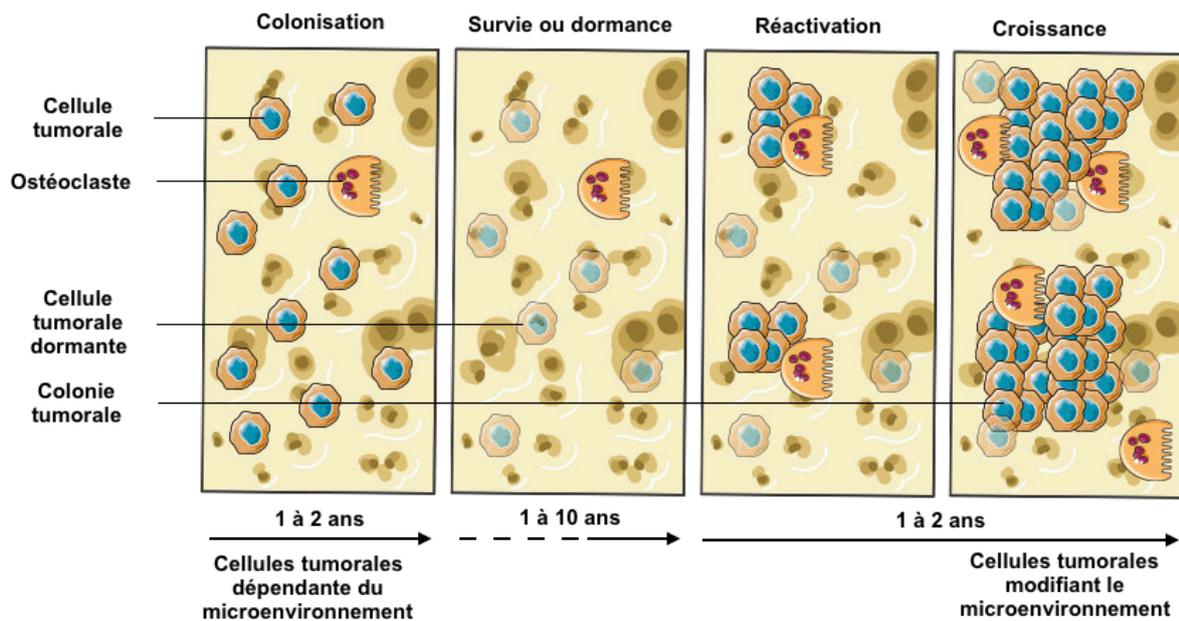


Figure 14: Les différentes étapes du développement de métastases osseuses

Le développement des métastases osseuses commence par la colonisation de la moelle osseuse par des cellules tumorales. Elles survivent et s'adaptent à l'environnement local et, selon leur localisation, forment immédiatement de nouvelles tumeurs ou entrent en dormance. Cette phase peut durer jusqu'à des décennies. Parmi les cellules qui survivent, un nombre limité sera réactivé pour former des micrométastases, qui rentrent dans une phase de croissance, et forment des métastases osseuses qui contrôlent le microenvironnement (Adapté de (Croucher, McDonald, et Martin 2016)).

1. L'ostéotropisme

Bien que le squelette soit un environnement permissif de par sa vascularisation importante, ses propriétés physiques en font un site difficile pour des cellules tumorales disséminées. Le succès de la colonisation des cellules cancéreuses dans le microenvironnement osseux dépend

des propriétés intrinsèques des cellules tumorales disséminées, qui sont régies par le microenvironnement tumoral primaire, et par les caractéristiques acquises déterminées par le microenvironnement osseux distant. La migration spécifique vers l'os s'appelle l'ostéotropisme et suppose que les cellules tumorales qui disséminent à l'os expriment des récepteurs et des molécules d'adhésion nécessaires à cette colonisation.

Bien que des signatures au niveau de la tumeur primaire aient été mises en évidence comme nous l'avons abordé dans le chapitre précédent, la progression des métastases résultant d'une dissémination précoce des cellules est également susceptible d'entraîner une variation intraclonale accrue entre la tumeur primitive et les métastases osseuses individuelles. De ce fait, les signatures géniques dans la tumeur primaire peuvent grandement différer de celles de la métastase osseuse. Néanmoins, les cellules tumorales qui sont capable de coloniser l'os expriment des répertoires spécifiques de molécules qui facilitent la colonisation. Par exemple, l'expression du récepteur de chimiokine CXCR4 facilite la chimiotaxie des cellules tumorales à l'os. De plus, l'inhibition du récepteur CXCR4 chez la souris semble favoriser la remise en circulation des cellules tumorales les rendant sensibles à la chimiothérapie (Xiang et al. 2015).

Il a aussi été mis en évidence que les fibroblastes associés au cancer (CAFs) imposent une pression sélective sur les clones des cellules tumorales qui expriment les récepteurs aux facteurs CXCL12 et IGF1 (Insuline-like Growth Factor 1), ce qui amorcerait la formation de métastases dans un microenvironnement riche en CXCL12 tel que la moelle osseuse (X. H.-F. Zhang et al. 2013).

Les cellules tumorales expriment également des récepteurs de cytokines, qui peuvent contribuer à la colonisation. Par exemple, les cellules de cancer du sein peuvent exprimer le récepteur RANK. Leur ligand RANKL étant abondamment produit par les ostéoblastes, on peut supposer que cela va favoriser la migration de ces cellules cancéreuses dans l'os (Jones et al. 2006). L'expression d'intégrines par les cellules tumorales, dont $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ qui peuvent se lier à l'ostéopontine, à BSP et à la vitronectine exprimées par les cellules de la lignée ostéoblastique, peut aussi être impliquée dans cette migration préférentielle des cellules tumorales à l'os (Chiechi et Guise 2016). Des enzymes modifiant la MEC peuvent aussi être sécrétées par la tumeur primaire, et via la circulation, atteindre un organe cible comme l'os

pour en modifier la structure matricielle et favoriser la colonisation. C'est le cas de la LOX comme je l'aborderai plus précisément dans le chapitre sur les LOXs (Erlor et al. 2006; Cox et al. 2015; Reynaud et al. 2017).

2. L'ostéomimétisme

Une fois dans l'os, les cellules tumorales se retrouvent dans un environnement hostile, qui nécessite une adaptation. Les cellules tumorales se localisent dans les niches, qui vont favoriser la survie et la dormance des cellules. Afin de s'adapter au nouvel environnement tumoral, les cellules développent un comportement d'ostéomimétisme. L'ostéomimétisme correspond à l'expression de gènes par les cellules tumorales exprimés normalement par les cellules osseuses (Croucher, McDonald, et Martin 2016). Par exemple, les cellules cancéreuses mammaires peuvent acquérir un phénotype ressemblant à un ostéoblaste en exprimant de manière ectopique des protéines de matrice osseuse telles que la sialoprotéine osseuse, l'ostéopontine, l'ostéoprotégérine, la cathépsine K, l'ostéonectine, des cadhérines spécifiques aux ostéoblastes comme la cadhérine 11 (CDH11) et des facteurs de transcription qui régulent le remodelage osseux comme le facteur de RUNX2 (Tan et al. 2016).

La localisation dans les niches métastatiques

L'hypothèse la plus avancée pour expliquer la localisation des cellules tumorales disséminées dans la moelle osseuse est que celles-ci rentreraient en compétition avec les CSH et coloniseraient leur niche. Une étude a démontré que l'augmentation du nombre de niches de CSH favorisait l'augmentation du nombre de DTCs dans la moelle osseuse. Ceci indique que des mêmes signaux de guidage peuvent être exploités par les cellules tumorales et les CSH. Les deux médiateurs les plus importants dans le microenvironnement des CSH sont le chimio-attractant CXCL12 et le facteur d'attachement des cellules Annexin2 (ANXA2). CXCL12 régule la localisation des CSH dans la moelle osseuse ou leur mobilisation dans la circulation, alors qu'ANXA2 semble être impliqué dans la liaison des CSH à la niche ostéoblastique. Cette même étude a également montré que les cellules tumorales prostatiques et les CSH rentreraient en compétition pour la colonisation des niches lors d'injection simultanée. En effet, les souris co-injectées présentaient moins de colonisation tumorale et une augmentation des CSH dans le sang (Shiozawa et al. 2011)(fig.15).

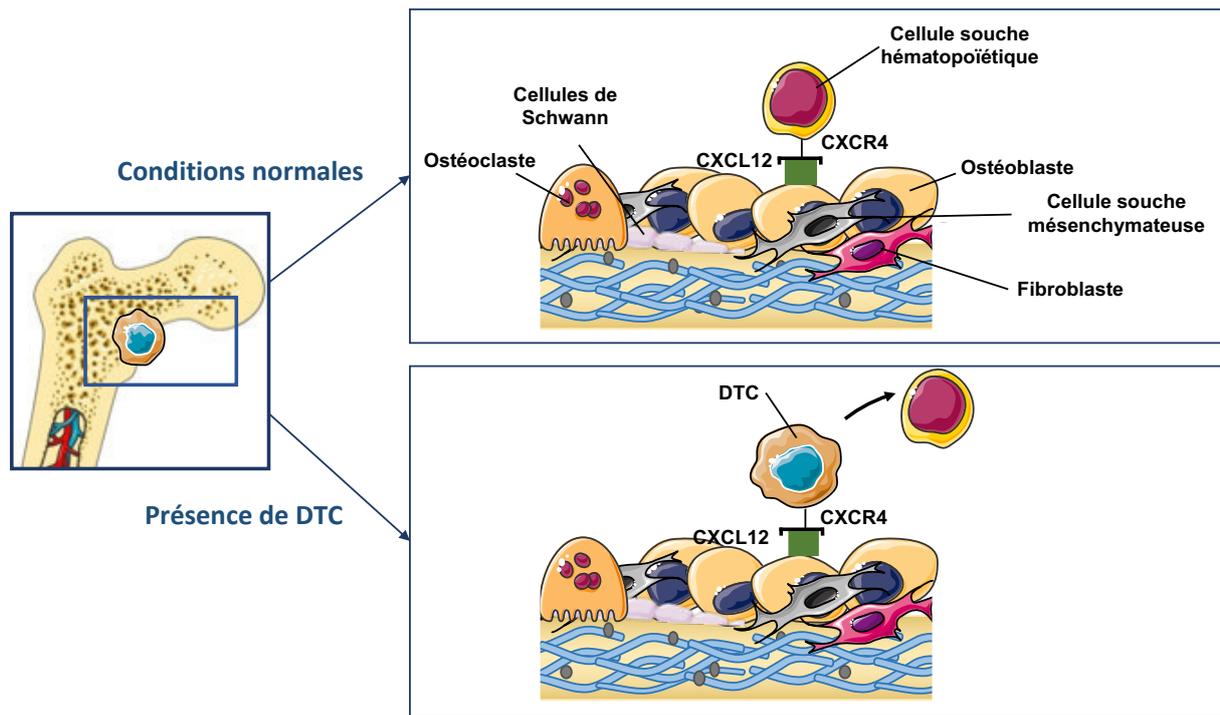


Figure 15: Compétition entre les cellules souches hématopoïétiques et les cellules tumorales disséminées au sein des niches

Dans les niches périvasculaires et endostéale de la moelle osseuse, les cellules de la lignée des ostéoblastes produisent des facteurs, comme le CXCL12 qui retiennent les CSH dans la moelle osseuse et aident à maintenir leurs capacités de repos et d'auto-renouvellement. Une fois dans la niche, les DTC entrent en compétition avec les CSH afin de bénéficier des avantages de leur environnement.

3. Les différents types de métastases

Une fois adaptées à l'environnement osseux, les cellules tumorales qui échappent à la dormance sont capables de croître et de former des métastases qui vont altérer l'équilibre osseux en agissant sur les cellules formatrices ou destructrices de l'os.

Les métastases osseuses sont classées en 3 types différents : ostéocondensantes, mixtes et ostéolytiques. Le phénotype de ses métastases est défini par le détournement de l'équilibre de l'activité ostéoblastes/ostéoclastes (fig.16).

Différents facteurs vont agir sur les ostéoclastes et les ostéoblastes. En effet, un grand nombre d'hormones, de cytokines, de facteurs de croissance modulent la prolifération et la différenciation des ostéoclastes et des cellules progénitrices d'ostéoblastes.

Lorsque que la résorption osseuse est inhibée, il va en résulter un dépôt osseux excessif observé dans les lésions ostéoblastiques, qui apparaissent plus denses que la normale. Les

mécanismes de métastases ostéocondensantes et les facteurs impliqués dans la formation de ces métastases sont encore peu connus. Ce type de lésions est plus fréquemment associé au cancer de la prostate (fig.16).

L'activité des ostéoclastes et l'inhibition des ostéoblastes conduit à une destruction osseuse observée dans les métastases ostéolytiques, avec des os qui apparaissent comme moins denses que la normale lors d'analyse par rayons X. Des métastases mixtes peuvent exister, mais celles-ci sont dues au fait que la destruction osseuse dans les lésions ostéolytiques induit une nouvelle formation osseuse secondaire (fig.16). On constate que 95% des métastases de cancer du sein sont ostéolytiques, nous nous focaliserons principalement sur celles-ci pour les descriptions qui suivent.

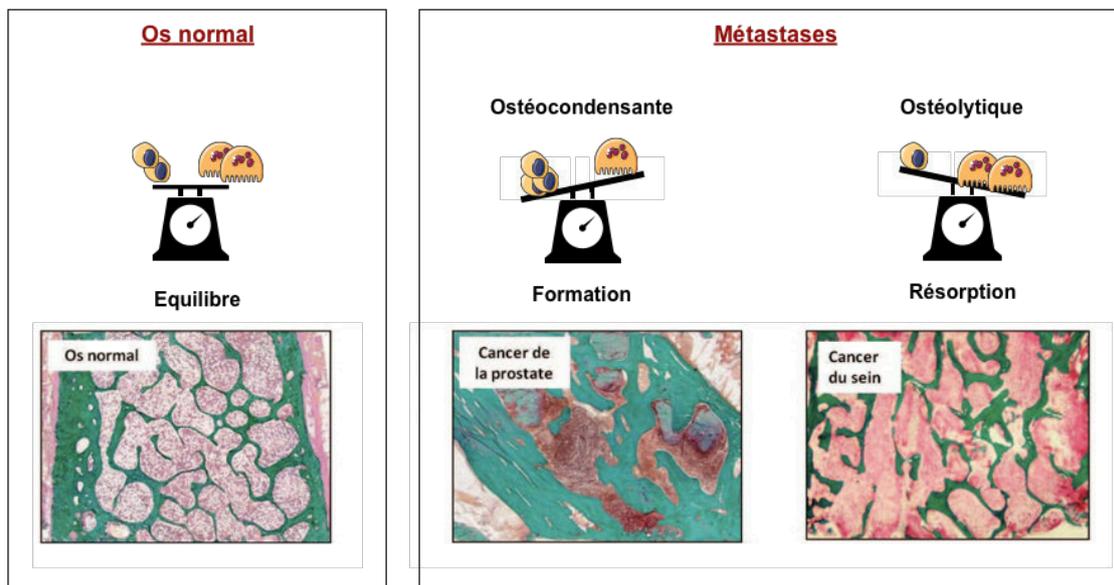


Figure 16 : Homéostasie osseuse et effet des déséquilibres dans la formation des métastases

Marquage de Goldner qui permet de visualiser l'os minéralisé en vert et les composants cellulaires de la moelle osseuse en rose. Lors de la formation de métastases ostéocondensantes, le déséquilibre du remodelage osseux est en faveur de la formation osseuse. Il y a alors un épaississement des travées osseuses. Dans le cas d'une métastase ostéolytique, le déséquilibre du remodelage osseux est en faveur de la résorption osseuse. L'os présente une destruction importante des travées osseuses.

4. Le cercle vicieux des métastases osseuses

Le développement des lésions métastatiques dans l'os est un processus complexe qui implique diverses protéines et cytokines produites par les cellules cancéreuses du sein. Elles vont stimuler les ostéoblastes et initier un cercle vicieux, conduisant à l'apparition de lésions osseuses et à la progression tumorale (Fig.9). En effet, les cellules tumorales mammaires

produisent plusieurs facteurs qui favorisent la différenciation des ostéoblastes, comme la PtHrP, les interleukine IL-1, -6 et -11, PGE2, TNF et M-CSF. Elles produisent également RANK et régulent positivement l'expression de RANKL par les ostéoblastes. RANKL se lie ensuite à RANK à la surface des monocytes, et sous stimulation du M-CSF l'ostéoclastogénèse débute. RANKL améliore également l'activité des ostéoclastes préexistants en se liant à RANK à leur surface (Tahara et al. 2019).

Une fois activé, l'ostéoclaste réabsorbe l'os en éliminant la matrice minéralisée et en cassant jusqu'à l'os organique. La matrice osseuse stocke plusieurs facteurs de croissance importants, notamment IGF-1, TGF- β , FGF, et le facteur de croissance dérivé des plaquettes, PDGF, ainsi que la protéine BMP1 (Bone Morphogénique Protéin 1). Ces facteurs sont libérés lors de la résorption osseuse. L'IGF-1 stimule la croissance des cellules cancéreuses du sein via des voies de signalisation, telles que celles impliquant Pi3K/Akt ou NF-KB. A ce stade, les cellules cancéreuses continuent de sécréter des facteurs qui stimulent l'ostéoclastogénèse tel que l'IL-6, IL-1, des prostaglandines. La résorption osseuse libère également le calcium contenu dans l'os, l'affaiblissant un peu plus, et augmentant encore la prolifération des cellules tumorales ainsi que la sécrétion de PtHrP, qui favorise l'activité des ostéoclastes.

En parallèle, les cellules cancéreuses sécrètent DKK-1 qui bloque la signalisation Wnt, l'activine A et noggin, qui sont des antagonistes de la protéine morphogénétique osseuse BMP et inhibent par conséquent la différenciation des ostéoblastes. Ceci limite la formation osseuse et favorise d'autant plus l'ostéolyse (Tian et al. 2003; Clézardin 2011) (Fig.17).

Quatre grandes étapes de la progression des lésions osseuses lytiques dans le cancer du sein
Étape 1: Les cellules cancéreuses du sein sécrètent l'hormone PTHrP et d'autres facteurs stimulant la production de RANKL par les ostéoblastes
Étape 2: RANKL stimule les ostéoclastes provoquant une résorption osseuse
Étape 3: La résorption osseuse stimule la production de facteurs de croissance dans le microenvironnement, tels que le TGF- β
Étape 4: Les facteurs de croissance libérés favorisent la prolifération des cellules cancéreuses, qui vont continuer à stimuler l'activité des ostéoclastes tout en inhibant les ostéoblastes

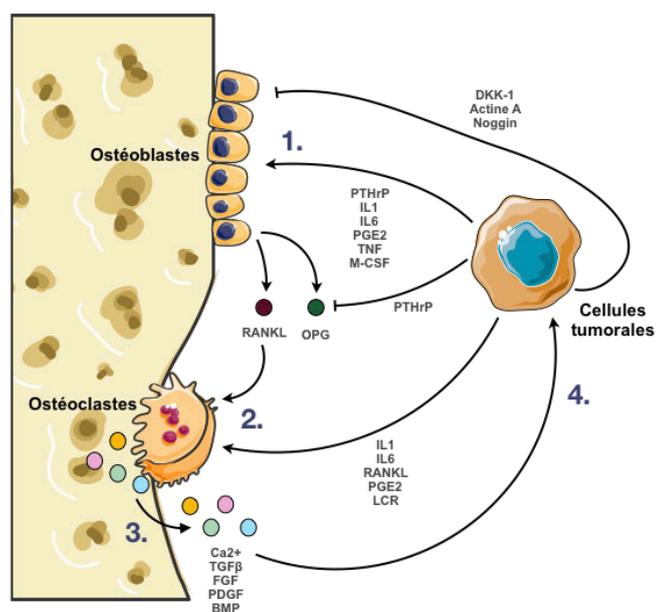


Figure 17: Le cercle vicieux des métastases osseuses

Description et schéma illustrant les différentes étapes du cercle vicieux des métastases osseuses ostéolytiques. Les cellules tumorales vont influencer le microenvironnement osseux dans le but d'induire une lyse importante en augmentant l'activité des ostéoclastes tout en inhibant la reconstruction osseuse en agissant sur les ostéoblastes. La lyse de la matrice osseuse libère des composants qui favorisent la prolifération des cellules tumorales et la mise en place d'un cercle vicieux (inspiré de (Tahara et al. 2019).

5. Le traitement des métastases osseuses

Actuellement, le traitement de base pour les métastases osseuses comprend la radiothérapie externe, les inhibiteurs d'ostéoclastes, la chimiothérapie et l'hormonothérapie, les radioisotopes, les interventions de soutien et les analgésiques. La chirurgie peut être utilisée chez les patients présentant une ou quelques lésions métastatiques détectables. Dans la plupart des cas, l'objectif thérapeutique n'est pas curatif, mais palliatif car un faible pourcentage des patients atteints de métastases osseuses est curable (1 à 10%). La chirurgie, la radiothérapie et l'ablation par radiofréquence sont efficaces dans le contrôle de la douleur et la prévention des fractures pathologiques. Les métastases osseuses étant plus courantes chez les patients dont les cellules tumorales expriment des récepteurs hormonaux, l'hormonothérapie est donc un traitement clé important pour eux. Cependant, les modalités ou la combinaison de traitements ne sont pas optimales pour prolonger la survie des patients atteints de métastases osseuses. Parmi plusieurs agents moléculaires utilisés, les inhibiteurs d'ostéoclastes, tels que les bisphosphonates et le dénosumab, ciblent l'ostéolyse associée aux lésions osseuses. Les bisphosphonates réduisent la douleur et l'incidence de fractures pathologiques (Sousa et Clézardin 2018). Le mécanisme d'action de cette classe de médicaments est l'inhibition de la résorption osseuse par la suppression de l'activité des ostéoclastes. Les bisphosphonates de

première génération (clodronate et étidronate) sont absorbés et métabolisés par les ostéoclastes et induisent l'apoptose par leurs métabolites, les analogues cytotoxiques de l'ATP. Les bisphosphonates de dernière génération (pamidronate, ibandronate et zolédronate) sont intériorisés mais non métabolisés par les ostéoclastes. Ils inhibent la fonction de farnésyl diphosphonate synthase, nécessaire à la prénylation de GTPases telle que Ras, Rho et Rac... Sans la fonction GTPase appropriée, les ostéoclastes ne parviennent pas à former les bordures en brosse, qui sont nécessaires pour leur adhésions à la surface osseuse (Rose et Siegel 2010). Bien qu'ils soient la norme en matière de traitement, les bisphosphonates possèdent de nombreux effets secondaires, ce qui peut limiter leur utilisation. Les plus fréquents sont la fatigue, la fièvre, les nausées / vomissements, l'anémie, des douleurs osseuses / articulaires, l'ostéonécrose de la mâchoire et les fractures atypiques du fémur. L'ostéonécrose de la mâchoire et les fractures atypiques du fémur sont des effets secondaires rares, mais préoccupants associés à l'utilisation à long terme des bisphosphonates (Sousa et Clézardin 2018).

Le DénoSUMab est un autre inhibiteur efficace des ostéoclastes. C'est un anticorps monoclonal ciblant RANKL, qui comme on l'a défini précédemment stimule les ostéoclastes pour résorber l'os. Le DénoSUMab inhibe la fonction de RANKL, limitant ainsi destruction osseuse (Peters et al. 2019). Lors d'essais cliniques, les patients traités avec le DénoSUMab présentaient une meilleure qualité de vie que les patients recevant des bisphosphonates. Cette molécule a permis de réduire l'incidence des effets indésirables tels que les douleurs osseuses et l'insuffisance rénale, mais les patients présentent une hypocalcémie plus importante et des maux de dents, non associés à une ostéonécrose de la mâchoire. De plus, le DénoSUMab induit moins de toxicité rénale, et donc il peut être bénéfique pour les patients traités avec des composés néphrotoxiques. Cependant, comme les bisphosphonates, le DénoSUMab ne conduit pas à une augmentation significative de la survie globale des patients (X. Wang et al. 2014; O'Carrigan et al. 2017).

Une autre modalité de traitement qui cible plus spécifiquement les os, est l'administration de radio-isotopes ayant une affinité pour l'os. Des isotopes tels que le strontium-89 et le samarium-153 sont administrés par voie systémique avec des radiations localisées dans les sites de métastases osseuses. Ces isotopes libèrent des particules bêta (électrons), qui sont

cytotoxiques pour les cellules cancéreuses dans les lésions osseuses métastatiques, résultant en un soulagement efficace de la douleur(Guerra Liberal, Tavares, et Tavares 2016).

Bien que la gestion clinique des métastases osseuses soit difficile, de nombreuses modalités de traitement sont actuellement disponibles pour soulager la douleur et minimiser le risque de fractures pathologiques pour les patientes atteintes de cancer du sein et présentant des métastases osseuses. Mais les traitements palliatifs ne sont pas suffisants pour améliorer la survie. Des thérapies spécifiques et qui vont cibler les tumeurs présentes dans l'os doivent donc être développées.

III. Les lysyl oxydases

A. La famille des lysyl oxydases

1. Généralités

La famille des lysyl oxydases (LOXs) est une famille de protéines dépendantes du cuivre dont une des fonctions majeures est de catalyser la déamination oxydative des résidus lysines et hydroxylysines. Ceci va, entre autres générer la formation de ponts covalents intra et intermoléculaires dans les chaînes de collagène et d'élastine, essentiels à la biogenèse du tissu conjonctif (Vallet et Ricard-Blum 2019).

Cette famille est constituée de cinq membres : Lysyl oxydase (LOX) et quatre protéines analogues à la lysyl oxydase, les lysyl oxydase-like (LOXL1, LOXL2, LOXL3 et LOXL4). Tous les membres de la famille LOX possèdent un peptide signal en N-terminal, ce qui indique que les protéines peuvent être secrétées (Finney et al. 2014).

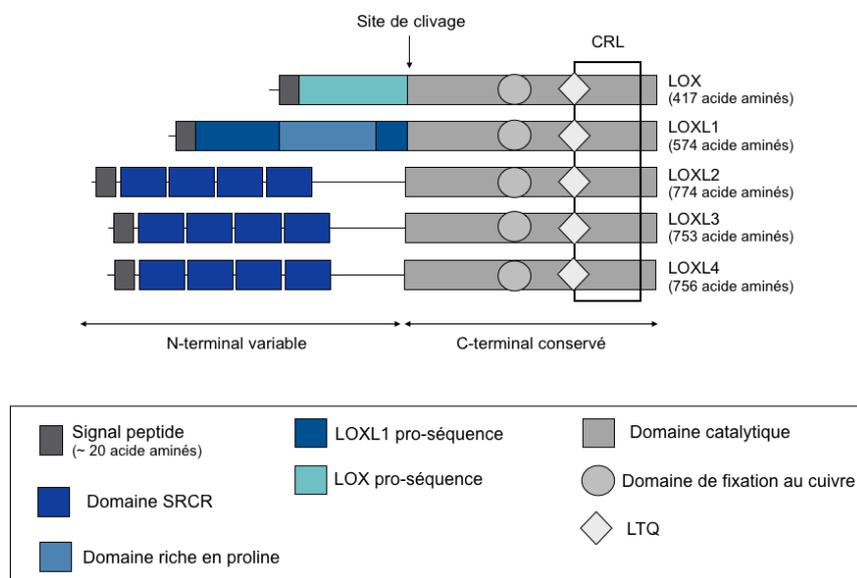


Figure 18: Structure des membres de la famille des lysyl oxydases

LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3 et LOXL4. Tous les membres possèdent un domaine C-terminal hautement conservé comprenant un cofacteur de la tyrosylquinone (LTQ) et un domaine de type récepteur de la cytokine (CRL), leurs pro-peptides N-terminaux sont variables et peuvent jouer un rôle dans la spécificité et la fonction du substrat. LOX et LOXL1 contiennent des pro-séquences. LOXL2-4 contiennent quatre domaines scavenger riches en cystéine récepteur (SRCR) qui seraient impliqués dans les interactions protéine-protéine (Adapté de (Barker, Cox, et Eler 2012)).

Si les LOXs se ressemblent beaucoup, elles diffèrent par leurs domaines N-terminaux, qui vont les classer en 2 sous-familles : celles des protéines qui contiennent un pro-peptide non

structuré, LOX et LOXL1, et celles qui contiennent quatre domaines riches en cystéine (Scavenger receptor cysteine-rich ou SRCR), LOXL2, LOXL3 et LOXL4 (Csiszar 2001);(Molnar et al. 2003).

Toutes les LOXs sont par contre constituées d'un domaine catalytique conservé en C-terminal. Ce domaine contient un site de fixation au cuivre, des résidus conservés de lysyl et de tyrosyl contribuant à la formation de cofacteur Lysyl Tyrosylquinone (LTQ) et une région analogue à un récepteur de cytokine (Cytokine Receptor Like, CRL) (fig.18).

La lysyl oxydase (LOX), est la première isoforme de la famille des LOXs à avoir été identifiée en 1968 par Pinnel et Martin. Ils ont mis en évidence l'activité catalytique de conversion des résidus lysines présents dans l'élastine en allysine (Pinnell et Martin 1968). Des études ont ensuite montré que la forme entière pro-LOX est latente sur le plan catalytique. Pour être activée, celle-ci doit être sécrétée par les cellules. Une fois sécrétée, le pro-peptide est clivé de manière protéolytique par la métalloprotéase matricielle BMP-1 libérant ainsi de la LOX mature (Uzel et al. 2001) et un propeptide. Il a également été mis en évidence que d'autres protéases clivent la pro-LOX aux mêmes sites mais avec une efficacité plus faible, la -mammalian Tolloid (mTLD) et les mammalian Tolloid like-1 et 2 (mTLL 1 et 2) ((Uzel et al. 2001).

Pendant près de 30 ans, LOX a été considérée comme la seule enzyme responsable de la conversion des résidus lysines et hydroxylysines des collagènes et de l'élastine. Ce dogme a été remis en question à partir de 1995 par l'isolation de LOXL1 (Y. Kim, Boyd, et Csiszar 1995). LOXL1 est très similaire à LOX : elle contient un peptide signal de sécrétion, un propeptide et un domaine catalytique hautement conservé par rapport à LOX (identité de 77% et homologie de 88%). Comme LOX, LOXL1 est sécrétée sous forme immature et activée catalytiquement lors du clivage du pro-peptide par BMP-1 extracellulaire (Cronshaw, Fothergill-Gilmore, et Hulmes 1995; Panchenko et al. 1996; Uzel et al. 2001; Borel et al. 2001)

Ont ensuite été découverts LOXL2, 3 et 4. Elles sont constituées d'un peptide signal, de quatre domaines SRCR et d'un domaine catalytique LOX en C-terminal. Ces 3 protéines sont très similaires et partagent respectivement 51% et 54% d'identité. Parmi les quatre domaines SRCR, le second SRCR est le plus divergent avec une identité de 35% d'acides aminés entre LOXL4 et LOXL2 et une identité de 43% avec LOXL3. Il semblerait également que ces protéines

n'aient pas besoin d'être clivées pour être activées (Asuncion et al. 2001; Mäki, Tikkanen, et Kivirikko 2001; M. S. Kim et al. 2003).

2. Activité enzymatique des lysyl oxydases

Les lysyl oxydases, amines oxydases dépendantes du cuivre (Copper Amine Oxidase, CAO) font partie de la famille des quinoprotéines caractérisées par la présence d'un cofacteur de type Lysine Tyrosylquinone (LTQ). Le LTQ va être formé entre les résidus Lysine et Tyrosine (fig.19).

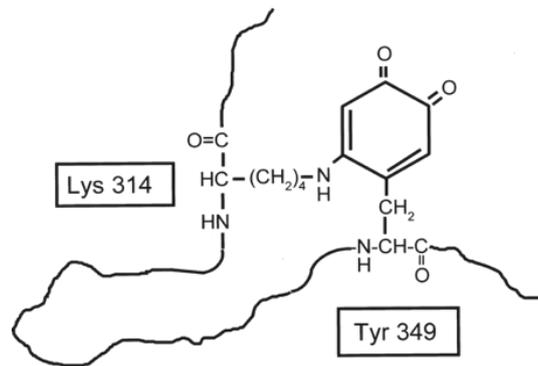


Figure 19: Structure du cofacteur de la Lysyl Tyrosylquinone

L'atome de cuivre lié à l'enzyme catalyse l'oxydation du résidu tyrosine (Tyr345 dans l'enzyme de rat) suivie par une addition covalente à la quinone du groupe-amino du résidu de lysine (Lys314 dans l'enzyme de rat). L'oxydation du peptidyl-lysine et du glycosylquinol résulte en la formation du cofacteur LTQ (tiré de (Lucero et Kagan 2006)).

Le cuivre et le cofacteur LTQ sont nécessaires à l'activité enzymatique des lysyl oxydases. Le LTQ est crucial dans le mécanisme enzymatique en tant qu'accepteur d'électron (C. Tang et Klinman 2001). En ce qui concerne le cuivre, il a été démontré qu'une absence de celui-ci entraîne une diminution de capacité des LOXs à oxyder leurs substrats. De plus, le cofacteur Cu^{2+} joue un rôle essentiel dans la formation du LTQ ainsi que dans la structure de la protéine. En effet, il est requis pour le maintien de la conformation de la protéine et est nécessaire à la modification post-traductionnelle, en permettant la formation d'un pontage intra-chaîne de l'enzyme induisant ainsi une contrainte sur la chaîne peptidique (S. X. Wang et al. 1996; Bollinger, Brown, et Dooley 2005).

L'activité enzymatique de ces protéines a été principalement décrite sur les molécules matricielles, les fibres de collagène ou d'élastine. Les collagènes et l'élastine ont des

conformités différentes, mais les fibres sont formées par des pontages covalents entre les résidus lysine et hydroxylysines.

Les LOXs catalysent la déamination oxydative dans le groupe ε-amine de lysines et d'hydroxylysines dans les collagènes et exclusivement de lysine pour l'élastine, afin de former des aldéhydes, α-aminoadipic-δ-semialdéhydes (AAS) également appelés allysines ou hydroxyallysines. Cela va initier la formation de pontages covalents (fig.20)(Eyre, Paz, et Gallop 1984; Rucker et al. 1998; Lucero et Kagan 2006).

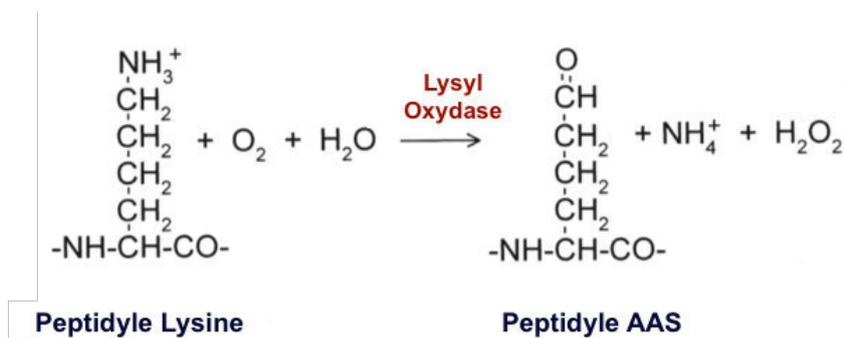


Figure 20: Stœchiométrie de la réaction catalysée par les lysyl oxydases

Les lysyl oxydases déaminent les résidus lysines (et hydroxylysines) pour former des aldéhydes (AAS) capables de se condenser avec d'autres AAS ou à des résidus lysines (et hydroxylysines), pour former des pontages covalents non réductibles. (tiré de(Lucero et Kagan 2006).)

La LOX suit un mécanisme enzymatique de type ping-pong autour du cofacteur LTQ. Elle va catalyser la réaction en deux temps. Dans un premier temps, elle va faire intervenir le cofacteur LTQ sous forme oxydée. Les groupements carbonyles du cofacteur LTQ réagissent avec le groupement ε-NH₂ d'un résidu lysine ou hydroxylysines (1), ce qui va entraîner la formation d'une base de Schiff (2). Le résidu histidine H303 de l'enzyme attaque la base de Schiff et induit la formation d'un intermédiaire (3) qui, sous l'action d'une molécule d'eau, conduit à la libération du résidu oxydé (4), puis la quinone est réoxydée par le dioxygène en présence de l'ion cuivrique en entraînant la libération de peroxyde d'hydrogène (5). Enfin, en présence d'eau, une molécule d'ammoniac est libérée et l'enzyme se retrouve à nouveau sous forme active (Lucero et Kagan 2006; Oldfield et al. 2018).

Les résidus formés se condensent avec d'autres groupements aldéhydes ou amines situés à proximité afin de borner des liaisons intra- et intermoléculaire stables non réductibles (Eyre, Paz, et Gallop 1984; Lucero et Kagan 2006) (Voir fig.21).

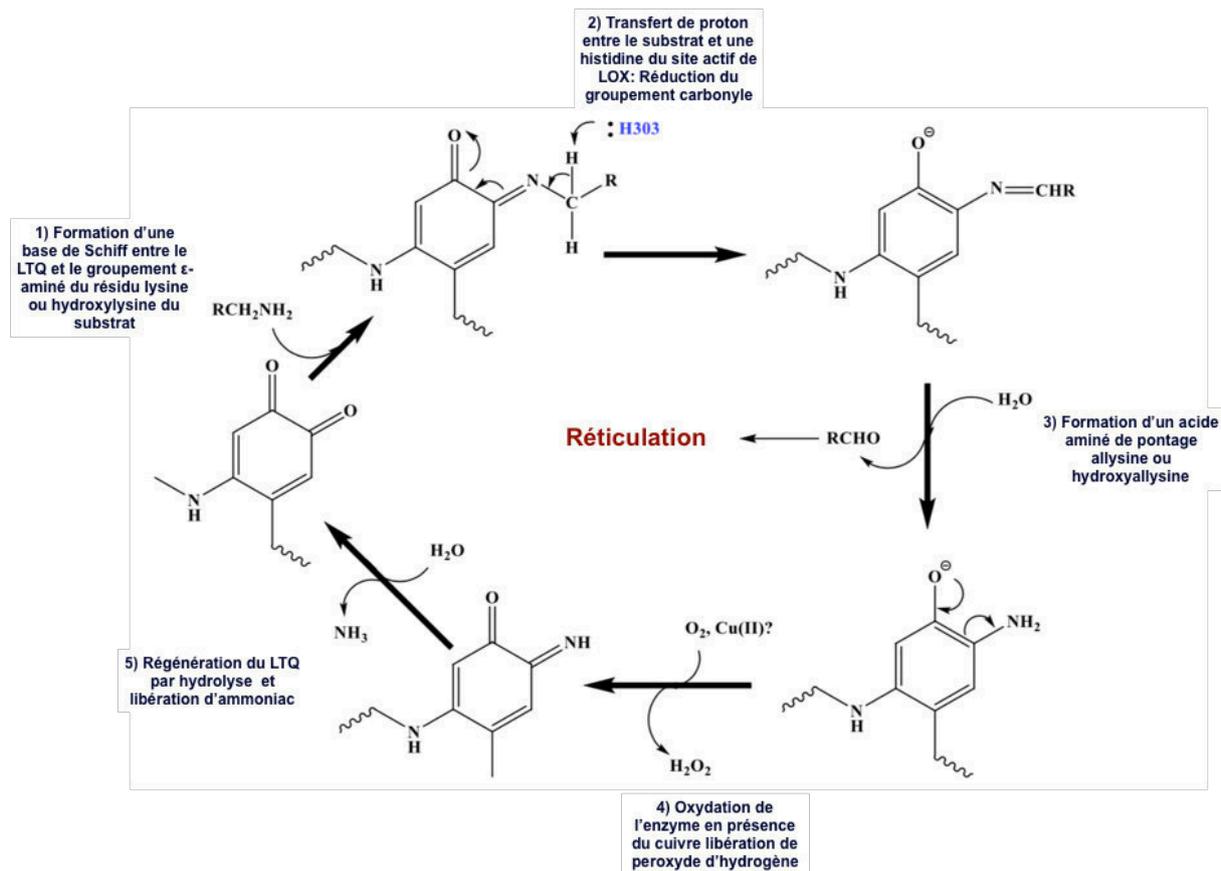


Figure 21: Les différentes étapes de déamination oxydative catalysée par les lysyl oxydases

Mécanisme de type « ping-pong » autour du cofacteur LTQ permettant la formation de pontage au niveau des résidus allysine ou hydroxyallysine, libérant du peroxyde d'hydrogène et de l'ammoniac (Adapté de (Oldfield et al. 2018)).

3. Les différentes isoformes de la famille des lysyl oxydases

Les différents membres de la famille des lysyl oxydases vont avoir des profils d'expression et d'activités enzymatiques différents. Ils vont aussi varier dans leurs implications biologiques. De plus, les knock-down chez la souris n'ont pas le même impact pour chacun des membres. Tout cela nous permet de dire que chaque membre de la famille des lysyl oxydases à son propre rôle, indépendamment des autres.

a) Profil d'expression des membres de la famille des lysyl oxydases

(1) LOX

L'ARNm de LOX est exprimée dans la plupart des tissus et en particulier dans les tissus conjonctifs. On la trouve en abondance dans le cœur, le poumon, et les reins (P. C. Trackman et al. 1992; Smith-Mungo et Kagan 1998; Molnar et al. 2003).

Au niveau protéique, la LOX sécrétée est constituée d'une forme mature de 32 kDa et d'un pro-peptide de 18 kDa après clivage par BMP-1 (Bone Morphogenic Protein 1). Bien que LOX soit considérée comme une enzyme de la matrice extracellulaire, sa forme mature a été détectée au niveau intracellulaire dans les fibroblastes, les chondrocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, dans les cellules épithéliales biliaires, rénales et du sein (Wakasaki et Ooshima 1990; Jansen et Csiszar 2007). Certains nombres d'articles ont pu mettre en évidence une localisation intranucléaire de la LOX mature dans les cellules musculaire lisses d'aorte de rat et dans les fibroblastes murins. Il a été démontré que la LOX nucléaire provenait de la LOX extracellulaire qui pénètre dans le cytosol et se concentre dans le noyau de la cellule (Wande Li et al. 1997; Nellaiappan et al. 2000). D'autres études plus récentes définissent la présence nucléaire de la LOX mature comme un marqueur de mauvais pronostic et de développement métastatique dans certains cas pathologiques tel que les cancers colorectaux et ovariens (N. Liu et al. 2016; De Donato et al. 2017). En ce qui concerne le pro-peptide, il a également été observé dans une lignée d'ostéoblastes au niveau cytoplasmique et nucléaire (Guo et al. 2007).

L'internalisation de LOX (mature et propeptide) dans la cellule, mais aussi ses mouvements entre les compartiments subcellulaires, sont encore inexplicés et peu explorés. Ils suggèrent toute fois un rôle intracellulaire de LOX mature et de son pro-peptide. Les rôles seront décrits plus en détail dans la suite de ce manuscrit.

(2) LOXL1

LOXL1 est l'isoforme la plus similaire à LOX. L'ARNm de LOXL1 est le plus abondamment exprimé dans le cœur, le placenta, le pancréas et les muscles squelettique (Molnar et al. 2003). Elle est synthétisée sous forme de pro-enzyme de 56 kDa, son clivage *in vitro* par BMP-1 produit des fragments de 52, 42 et 37 kDa, enzymatiquement actifs. *In vivo*, LOXL1 est retrouvée presque exclusivement sous sa forme entière de 56 kDa (Borel et al. 2001).

(3) LOXL2

LOXL2 est un des membres de la famille des LOXs le plus étudié. L'ARNm de LOXL2 a été détecté dans tous les tissus, mais est plus fortement au niveau du placenta, de l'utérus, de la prostate et du pancréas (Saux et al. 1999).

Au niveau protéique, LOXL2 est fortement exprimée dans le cœur fœtal. Elle est détectée au niveau de l'oreillette gauche et droite, les ventricules et l'apex du cœur ainsi que dans l'aorte (Pires Martins, Leach, et Krawetz 2001). Au niveau cellulaire, il a été démontré que LOXL2 était exprimée dans les fibroblastes, les kératinocytes, les chondrocytes, les cellules endothéliales, les cellules stromales de la moelle osseuses, et dans les cellules épithéliales mammaires (Saito et al. 1997; Wiel et al. 2013; Fujimoto et Tajima 2009; Hollosi et al. 2009; Iftikhar et al. 2011).

Le transcrite de LOXL2 code pour une protéine de 774 acides aminés contenant un peptide signal prédit de 22 acides aminés, donnant une protéine de 87 kDa basée sur une analyse de séquence et produite par traduction in vitro. (Saito et al. 1997; Hollosi et al. 2009). Il a été décrit que LOXL2 peut être clivée par la protéase PACE4 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6) entre ses domaines SRCR 2 et 3. La coupure protéolytique ne semble pas être essentielle pour l'activité de LOXL2, mais semble doubler son activité oxydative (Okada et al. 2017).

(4) LOXL3

LOXL3 est le membre le moins étudié de la famille des LOXs. L'ARNm de LOXL3 est exprimé dans les leucocytes, dans l'aorte, les neurones, la colonne vertébrale, le cerveau, le cœur, l'utérus, les ovaires, les testicules, la prostate, le petit intestin et la rate. Une plus faible expression d'ARNm a été retrouvée dans les reins, le muscle squelettique et le placenta. L'ARNm d'un variant d'épissage de LOXL3 a été détecté dans le pancréas, la rate et le thymus, ce qui indique une spécificité tissulaire distincte (J.-E. Lee et Kim 2006). La forme sécrétée de la protéine LOXL3 est détectée sous forme d'une bande de 97 kDa en western-blot, légèrement supérieure à la masse globale prédite de 83,6 kDa pour LOXL3 recombinant. La protéine LOXL3 a été détectée dans les testicules et les poumons sous une forme de 44kDa, ce qui correspond à un variant d'épissage court. Des produits d'épissage de 44 kDa et 67 kDa ont été retrouvés dans le placenta et le poumon. Au niveau cellulaire, elle a été détectée dans les hépatocytes, les leucocytes et les chondrocytes (Jourdan-Le Saux et al. 2001; Molnar et al. 2003). LOXL3 peut être sécrétée et clivée dans l'espace extracellulaire par BMP-1 au niveau d'un site de clivage GDD (entre les résidus 446 à 448), selon un processus similaire à celui de LOX et LOXL1 (Laurentino et al. 2019).

(5) LOXL4

L'ARNm de LOXL4 a été détecté dans de nombreux tissus humains. Les niveaux d'expression les plus élevés ont été observés dans le muscle squelettique, les testicules, et le pancréas. La protéine LOXL4 a aussi été retrouvée dans le placenta, les poumons, le foie, la rate, la prostate, les ovaires, et l'intestin grêle, avec une expression relativement plus faible dans le cœur, le cerveau, le thymus et le colon. Au niveau cellulaire, une expression abondante de LOXL4 a été détectée dans les fibroblastes et une expression plus faible dans les cellules musculaires lisses. Le profil d'expression diffère complètement de son homologue murin LOXC, dont l'expression est restreinte au cartilage avec LOXC seulement exprimée par les chondrocytes différenciés (Asuncion et al. 2001; Mäki, Tikkanen, et Kivirikko 2001). LOXL4 est synthétisée et sécrétée sous forme de protéine de masse moléculaire d'environ 84,5 kDa. En ce qui concerne le clivage de LOXL4, actuellement aucune information ne semble être disponible dans la littérature.

b) L'invalidation des lysyl oxydases chez la souris

(1) LOX

Les souris invalidées pour *lox* ne sont pas viables et les souriceaux meurent à la naissance. On observe chez ces animaux des fibres de collagène et d'élastine fragmentées, ce qui impacte la structure des tissus. Les souris invalidées vont présenter des anomalies au niveau du diaphragme, des voies aériennes, un anévrisme aortique, un défaut de structure des lames plastiques, une discontinuité au niveau des couches de cellules musculaire lisses, une diminution de la lumière des vaisseaux et une altération de la morphologie des cellules endothéliales (Hornstra et al. 2003; Mäki et al. 2005).

L'inhibition de la LOX chez les souris perturbe l'intégrité structurelle, mais aussi la fonction des tissus osseux. Une étude a pu révéler que les souris *lox*^{-/-} présentaient une diminution de la formation de nodules minéraux et une diminution de la différenciation ostéoblastique (Pischon et al. 2009).

Il n'existe pas de compensation lors de l'inhibition de *lox* chez la souris par les autres membres de la famille.

(2) LOXL1

Les souris invalidées pour *lox1* sont viables mais les KO ont montré que cette enzyme est essentielle pour le remodelage élastique à l'âge adulte, pour la mise bas et pendant les processus de cicatrisation. Les souris *lox1*^{-/-} présentent une désorganisation des fibres élastiques, qui va se traduire par une accumulation du précurseur tropoélastine, une hyperlaxité de la peau, des anomalies au niveau des parois du pelvis, des voies utérines, un défaut des voies aériennes dû à une augmentation des diamètres. Les souris ne présentent pas de défaut de collagène et il n'y a pas de compensation par les autres membres de la famille des LOXs (X. Liu et al. 2004; Hornstra et al. 2003; Pischon et al. 2009).

(3) LOXL2

Les souris invalidées pour *lox2* sont viables et fertiles dans 60% des cas, 40% des cas sont létaux en périnatale. Ces souris présentent des malformations cardiaques (communication ventriculaire aberrante) et/ ou du tissu hépatique (distension des capillaires), qui sont probablement responsables de leurs décès. Aucune différence majeure dans l'expression d'autres membres de la famille des LOXs n'a été détectée dans différents tissus entre les souris invalidées pour *lox2* et les souris sauvages, à l'exception d'une diminution de LOXL3 au niveau cardiaque, ce qui élimine l'idée de l'existence de mécanismes compensatoires. La surexpression de LOXL2 quant à elle, provoque une malformation des testicules et un dysfonctionnement de l'épididyme associé à une fibrose accrue et à une inflammation aiguë, ce qui rend les mâles stériles (Martin et al. 2015).

(4) LOXL3

L'invalidation de LOXL3 conduit également à une létalité périnatale, à un développement retardé du palais secondaire, et à des anomalies du cartilage dans les vertèbres thoraciques. Ceci est dû à une diminution de la réticulation du collagène, ce qui entraîne des fentes palatines et des déformations de la colonne vertébrale (Jian Zhang et al. 2015). Ces souris ont aussi des poumons de poids et de volumes réduits, avec des espaces sacculaires déformés et diminués, et une plus petite cavité thoracique. Ces poumons possèdent des fibres élastiques en excès. Les auteurs ont montré que ceci pouvait être lié à une augmentation de l'expression de LOXL4, seul membre la famille LOXs à être surexprimé dans les souris *lox3*^{-/-}. Cette surexpression de LOXL4 pourrait être due à l'expression accrue du facteur TGFβ1, mais les mécanismes sous-jacents restent encore inconnus (X. Liu et al. 2004; Jian Zhang et al. 2015).

(5) LOXL4

Les souris invalidées par *lox14* n'ont à ce jour, pas été décrites dans la littérature.

Les LOXs ne semblent donc pas être nécessaires au développement embryonnaire mais seraient essentielles à la survie des souriceaux post-partum, par leurs rôles sur les différents organes du système cardio-vasculaire et pulmonaire. Les invalidations des différents membres de la famille chez la souris indiquent qu'il n'existe pas de phénomène de compensation entre les différentes protéines, suggérant des distributions spatio-temporelles et des rôles différents pour chacune des enzymes.

4. Pathologie associées aux lysyl oxydases

Une diminution ou une augmentation de l'activité ou de l'expression des LOXs sont observées dans les conditions suivantes, pathologiques ou non :

Le vieillissement : LOX, LOXL1 et LOXL2 seraient impliquées dans le vieillissement, de par leurs rôles dans l'élastogénèse. De plus, les étapes de vieillissement sont accompagnées par une diminution de l'activité LOX et de LOXL1. (Szauter et al. 2005; Cenizo et al. 2006; Behmoaras et al. 2008).

Les mutations de LOX ou de LOXL2 : une mutation de LOX induit des pathologies vasculaires de type anévrisme et dissection aortique. Plusieurs données suggèrent qu'une mutation (Expression des variants de LOX : p. Ser280Arg et p. Ser348Arg ou une mutation faux-sens c.893T> G codant pour p. Met298Arg) est associée à une maladie aortique par suite d'une réticulation insuffisante de l'élastine et du collagène dans la paroi aortique. Les porteurs de mutations peuvent être prédisposés aux maladies vasculaires en raison de l'affaiblissement de la paroi des vaisseaux dans des conditions de stress (Guo et al. 2007; V. S. Lee et al. 2016).

Il a été récemment démontré qu'une mutation de LOXL2 serait susceptible d'être impliquée dans l'induction d'anévrisme intra-crânial. Une étude a mis en évidence au sein d'une famille de cinq membres qu'une ségrégation au niveau du c.C133T / p.H45Y de l'exon 2 favorise les

phénotypes d'anévrisme intra crânial (Y. Wu et al. 2018). Cette implication a encore besoin d'être approfondie.

Les mutations de LOXL1 : il a été mis en évidence qu'une mutation de LOXL1 entraînait une pathologie appelée glaucome exfoliatif. Elle se caractérise par le dépôt de flocons microscopiques de matériaux riches en protéines dans les tissus oculaires et non oculaires. Il a été mis en évidence que trois types de mutation de LOXL1 pouvaient être impliqués dans cette pathologie : un polymorphisme d'un seul nucléotide, au niveau rs2165241 situé dans l'intron 1 ; et deux autres induisant des faux-sens au niveau de rs1048661 et rs3825942 situés dans l'exon 1 (Whigham et Allingham 2011).

Le Lathyrisme : c'est une intoxication provoquée par l'ingestion de plante du genre lathyrus qui contient du β -aminopropionitrile, un inhibiteur des LOXs couramment utilisé en laboratoire. La sévérité de l'intoxication est due à la dose et à la durée d'ingestion. Cela peut entraîner un affaiblissement des tendons, des ligaments, de la peau, du cartilage, une déformation des os, et la formation d'anévrisme aortique (Barrow, Simpson, et Miller 1974).

Le syndrome de Menkès : maladie génétique récessive liée à l'X, elle touche le gène *atp7A* (Cu²⁺-transporting ATPase-alpha polypeptide) qui code pour une protéine du même nom impliquée dans le transport du cuivre. Cette maladie est caractérisée par une neuro-dégénérescence progressive et des anomalies marquées du tissu conjonctif avec des lames élastiques anormalement développées, des vaisseaux sanguins tortueux possédant une lumière irrégulière. Cela se traduit par un phénotype grave entraînant souvent la mort durant la petite enfance. La diminution du transport du cuivre due à cette mutation affecte les enzymes dépendantes du cuivre comme les LOXs. La déficience en cuivre induit un défaut de structure de LOX qui va conduire à sa dégradation. L'hypoactivité de LOX explique les défauts vasculaires, les anomalies du tissu conjonctif et la formation des diverticules chez les patients atteints de ce syndrome. Certains phénotypes de cette maladie sont récapitulés chez les souris

invalidées en *LOX*, et dans les morphants *LOXs* chez le Zébrafish (Menkes 1988; Reynaud et al. 2003; Zlatic et al. 2015).

La maladie d'Ehlers-Danlos de type IX : aussi appelée syndrome de la corne occipitale. C'est une forme atténuée de la maladie de Menkès qui va induire une diminution de l'ATP7A (2% à 5% comparé à la normale). Ceci entraîne un phénotype plus léger de la maladie de Menkès qui se traduit essentiellement par une fragilité des tissus conjonctifs (Dagenais et al. 2001).

La maladie de Wilson : est une maladie génétique autosomique récessive, elle se caractérise à l'inverse des deux précédentes pathologies par une accumulation de cuivre plus particulièrement dans les hépatocytes. Cette accumulation est associée à une augmentation de l'activité de *LOX* et *LOXL2* qui va conduire à une augmentation du dépôt de collagène autour des hépatocytes, et va favoriser le développement d'une fibrose hépatique (Vadasz et al. 2005).

Les pathologies fibrosantes : une augmentation de *LOX* et de *LOXL2* va induire des pathologies fibrosantes telles que les fibroses hépatiques, pulmonaires, rénales et dermiques. La fibrose se traduit par une désorganisation de la matrice extracellulaire, avec une augmentation de la réticulation des fibres de collagènes insolubles, et peut aller jusqu'à induire une altération de la fonction organique des tissus comme par exemple lors de fibrose pulmonaire idiopathique. (Philip C. Trackman 2016; Aumiller et al. 2017; Tjin et al. 2017).

La maladie d'Alzheimer et l'hémorragie cérébrale héréditaire avec amyloïdose : il a été mis en évidence une augmentation de *LOX* dans les maladies de type Alzheimer. Le peptide bêta-amyloïde ($A\beta$) est un substrat de *LOX*. Celui-ci dans les parois des vaisseaux cérébraux et le parenchyme, induit une angiopathie amyloïde cérébrale ainsi que la formation de plaques séniles qui jouent un rôle clé dans la maladie d'Alzheimer et dans l'hémorragie cérébrale

héréditaire avec amyloïdose. De par son rôle enzymatique, LOX influencerait négativement ces deux pathologies (Wilgus et al. 2011; Gilad, Kagan, et Gilad 2005).

5. Les rôles biologiques des lysyl oxydases

La famille des LOXs est principalement connue pour son rôle essentiel dans la réaction de désamination oxydative des résidus hydroxylysine et lysine dans les collagènes et des résidus lysine dans l'élastine permettant la réticulation de la matrice extracellulaire nécessaire à la structure et au fonctionnement du tissu conjonctif. En plus de ce rôle, les lysyl oxydases sont impliquées dans d'autres fonctions biologiques propres à chacune d'elles.

a) La matrice extracellulaire des tissus conjonctifs, structure, fonction et réticulation

Afin de mieux comprendre les effets des lysyl oxydases sur la matrice extracellulaire, il est nécessaire de connaître ses composants et son rôle.

(1) La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est l'un des plus importants régulateurs cellulaires et tissulaires dans le corps. Ces composants se lient ensemble pour former une structure en trois dimensions stable qui contribue aux propriétés mécaniques des tissus. La MEC est un réservoir de facteurs de croissance et de molécules bioactives. Au niveau cellulaire, elle est d'une très grande importance, elle va contrôler des mécanismes tels que la prolifération, l'adhésion, la migration, la polarité, la différenciation et l'apoptose.

(a) Les principaux composants de la matrice

Le matrisome est composé de collagènes, de protéoglycanes, d'élastine, et de glycoprotéines. Chacun de ces composants possède des propriétés physiques et biochimiques distinctes qui contrôlent les propriétés biomécaniques de la MEC.

Les principaux composants de la MEC sont les collagènes. Ils constituent un support essentiel pour l'interaction des éléments de la matrice extracellulaire et permettent l'intégrité des tissus. Les collagènes sont composés de 3 chaînes α polypeptidiques qui forment une structure en triple hélice. Chez les vertébrés, il existe 46 chaînes de collagène qui vont s'assembler pour former 28 types de collagènes. Les collagènes vont différer dans leurs voies de synthèse et d'assemblage et sont classés en différentes familles : les collagènes fibrillaires ;

les collagènes associés aux collagènes fibrillaires de type I et II ; le collagène qui constitue la membrane basale (type IV) ; le collagène dit filamenteux ; le collagène avec ancrage s'associant à la membrane basale ; les collagènes à chaîne courte ; les multiplexines, et les collagènes à domaine transmembranaire.

L'élastine est un composant de la matrice extracellulaire qui confère de l'élasticité aux tissus soumis à des étirements répétés tels que le réseau vasculaire et les poumons. Les fibres élastiques sont formées de microfibrilles constituées de l'association de molécules de tropoélastine (le précurseur de l'élastine) et de fibuline. Toutes les tropoélastines partagent un arrangement de domaine caractéristique constitué de séquences hydrophobes alternant avec des motifs de réticulation contenant de la lysine (Mecham 2011).

Les protéoglycanes sont constitués d'une protéine centrale à laquelle sont attachées des chaînes latérales de glycosaminoglycanes (GAG). Il y a quatre groupes de protéoglycanes : l'acide hyaluronique, le sulfate de kératane, le chondroïtine / sulfate de dermatane et l'héparane sulfate, y compris l'héparine. La diversité moléculaire des protéoglycanes constitue une base structurelle à de nombreuses fonctions biologiques. Ils permettent l'interaction avec des composants matriciels, cellulaires ou des médiateurs solubles. Ils confèrent à la matrice des propriétés d'hydratation, de résistance biomécanique élevée, des capacités de filtration et de transparence. Ils ont un rôle régulateur dans l'assemblage des fibrilles de collagène. Les protéoglycanes interagissent également avec les facteurs de croissance et leurs récepteurs et sont impliqués dans de nombreuses activités cellulaires telles que la prolifération, l'adhésion, la migration, la différenciation et dans les processus biologiques, y compris l'angiogenèse (Karamanos 2017).

En plus des collagènes, de l'élastine et des protéoglycanes qui assurent des fonctions de résistance et de structuration, il existe environ 200 glycoprotéines complexes dans le matrisome des mammifères. Les glycoprotéines permettent l'assemblage de la MEC. Elles possèdent des domaines et des motifs favorisant l'adhésion ainsi que la signalisation cellulaire

et des domaines qui lient les facteurs de croissance. Les glycoprotéines, les plus étudiées sont les laminines et la fibronectine (Hynes et Naba 2012). Les laminines peuvent interagir avec le collagène de type IV, elles permettent aussi une interaction avec les récepteurs présents à la surface des cellules. La fibronectine quant à elle, est essentielle à l'attachement et à la migration cellulaire, elle fonctionne comme une « colle biologique » (Durbeej 2010; Schwarzbauer et DeSimone 2011).

(b) *Les rôles de la matrice extracellulaire*

La matrice extracellulaire va agir sur les phénotypes cellulaires. Par le biais d'intégrines, de syndecans et d'autres récepteurs, elle se connecte aux cellules. Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques composés des sous-unités α et β . Les principales intégrines de liaison à la matrice sont les intégrines $\beta 1$ qui possèdent une affinité pour la fibronectine, les collagènes et les laminines. Elles fonctionnent comme des liens entre la matrice et le cytosquelette des cellules. Elles peuvent initier des événements de signalisation qui affectent la prolifération cellulaire, la différenciation, la polarité, la contractilité (Geiger et Yamada 2011; Wolfenson, Lavelin, et Geiger 2013) (Fig.22).

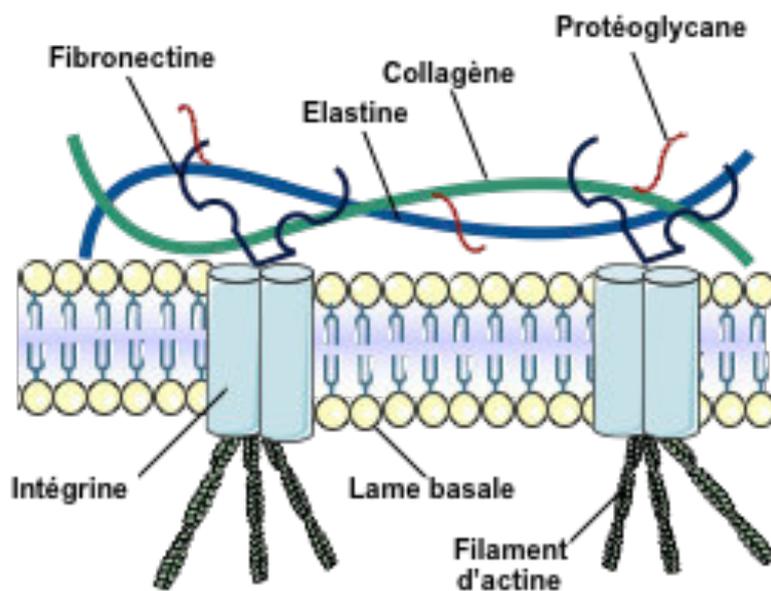


Figure 22: Les composants de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est un mélange complexe de diverses biomolécules et fibres sécrétées par les cellules dans les tissus. Cette matrice apporte par le biais d'une fixation aux intégrines, un support structurel et biochimique aux cellules qu'elles entourent et constitue un fondement pour leur croissance et leur prolifération. (Adapté de (Patil, 2017))

Les composants de la matrice interagissent directement avec les cellules, mais émettent également des signaux chimiques. En effet, la matrice subit un remodelage permanent, et ses composants sont déposés, dégradés ou modifiés. Il existe de nombreuses protéases impliquées dans la dégradation protéolytique de la MEC, et les plus importantes sont les membres de la famille des métalloprotéinases matricielles (MMP). Elles peuvent cliver des protéines précurseurs, libérer des facteurs de croissance et des fragments bioactifs de protéines matricielles, qui peuvent agir sur différentes voies de signalisation cellulaires (Stamenkovic 2003)(Wolfenson, Lavelin, et Geiger 2013).

La réticulation de la matrice est un élément clé du remodelage. Ceci permet une augmentation de la résistance à la traction du tissu et une augmentation de la rigidité matricielle qui peut directement affecter les comportements cellulaires (Stamenkovic 2003).

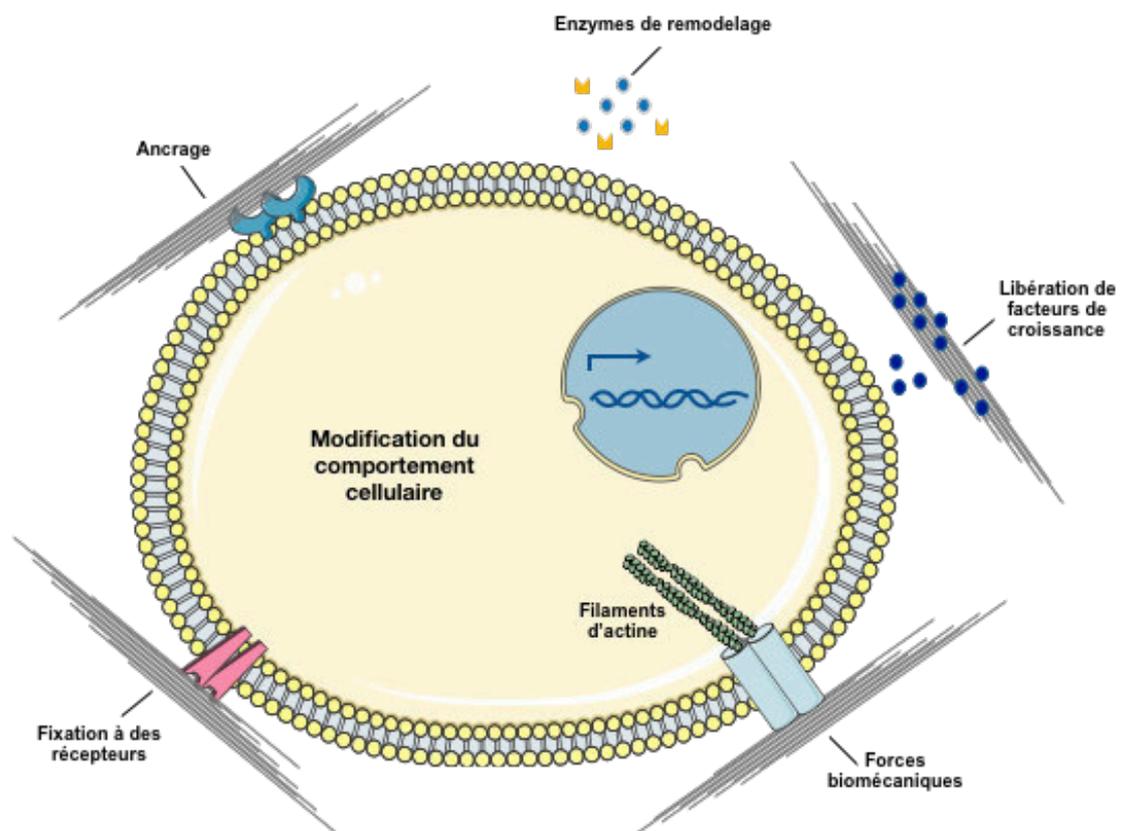


Figure 23: Régulation du comportement cellulaire par la matrice extracellulaire

Les effets exercés par la MEC sur les cellules sont de plusieurs natures. La MEC peut se lier directement à différents types de récepteurs ou corécepteurs de surface cellulaire, permettant la régulation de l'ancrage, et l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire et de mécanotransduction. Le remodelage de la MEC peut en plus libérer des facteurs de croissance qui modulent le comportement cellulaire. (Adapté de (Gattazzo, Urciuolo, et Bonaldo 2014))

En effet, la MEC fonctionne comme une barrière physique, un site d'ancrage ou une piste de mouvement pour la migration cellulaire. La rigidité, la densité, la porosité, la topographie de la matrice fournissent des repères physiques aux cellules. Les propriétés mécaniques sont essentiellement détectées par les intégrines qui relient la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine intracellulaire. Les matrices rigides induisent un regroupement d'intégrines, des adhérences focales robustes, l'activation de Rho et MAP kinases qui conduisent à la prolifération et à une contractilité accrue. Elle va également agir au niveau de la différenciation cellulaire (Lu et al. 2011) (Fig. 23)

*(c) Implication des différentes LOXs dans la
réticulation des fibres de collagène et d'élastine*

Comme dit précédemment, LOX intervient dans l'initiation de la réticulation des fibres de collagène et d'élastine principalement dans les tissus conjonctifs. Vont être réticulé par LOX, les collagènes fibrillaires de type I, II, III et IV, les collagènes non fibrillaires de type IV et VII, et l'élastine (Reiser, McCormick, et Rucker 1992; Smith-Mungo et Kagan 1998; Lucero et Kagan 2006).

LOXL1 quant à elle se localise spécifiquement aux sites d'élastogénèse. Dans ces sites LOXL1 semble interagir avec la fibuline 5, à la différence de LOX qui interagirait avec la fibuline 4 (X. Liu et al. 2004; Hirai et al. 2007). Certains papiers, ont mis en évidence que LOXL1 interviendrait aussi dans la réticulation des fibres de collagène (Behmoaras et al. 2008; Zeltz et al. 2019). Une étude publiée par Thomassin et collaborateurs en 2005, a montré que l'interaction de LOXL1 avec la tropoélastine se fait via le pro-domaine de la molécule. Ils ont montré que le domaine catalytique de LOXL1 sans la pro-région, ne s'associait pas à la matrice. Ces résultats laissent à penser que les différences de séquences dans les pro-domaines de LOX et LOXL1 peuvent leur conférer une spécificité de substrat (Thomassin et al. 2005).

Il a été démontré *in vitro* que, comme LOX, LOXL2 réticule les fibres de collagène de type I et de type IV (Vadasz et al. 2005; López-Jiménez, Basak, et Vanacore 2017). LOXL2 intervient aussi dans la régulation de la formation des fibres élastiques, elle interagirait avec la fibuline 4 (Hirai et al. 2007).

En ce qui concerne LOXL3, elle a été démontré comme intervenant *in vitro* dans la réticulation du collagène de type I, II, III, IV, VI, VIII, X et de l'élastine (J.-E. Lee et Kim 2006)

Finalement, de par son appartenance à la famille des lysyl oxydases, LOXL4 est considérée comme une enzyme intervenant dans la réticulation des fibres de collagène et d'élastine. Peu d'études sur les substrats spécifiques ont cependant été publiées à ce jour. Il a été démontré *in vitro* que LOXL4 réticulait le collagène de type I. Aucune information sur les autres types de collagène ou l'élastine n'est disponible dans la littérature (Spicer et al. 2016). L'homologue murin de LOXL4, LOXC semble quant à lui intervenir dans la réticulation des collagènes de type I et II (Ito et al. 2001).

b) Fonctions des LOXs

Les LOXs, bien que très similaire au niveau de leurs domaines catalytiques et de par leur capacité à réticuler les mêmes substrats, ont malgré tout des rôles biologiques différents et interviennent dans des processus liés directement à la MEC ou non.

(1) LOX

Il a été démontré que LOX intervenait dans la différenciation de différents types cellulaires, notamment les ostéoblastes. En effet, LOX participe à différenciation ostéoblastique. Les ostéoblastes synthétisent une matrice de collagène qui régule elle-même la différenciation des cellules précurseurs en ostéoblastes matures. Ils expriment aussi la LOX, qui de par son activité enzymatique intervient dans le processus de réticulation du collagène. L'organisation des fibres de collagène dans la matrice extracellulaire médié par LOX est donc un important régulateur de l'ostéoblastogénèse. Les fibres de collagène fonctionnent comme un échafaudage tridimensionnel permettant d'organiser les dépôts minéraux. *In vivo*, il a été mis en évidence que LOX était le seul membre de la famille des LOXs exprimé lors de la différenciation des ostéoblastes, et que son profil d'expression est corrélé avec celui du collagène de type I (collagène le plus abondant de l'os comme dit précédemment). Dans l'os, l'inhibition de l'activité LOX supprime la formation de nodules minéraux et l'expression des marqueurs ostéoblastiques lors de la différenciation des cellules primaires de calvaria (Turecek et al. 2008; Pischon et al. 2009; Sharma-Bhandari et al. 2015). LOX ne va pas agir seulement sur la matrice collagénique pour réguler la différenciation ostéoblastique. Des données indiquent qu'elle pourrait interagir directement avec le facteur de croissance TFG- β 1

mature, un facteur de croissance très présent dans l'os. Le TGF- β 1 est sécrété et stocké dans la matrice osseuse et peut être libéré lorsque que cette matrice est dégradée sous l'action des ostéoclastes par exemple. Dans la littérature, il a été montré que le TGF- β 1 stimule la production et le recrutement des progéniteurs des ostéoblastes et la production de protéines matricielles telles que les molécules de collagène, et inhibe à un stade avancé la différenciation des ostéoblastes et la minéralisation. Il est également impliqué dans la différenciation des ostéoclastes. Une interaction entre LOX et TGF- β 1 a été confirmée *in vivo* et *in vitro*. Les données indiquent que LOX se lie au TGF- β 1 mature et régule de manière enzymatique sa signalisation dans l'os et peut donc jouer un rôle important dans le maintien et le remodelage de l'os (Atsawasawan et al. 2008). Le pro-peptide de LOX, LOX-PP, semble jouer un rôle régulateur dans l'adipogenèse. Une étude *in vitro* a démontré que LOX-PP favorisait l'adipogénèse au moins partiellement en inhibant la signalisation du récepteur FGF-2 dans une lignée de cellules pré-adipocytaire, les 3T3-L1 (Griner et al. 2016). Le rôle de LOX dans la différenciation cellulaire, ne se restreint pas seulement à un effet sur la différenciation des cellules dérivées des cellules souches mésenchymateuse. En effet, il a été mis en évidence que la protéine LOX agit lors des premières étapes de la différenciation des kératinocytes et est importante pour un engagement dans la différenciation terminale (Le Provost et al. 2010).

LOX semble également jouer un rôle important dans la régulation de la chromatine et la transcription génique. Plusieurs études ont pu démontrer un effet de LOX sur la condensation de la chromatine. Par exemple, la transfection d'une construction anti-sens LOX dans des cellules NIH3T3-Ras induit une modification de l'état de compactage de la chromatine, ce qui conduit à une organisation plus condensée. D'autre part, des analyses d'images de cellules COS-7 exprimant différentes quantités de LOX montrent une corrélation entre la quantité de LOX et le degré de décondensation de la chromatine. De plus, la surexpression de LOX humaine recombinante dans les MCF-7 a permis de mettre en évidence que l'histone H1 de ces cellules contenait des modifications spécifiques de la lysine 85 dépendant de LOX ce qui suggère une réticulation intra- et intermoléculaire des histones H1 par l'enzyme. La réaction de LOX sur l'histone H1 favoriserait son détachement de l'ADN cible renforçant ainsi la transcription génique. *In vitro*, des expériences suggèrent des interactions avec l'histone H1 mais aussi avec l'histone H2 (M. L. Mello et al. 1995; M. L. S. Mello et al. 2011). LOX régule

aussi le facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF ou FGF2), polypeptide qui est responsable de la prolifération, la différenciation et la migration de divers types de cellules (Wang Li et al. 2003). Il a été mis en évidence que LOX pouvait oxyder, *in vitro* une grande variété de protéines basiques à faible point isoélectrique. Cela suggère une implication de LOX dans de nombreux rôles biologiques (Kagan et al. 1984).

Finalement, LOX a notamment été décrite comme impliquée dans les cancers ce qui sera détaillé dans la partie LOX et LOXL2 : Cancer.

(2) LOXL2

Par le biais de la réticulation du collagène de type IV, LOXL2 intervient dans l'angiogenèse en permettant l'organisation de la lame basale endothéliale (Bignon et al. 2011).

LOXL2 intervient également dans d'autres processus biologiques, comme la régulation des gènes impliqués dans la différenciation des progéniteurs neuronaux. En effet, LOXL2 induit l'oxydation de TAF10 méthylé (TATA-box binding protein associated factor 10) ce qui induit la libération de son promoteur et l'arrêt de la transcription des gènes qui sont sous la dépendance de TFIID (Transcription Factor II D). En conséquence, les cellules souches embryonnaires perdent leur pluripotence (Iturbide et al. 2015).

LOXL2 régule aussi l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'EMT. Par exemple, l'histone H3 s'avère être un substrat de LOXL2 qui désamine la lysine 4 triméthylée (H3K4me3) *in vitro* et *in vivo*. Cette oxydation de H3 est liée à la répression du promoteur CDH1 (E-Cadhérine). H3 oxydée par LOXL2 est détectée dans les domaines de l'hétérochromatine, et cela semble nécessaire à la répression de la transcription de CDH1 au cours de l'EMT (Giampuzzi, Oleggini, et Di Donato 2003; Peinado et al. 2005; Herranz et al. 2016). LOXL2 dans le noyau interagit également avec le facteur de transcription SNAI1, lui aussi impliqué dans l'EMT, et le stabilise.

Comme pour LOX, l'implication de LOXL2 a été mise en évidence dans différents cancers comme cela sera abordé par la suite. (Barker, Cox, et Erler 2012; L. Wu et Zhu 2015)

(3) LOXL1, LOXL3, LOXL4

Peu de données sont disponibles en ce qui concerne les rôles biologiques de ces protéines.

LOXL1 est le principal acteur de la formation des fibres élastiques, et l'inhibition de son activité est responsable du glaucome exfoliatif (Whigham et al., 2011). LOXL1 intervient également dans la progression de différents types de cancer. Une diminution de LOXL1 favoriserait le développement de cancer de la vessie et des carcinomes de cellules rénales. Une augmentation favoriserait le développement d'adénocarcinome pulmonaire et de carcinome des glandes salivaires (Xiao et Ge 2012). Mais son rôle dans cette pathologie reste peu étudié.

LOXL3, a été mis en évidence comme pouvant être un frein au cycle cellulaire de cellules normales et tumorales, en s'associant au facteur de transcription STAT3 dont elle catalyse la réaction de déacétylation-déacétylimination via son domaine SRCR. Ceci empêche la protéine STAT3 de se dimériser, ce qui bloque la voie de signalisation JAK/STAT3 et donc la prolifération des cellules (Ma et al. 2017). En plus d'agir sur le cycle cellulaire, il a été démontré *in vitro* que LOXL3 augmente la stabilité de SNAI1 et donc favorise l'EMT (Peinado et al. 2005). Le rôle de LOXL3 dans les cancers est encore peu décrit dans la littérature, mais celle-ci semble être impliquée dans le développement de cancer du sein, et de mélanomes (Peinado et al. 2005; Santamaría et al. 2018).

Finalement, une implication de LOXL4 dans les cancers émerge depuis quelques temps, mais son rôle reste aussi peu défini que celui de LOXL3. LOXL4 semble promouvoir la prolifération et la formation de métastases dans les cancers de la tête et du cou et les cancers gastriques. Dans les cancers de la vessie et du sein, LOXL4 semble avoir un rôle suppresseur de tumeur en diminuant la prolifération cellulaire et les métastases. L'implication semblerait dépendre du stade tumoral et du contexte cellulaire (Weise et al. 2008; R. Li et al. 2015; Shao et al. 2019)

B. LOX et LOXL2 : Cancer

1. Le rôle anti-tumoral

L'une des premières implications des lysyl oxydases décrite dans les cancers était le rôle de gène suppresseur de tumeur de *lox*. S. Contente et ses collaborateurs ont été les premiers à isoler un ARNm qu'ils ont appelé le ras rescision gène (*rrg*) qui était régulé à la baisse dans des fibroblastes de rats transformés par H-Ras. Ils ont montré que la surexpression de « *Ras rescision gene* » dans les fibroblastes murin transformé par H-RAS aboutissait à une réversion de la transformation. Il a été révélé par la suite que ce gène était le gène *lox* (Contente et al. 1990; Kenyon et al. 1991).

LOX a longtemps été considérée comme un suppresseur de tumeur, mais il est désormais prouvé que ses activités anti-tumorales sont essentiellement portées par son pro-peptide.

Une étude sur les cancer de l'estomac a révélé qu'un polymorphisme du gène *Lox* induisant un seul changement d'acide aminé dans la séquence du pro-peptide LOX, LOX-PP (*rs1800449*, Arg158Gln), était associé à une incidence plus élevée de cancer (Kaneda et al. 2004). Une étude sur le cancer du sein triple négatif qui évaluait le même polymorphisme, a confirmé le rôle suppresseur de tumeur de LOX-PP. Il a ensuite été montré que LOX-PP inhibait la formation de tumeur via un blocage du récepteur du facteur de croissance HER-2/neu qui transmet les signaux à RAS (Min et al. 2009). LOX-PP a un effet inhibiteur sur différentes voies de signalisation favorisant le développement tumoral. LOX-PP peut notamment atténuer la signalisation du Fibroblast Growth Factor-2 (FGF2) induite par l'activation du Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) et de AKT (Palamakumbura et al. 2009). LOX-PP interviendrait aussi au niveau de la voie de signalisation FAK, et inhiberait Ras (M. Wu et al. 2007; Sato et al. 2011; Bais et al. 2012) De plus, il a été défini comme intervenant dans l'inhibition des voies de réparation de l'ADN menant à la protéine MRE11 qui intervient au niveau des réparations de cassure double brin (Bais et al. 2015) (fig.24).

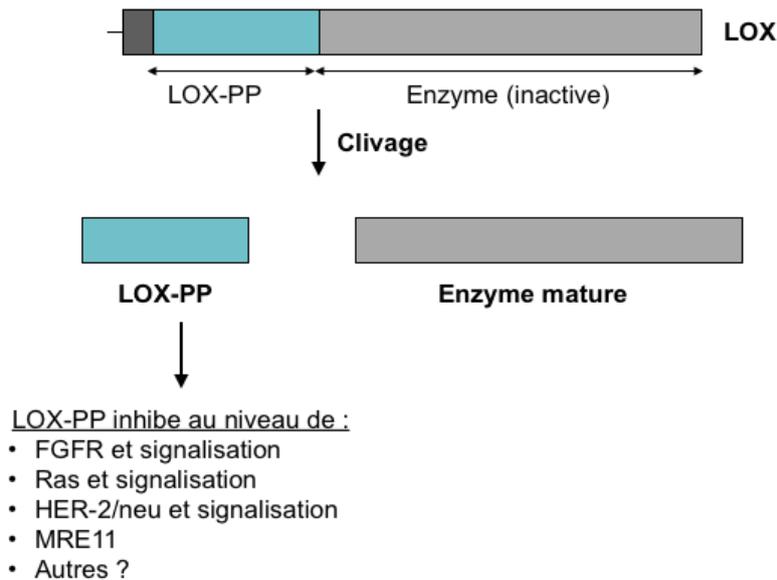


Figure 24: Résumé des interactions et des cibles connues de LOX-PP
 (Adapté de(Philip C. Trackman 2018))

Tout comme pour LOX quelques études suggèrent que LOXL2 pourrait jouer un rôle de suppresseur de tumeur. Le gène *Lox/2* est localisé dans une région chromosomique fréquemment délétée dans une variété de cancers humains. (Payne, Hendrix, et Kirschmann 2007). Une étude génomique a montré une diminution de l'expression de l'ARNm d'environ 60 fois dans des fibroblastes de rat transformés par RAS (Zuber et al. 2000). Une régulation à la baisse de l'expression de l'ARNm de LOXL2 a été aussi observée dans plusieurs lignées cellulaires et échantillons de tissus de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Rost et al. 2003). Une analyse par microarray a mis en évidence un baisse de l'expression de LOXL2 dans les tumeurs de l'ovaire (Ono et al. 2000). De plus, une étude sur des échantillons de patient a montré que l'expression de l'ARNm de LOXL2 était significativement plus faible dans les tissus de cancer du poumon à petites cellules que dans les tissus normaux environnants (P. Zhan et al. 2012). Cependant, aucune étude n'a démontré de manière définitive le rôle de suppresseur de tumeur pour LOXL2 à l'aide de modèles *in vitro/in vivo*, ni proposé d'explication mécanistique.

2. Rôle dans la progression tumoral

a) La surexpression de LOX et LOXL2 dans les cancers

Une augmentation de l'expression de l'ARNm et/ou des protéines LOX ou LOXL2 a été montrée dans de nombreux cancers. L'ARNm et/ou la protéine LOX sont surexprimées chez

les patients atteints de cancer du sein (Erlor et al. 2006; Cox et al. 2015), de la tête et du cou (Erlor et al. 2006; Le et al. 2009; Y. S. Lee et al. 2017), du nasopharynx (Hua et al. 2016), de l'œsophage (Sakai et al. 2009), du colon (Ann-Marie Baker et al. 2013; Reynaud et al. 2017), des poumons (Wilgus et al. 2011), de la prostate (Nilsson et al. 2015), dans les gliomes (S. Han et al. 2014; Huang et al. 2018), et dans les cancers hépatiques et gastriques (Umezaki et al. 2019) (Kasashima et al. 2016; Y.-L. Han et al. 2019). Dans ces études, une augmentation de l'expression d'ARNm de LOX corrèle également avec une diminution de la survie globale et de la survie sans métastases.

L'ARNm et/ou la protéine LOXL2 ont eu été trouvés surexprimés chez les patients présentant des cancers du sein (Barker et al. 2011; Ahn et al. 2013; Janyasupab et al. 2015), de l'œsophage (X.-H. Zhan et al. 2017), du pancréas (J. S. Park et al. 2016; Ninomiya et al. 2018), de la tête et du cou (Fukumoto et al. 2016), dans les gliomes (Du et Zhu 2018), les carcinomes pulmonaires (P. Zhan et al. 2012), et dans les cancers hépatiques et gastriques (Ninomiya et al. 2018; Umezaki et al. 2019) (Kasashima et al. 2014). Il est important de noter qu'il existe de plus en plus de preuves selon lesquelles une expression élevée de LOXL2 est corrélée au grade tumoral, à un mauvais pronostic et à une survie réduite. La surexpression de LOXL2 est de plus généralement associée à des formes de cancers plus agressives (Peinado et al. 2005; Peng et al. 2009; Barry-Hamilton et al. 2010).

Des résultats contradictoires ont donc été observés quant aux rôles de LOX et LOXL2 dans le développement de la maladie cancéreuse. Cependant, les études défendant un rôle en tant que facteur protecteur pour LOX et LOXL2 sont peu nombreuses, et des preuves solides suggèrent que l'activité extracellulaire de ces protéines lors du remodelage de la matrice extracellulaire facilite l'invasion et la métastase des cellules tumorales.

b) Les mécanismes d'action

On sait que LOX et LOXL2 régulent différentes étapes de la progression tumorale via leurs activités enzymatique ou indépendamment de celles-ci. Elles vont intervenir en favorisant l'initiation tumorale, la prolifération, ou en participant à la réponse à l'hypoxie. La réticulation

de la MEC via LOX et LOXL2 aura de nombreux impacts sur l'angiogénèse et le phénotype cellulaire. LOX et LOXL2 vont également intervenir sur l'échappement tumoral en favorisant l'EMT, en agissant sur différentes voies de signalisation impliquées dans les phénomènes d'adhérences et finalement elles pourront favoriser le développement de niches pré-métastatiques et la formation de métastases proprement dites (Fig.25).

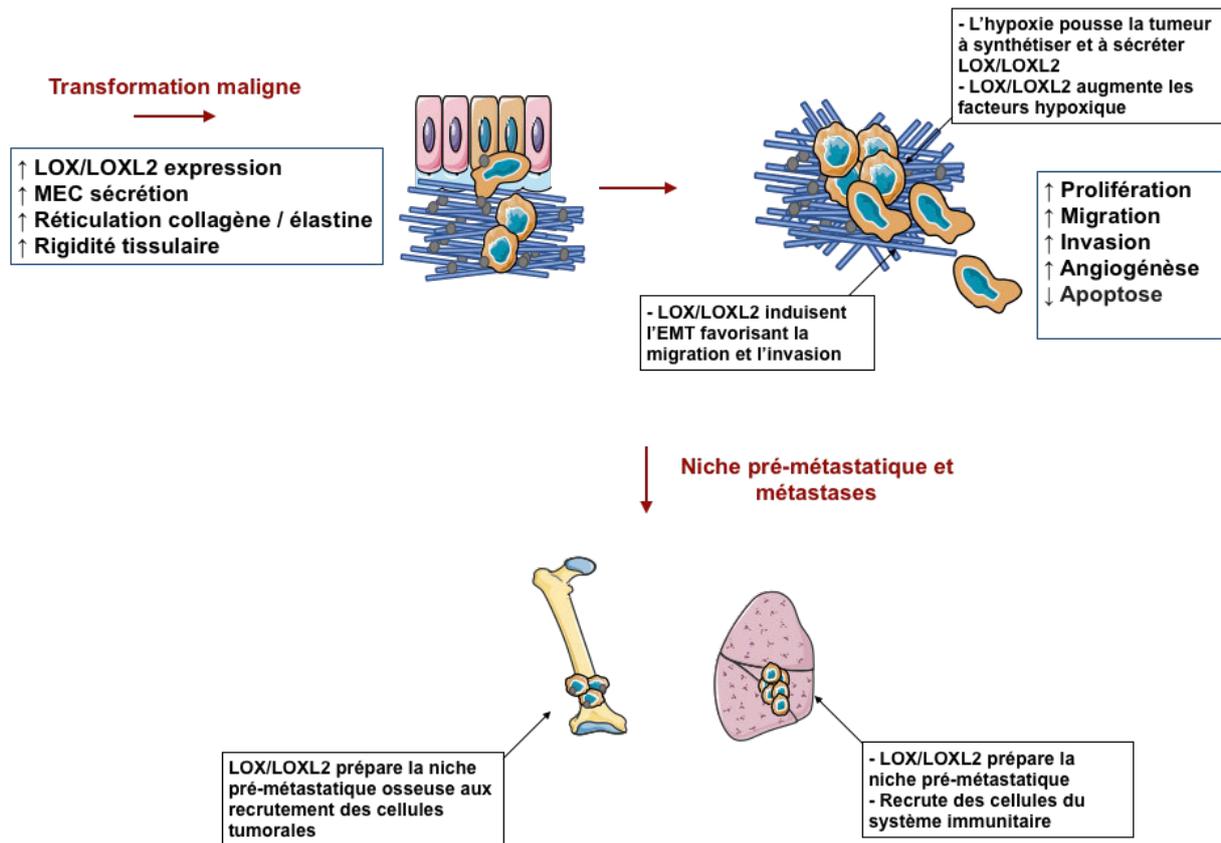


Figure 25: LOX et LOXL2 sont impliquées dans différentes étapes de la tumorigénèse

Une expression accrue de LOX et LOXL2 augmente le remodelage du microenvironnement local, ce qui entraîne une augmentation de la sécrétion et du dépôt de la matrice extracellulaire, une rigidité des tissus qui améliore la prolifération, une diminution de l'apoptose et l'induction de l'EMT, la migration, et l'invasion. LOX et LOXL2 vont préparer en parallèle la colonisation en intervenant dans la formation de la niche pré-métastatique (Adapté de (Barker, Cox, et Erler 2012)).

(1) Le développement de la tumeur primaire

Depuis les premières étapes de l'initiation tumorale jusqu'aux métastases, les interactions entre les cellules et leur microenvironnement orientent l'évolution du processus tumoral. Les propriétés mécaniques de la MEC modulent le phénotype des cellules et des tissus en influençant le remodelage du cytosquelette et la signalisation des récepteurs. Les LOXs sont susceptibles de favoriser la tumorigénèse via le remodelage actif du microenvironnement tumoral. En effet, l'augmentation des dépôts de collagène et de la réticulation des fibres de

la matrice vont promouvoir l'initiation tumorale en activant différentes voies de signalisation ou en déstabilisant l'intégrité des tissus (Kass et al. 2007; Brabrand et al. 2015; T.-H. Wang, Hsia, et Shieh 2017). En effet, une augmentation de la rigidité de la matrice induite par LOX et LOXL2 va pousser à une activation des adhésions focales qui vont augmenter l'activité de la signalisation PI3K/AKT, une voie impliquée dans la survie et la prolifération et favorisant la malignité (Levental et al. 2009). Cet effet mécanique va aussi avoir un effet activateur sur la voie de signalisation FAK/SRC (Focal Adhesion kinase/ Steroid Receptor Coactivator). Il a été prouvé qu'une réticulation des collagènes par LOX ou LOXL2 induit une phosphorylation des kinases FAK et SRC impliquées dans la survie (anti-apoptotique), la prolifération, et la migration (A.-M. Baker et al. 2013; Barker et al. 2013).

Une étude a aussi montré que LOX pouvait agir sur l'initiation tumoral en agissant sur l'échappement de la sénescence induite par le stress oncogénique, en effet l'augmentation de LOX ou LOXL2 accélère la fuite de la sénescence, alors que l'inhibition de l'activité de la lysyl oxydase stabilise cette sénescence, retarde la tumorigénèse et augmente la survie. L'échappement à la sénescence repose l'activation de FAK via l'activité de LOX ou LOXL2 (Wiel et al. 2013).

(2) La prolifération

Quelques publications montrent également que LOX et LOXL2 influencent la prolifération. Dans une étude sur le cancer du sein, LOX a été identifiée comme agissant en synergie avec le lactogène placentaire (LP), un membre de la famille des hormones de croissance, amplifié dans le cancer du sein. Après avoir co-immunoprécipité LOX et LP, ils ont montré que LOX seul n'avait aucun effet sur la prolifération cellulaire alors que la surexpression de LP seul augmentait la prolifération de 49%. Lorsque LOX et LP étaient surexprimées, ils ont observé des augmentations de 121% et 240% de la prolifération cellulaire et de la migration respectivement (Polgar et al. 2007).

Une autre étude, concernant cette fois LOXL2 a mis en évidence que celle-ci favorise la prolifération cellulaire en inhibant l'apoptose stimulée par MARCKSL1. De plus, ils ont montré que LOXL2 active de manière dose dépendante la phosphorylation des composants de cascade de signalisation FAK/Akt/mTOR, voie impliquée dans la prolifération (B.-R. Kim et al. 2014).

(3) L'hypoxie

L'hypoxie intra-tumorale est très fréquente dans les cancers, elle apparaît dès que la croissance tumorale atteint 1 à 2 mm³. Les facteurs de transcription induits par l'hypoxie activent l'expression d'une grande batterie de gènes codant pour des protéines qui favorisent le remodelage de la matrice extracellulaire, la vascularisation, la croissance tumorale primaire, le recrutement de cellules stromales, la motilité cellulaire, la formation de niches pré-métastatiques, l'envahissement des tissus locaux, l'extravasation sur les sites de métastase et la maintenance du phénotype de cellules souches cancéreuses nécessaire à la génération de tumeurs secondaires (Semenza 2016).

Il a été mis en évidence dans différents types de cancer, une corrélation entre l'expression de LOX/LOXL2 et celle du facteur clé de la régulation de l'hypoxie HIF-1. En hypoxie, l'expression de HIF-1 est augmentée ce qui va induire la transcription de LOX et LOXL2 favorisant ainsi la progression tumorale (Erlor et al. 2006; Pez et al. 2011; Schietke et al. 2010). Il a également été montré que LOX était régulée par HIF-1 α , et que celle-ci agissait de manière réciproque sur l'expression de HIF-1 α . Cette étude montre que l'activité enzymatique de LOX favorise la synthèse de la protéine HIF-1 α , par l'activation de la voie PI3K / Akt, et que HIF-1 α potentialise l'action de LOX sur la prolifération des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Pez et al. 2011). La régulation de LOX et LOXL2 via HIF-1 va catalyser les propriétés invasives des cellules notamment en agissant sur la voie FAK/Src, mais aussi en agissant sur la répression de l'E-Cadhérine (Erlor et al. 2006; Schietke et al. 2010). L'activation de LOXL2 médiée par HIF-1 α en plus d'agir sur les phénomènes de migration, d'invasion, d'EMT va aussi influencer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (M. Wang et al. 2017) (Fig.26).

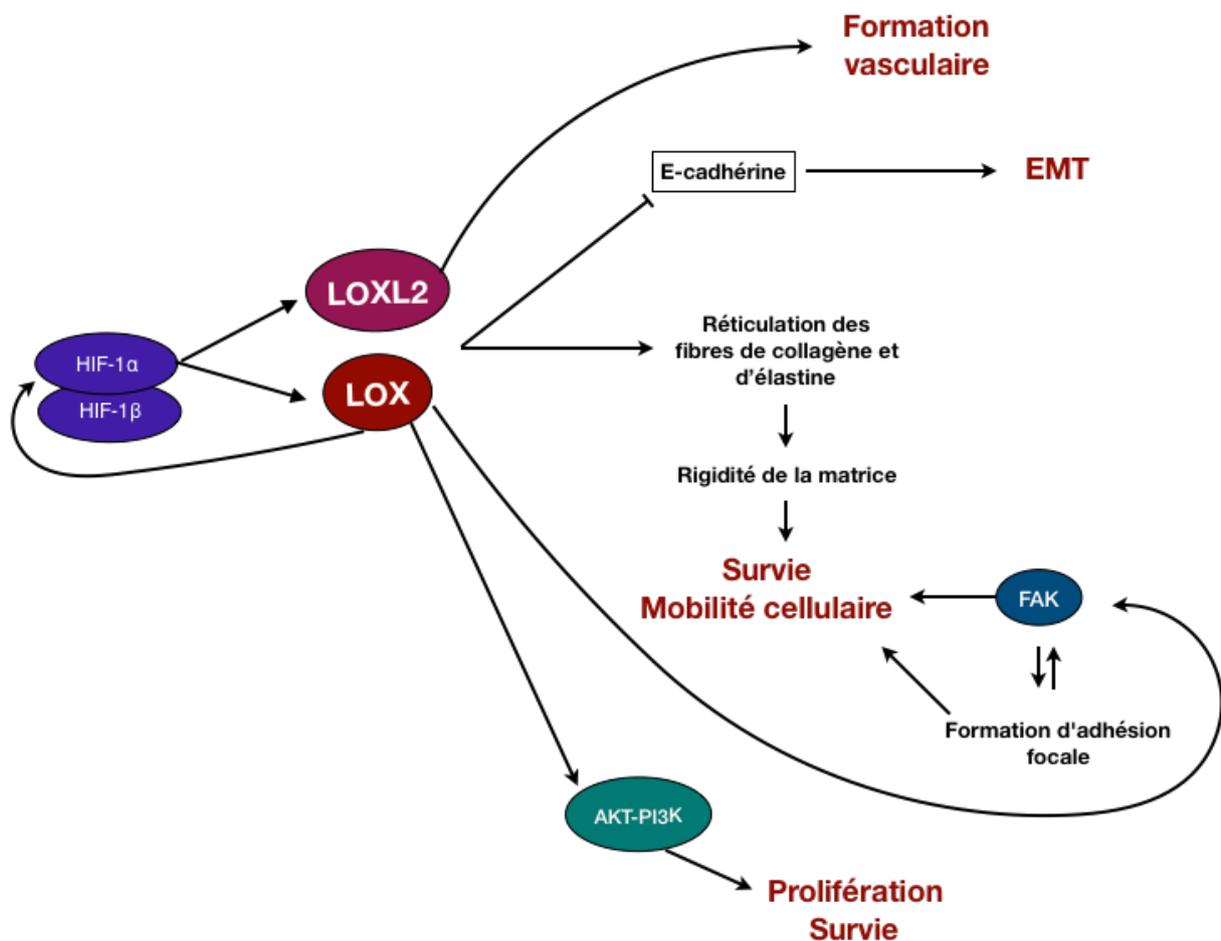


Figure 26: Les influences de HIF-1 α sur LOX et LOXL2

HIF-1 α va induire la transcription de LOX et LOXL2 qui influence divers comportement cellulaire tel que la survie, la prolifération, l'EMT, la mobilité cellulaire et la formation vasculaire (Inspiré de (Semenza 2016)).

(4) L'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse tumorale est un des phénomènes les plus importants mis en place lors de l'hypoxie. En effet, afin de pallier au manque de nutriments et d'oxygène, les tumeurs développent leur vascularisation. Le remaniement de la matrice joue aussi un énorme rôle lors des processus angiogéniques. Une inhibition de LOX et LOXL2 est ainsi corrélée avec une diminution de l'angiogenèse. Le niveau de LOX et LOXL2 est plus élevé dans les cellules endothéliales tumorales comparé aux cellules endothéliales normales. Cette augmentation de LOX et LOXL2 est accompagnée d'une augmentation de la formation de nouveaux vaisseaux (Bignon et al. 2011; Shih et al. 2013).

Dans la littérature, on peut voir que LOX et LOXL2 interviennent de plusieurs manières sur l'induction de l'angiogenèse. L'équipe de Barker et al. a ainsi montré que LOX active Akt par

le biais d'une stimulation du récepteur PDGFR β (Platelet-derived growth factor receptor β), un facteur de croissance dérivé des plaquettes, entraînant ainsi une augmentation de l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Ils ont confirmé leurs résultats en montrant une diminution de l'angiogenèse induite par LOX en utilisant des inhibiteurs de LOX, PDGFR β , Akt et de VEGF. De plus, LOX est cliniquement corrélé avec l'expression du VEGF et la formation de vaisseaux sanguins chez les patients souffrant de cancer (Ann-Marie Baker et al. 2013). Une autre étude, a montré que l'angiogenèse était associée à une augmentation de la phosphorylation de FAK dépendante de l'activité LOX, l'utilisation d'inhibiteur de LOX et de phosphorylation de FAK entraînant une perte de la formation de nouveaux vaisseaux (Osawa et al. 2013). Une étude sur LOXL2 a quant à elle mis en évidence son rôle dans l'induction de l'angiogenèse tumorale via FGF2 (Zaffryar-Eilot et al. 2013).

(5) La transition épithélio-mésenchymateuse

Une implication de LOX et LOXL2 a été mise en évidence dans les phénomènes d'EMT. Une augmentation de LOX et LOXL2 est corrélée avec une diminution d'E-cadhérine et une augmentation de vimentine, des marqueurs de l'EMT (Schietke et al. 2010; Kasashima et al. 2016). De nombreuses études ont montré que LOX et LOXL2 étaient impliquées dans des processus d'EMT indépendamment de leurs activités enzymatiques.

LOX va intervenir sur différentes voies de signalisation afin d'induire cette transition, en stimulant la transcription de TWIST ou de SNAI2 notamment (El-Haibi et al. 2012; Boufraqueh et al. 2016).

Mis en évidence dans de nombreuses publications, l'implication de LOXL2 dans l'EMT n'est plus à confirmer. Ainsi, LOXL2 active les voies FAK/Src ou inhibe la transcription de SNAI/E-cadhérine, ce qui induit une diminution de l'E-cadhérine, de l'occludine, du récepteur aux œstrogènes, et une augmentation de la vimentine (Ahn et al. 2013; Moon et al. 2013; P.-G. Park et al. 2017; Salvador et al. 2017).

(6) La migration et l'invasion

Les phénomènes d'invasion et de migration sont des réponses aux phénomènes d'hypoxie, d'angiogenèse et d'EMT. Il est donc normal que les voies de signalisation précédemment citées, telles que les voies FAK/Src, PI3K/AKT..., participent à ces mécanismes. De plus, l'EMT

serait un événement indispensable pour que les cellules tumorales acquièrent un potentiel invasif. L'implication de LOX et de LOXL2 dans ce processus était sous-entendue de par leurs rôles dans l'activation de ce changement phénotypique (Peinado et al. 2005; M. Wu et al. 2007; Peinado et al. 2008; Schietke et al. 2010; Moon et al. 2013). Elle a été confirmée dans de nombreuses études qui ont mis en évidence qu'une augmentation de l'expression de LOX ou LOXL2 favorise la migration et l'invasion des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*. Une diminution de l'activité LOX ou LOXL2 par le biais d'inhibiteur tel que le β APN, d'anticorps, ou à l'aide d'ARN interférents, suffit à diminuer ou abolir ces phénomènes (Kirschmann et al. 2002; Akiri et al. 2003; Erler et al. 2006; Peinado et al. 2008; Barry-Hamilton et al. 2010; Ann-Marie Baker et al. 2011; Osawa et al. 2013; Ahn et al. 2013; Nishikawa et al. 2015).

Des équipes se sont intéressées à la compréhension mécanistique de ces phénomènes de migration et d'invasion. Il a ainsi été montré que la rigidité de la matrice extracellulaire régulée par l'activité de LOX et de LOXL2 est un événement clé qui pousse la migration et l'invasion des cellules (Peinado et al. 2005; Levental et al. 2009).

Finalement, il a aussi été montré que LOX et LOXL2 influençaient les événements de motilité/migration des cellules en agissant sur la structure cellulaire. Lors de l'étude sur l'interaction entre LOX et le lactogène placentaire, il a ainsi été démontré qu'une augmentation de l'expression de LOX conduisait à l'augmentation de la formation de fibres de stress favorisant la migration (Polgar et al. 2007). Une autre étude, a révélé que LOX via son activité enzymatique induisait la motilité cellulaire en modifiant la polymérisation des filaments d'actine, ce qui implique la régulation de la voie de signalisation p130 (Cas) / Crk / DOCK180. La formation de ce complexe entraîne une augmentation de Rac-GTP, qui permet la formation de lamellipodes permettant la migration (Payne, Hendrix, et Kirschmann 2006).

L'implication de LOXL2 dans les phénomènes d'invasion a aussi été expliquée par son rôle sur la désorganisation de la polarité cellulaire et des complexes de jonctions serrées. En effet, LOXL2 via l'activation de SNAI1 agit sur la régulation transcriptionnelle de *Lgl2* et *claudin1*, des composants des jonctions serrées et des complexes de polarité cellulaire (Moreno-Bueno et al. 2011).

(7) La niche pré-métastatique, métastases et métastases osseuses

En plus du rôle de LOX et LOXL2 tout au long de la progression tumorale, des études basées sur des analyses d'expression dans des tumeurs humaines combinées à des essais fonctionnels dans des systèmes cellulaires ont montré que LOX et LOXL2 sont des acteurs de la formation de métastases dans plusieurs types de carcinomes (Barker et al. 2011; Moreno-Bueno et al. 2011; Cox, Gartland, et Erler 2016; Reynaud et al. 2017). Les premières études ont suggéré que l'action de LOX et LOXL2 sur la tumorigénèse et le développement de métastases étaient liés à leurs activités de réticulation de la MEC (Barry-Hamilton et al. 2010; Barker et al. 2011; Wong et al. 2014; Canesin et al. 2015).

Il a ainsi été mis en évidence que LOX est essentielle à la formation de niches pré-métastatiques pulmonaires dans le cancer du sein. J. Erler et son équipe, ont montré que LOX sécrétée par les cellules tumorales mammaires hypoxiques s'accumule au niveau des sites pré-métastatiques pulmonaires, et induit la réticulation du collagène-IV présent dans la membrane basale. Une fois réticulé, le collagène IV est dégradé, ce qui induit le recrutement des cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuses (Bone marrow derived cells ou BMDC) exprimant le marqueur CD11b +. Les cellules CD11b + sont connues comme étant des cellules myéloïdes suppressives capables d'inhiber les réponses immunitaires des cellules de type T et N. Ces cellules adhèrent au collagène IV réticulé, et produisent la métalloprotéinase-2 MMP2 matricielle qui clive le collagène, renforçant ainsi l'invasion et le recrutement des cellules dérivées de la moelle osseuse et des cellules tumorales. Le rôle de LOX a été confirmé par l'utilisation d'un anticorps LOX bloquant qui empêche le recrutement de cellules BMDC CD11b + et la croissance métastatique. De plus, une analyse des biopsies de métastases humaines a confirmé une co-localisation des cellules CD11b + et de LOX (Erler et al. 2009) (fig.27).

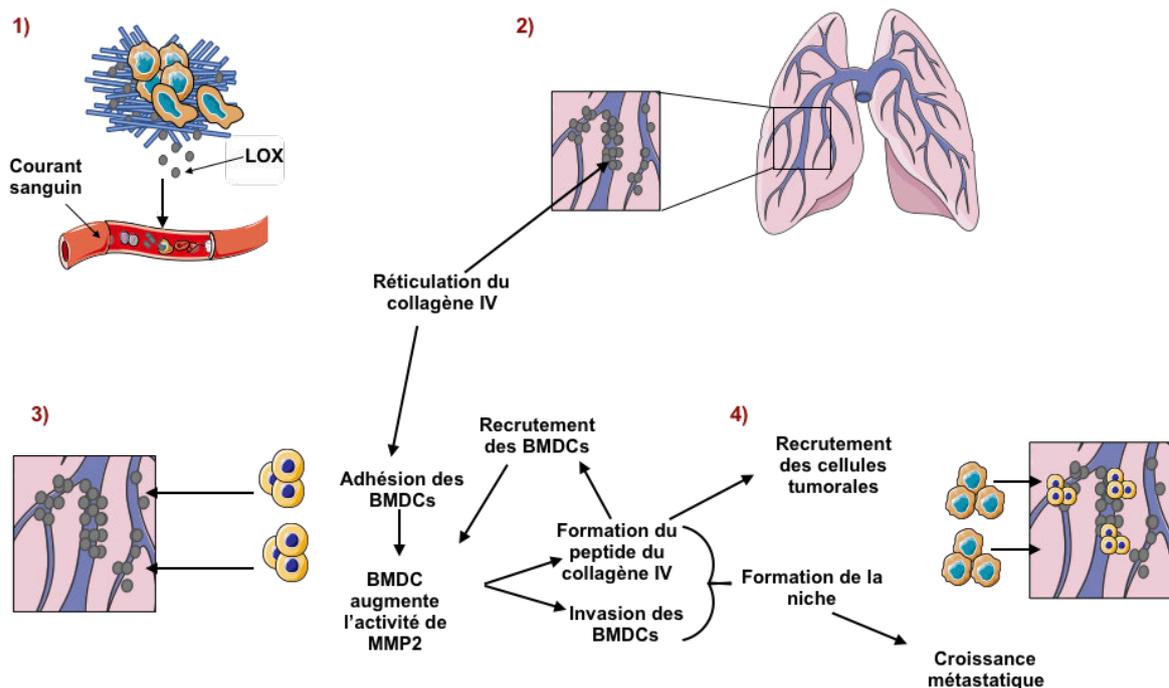


Figure 27: Le rôle de LOX dans la formation de la niche pré-métastatique pulmonaire dans le cancer du sein

1) Les cellules tumorales primaires hypoxiques sécrètent LOX dans le sang. 2) LOX s'accumule dans les poumons de souris porteuses de tumeurs et réticule le collagène IV. 3) L'adhésion des cellules CD11b+ à la matrice réticulée augmente la production de MMP-2 par les BMDCs. Le remodelage du collagène IV par LOX et MMP-2 conduit à la formation de peptides du collagène IV qui favorise l'invasion des cellules CD11b+ et à un recrutement accru de BMDCs. 4) La formation de la niche pré-métastatique dépendante de LOX améliore la croissance métastatique (Adapté de (Erler et al. 2009)).

Une corrélation a été établie entre LOX et l'induction de lésions ostéolytiques pré-métastatiques chez les patientes ayant un cancer du sein ER négatif. Une expression élevée de LOX dans la tumeur primaire ou l'injection de l'enzyme recombinante en systémique conduit à la formation de lésions ostéolytiques même en l'absence de cellules tumorales. Dans l'os, LOX apparaît comme un régulateur de l'ostéoclastogénèse induite par NFATc1 (Nuclear Factor Of Activated T Cells 1) qui perturbe l'homéostasie osseuse normale conduisant à la formation de lésions pré-métastatiques focales. Ces lésions constituent ensuite une plateforme permettant aux cellules tumorales en circulation de coloniser et de former des métastases osseuses (Cox et al. 2015). Nous avons récemment montré qu'une expression élevée de LOX dans les tumeurs primaires de patients atteints de cancer colorectal était associée à un mauvais pronostic, et que LOX était surexprimée par les cellules tumorales chez les patients présentant des métastases osseuses. Lors de nos études, nous avons démontré que la surexpression de LOX dans les cellules tumorales colorectales injectées dans des souris

immunodéficiences, ou l'injection de milieux conditionné de cellules surexprimant LOX, favorise la dissémination des cellules tumorales dans la moelle osseuse en augmentant leur attachement au collagène I présent dans l'os. Une fois dans l'os, LOX favorise la formation de lésions ostéolytiques en perturbant l'homéostasie osseuse. En effet, nous avons mis en évidence que LOX inhibe d'une part la différenciation des ostéoblastes et d'autre part promeut la différenciation des ostéoclastes de façon dépendante de l'IL6. Ceci conduit à un déséquilibre entre la résorption et la formation osseuse et à la formation de plage de lyse (Reynaud et al. 2017) (fig.28).

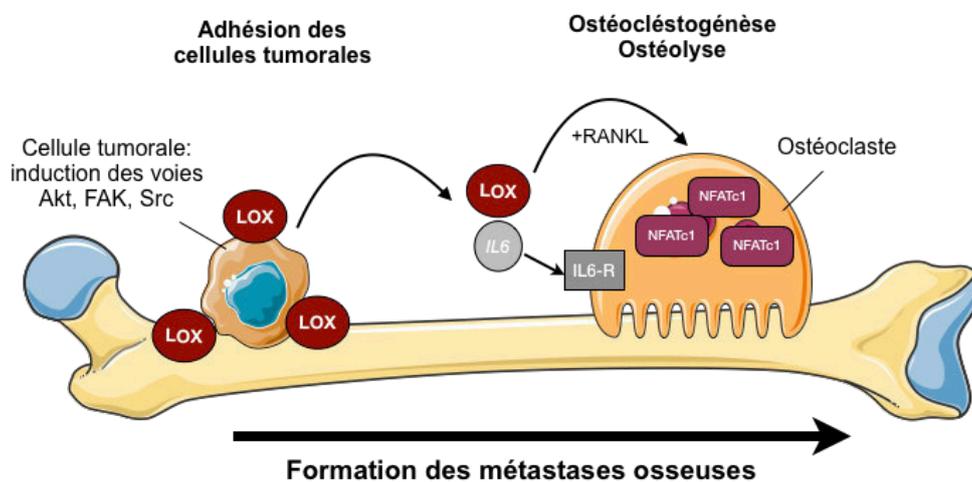


Figure 28: Rôle de LOX lors de la formation de métastases osseuses de cancer du cancer du colon activant les voies de signalisation associées aux intégrines (*Fak, Src, Akt*) et induisant la production d'IL6. À leur tour, IL6 et LOX (par la translocation nucléaire de NFATc1) augmentent l'ostéoclastogénèse induite par RANKL, conduisant à la formation de lésions ostéolytiques. (Adapté de (Reynaud et al. 2017))

Le rôle de LOXL2 produit par les cellules tumorales hypoxiques dans le recrutement des BDMCs et favorisant la formation de la niche pré-métastatique est encore controversé. Une première étude qui s'intéressait à l'implication de LOX et des différents membres de la famille a mis en évidence que LOXL2 favorisait le développement de la niche pré-métastatique, mais qu'elle ne modulait pas le recrutement des BDMCs (Wong et al. 2011). Plus tardivement, l'équipe de Salvador et collaborateurs a montré que LOXL2 possédait les mêmes capacités à recruter les BMDC CD11b+ et différentes cytokines capables d'induire la formation de la niche pré-métastatique pulmonaire. Ils ont de plus montré que ce rôle était indépendant de la réticulation de la matrice extracellulaire avec l'utilisation de deux modèles murins complémentaires qui suppriment ou surexpriment sous condition LOXL2 dans la glande

mammaire de souris PyMT. Ils ont mis en évidence une corrélation directe entre LOXL2 et la charge métastatique pulmonaire et la formation de niche pré-métastatique, et celle-ci était indépendante de la rigidité de la MEC et de l'organisation du collagène au niveau des tumeurs primitives et des sites métastatiques, ainsi que de l'expression de LOX (Salvador et al. 2017). La matrice semble quand même jouer un rôle sur LOXL2 et la formation de la niche pré-métastatique notamment dans les carcinomes hépatocellulaires. Il a été constaté que la réticulation de la MEC active la voie de signalisation $\alpha\text{V}\beta\text{1}$ / JNK / c-JUN qui participe à la régulation positive de LOXL2 via AP-1 qui induit la transcription de LOXL2. Une fois secrétée, LOXL2, par un mécanisme encore inconnu, favoriserait la production de fibronectine, de MMP9 et de CXCL12 par les fibroblastes pulmonaires et le recrutement de BMDCs pour aider à la formation de niches pré-métastatiques (S. Wu et al. 2018) (fig.29).

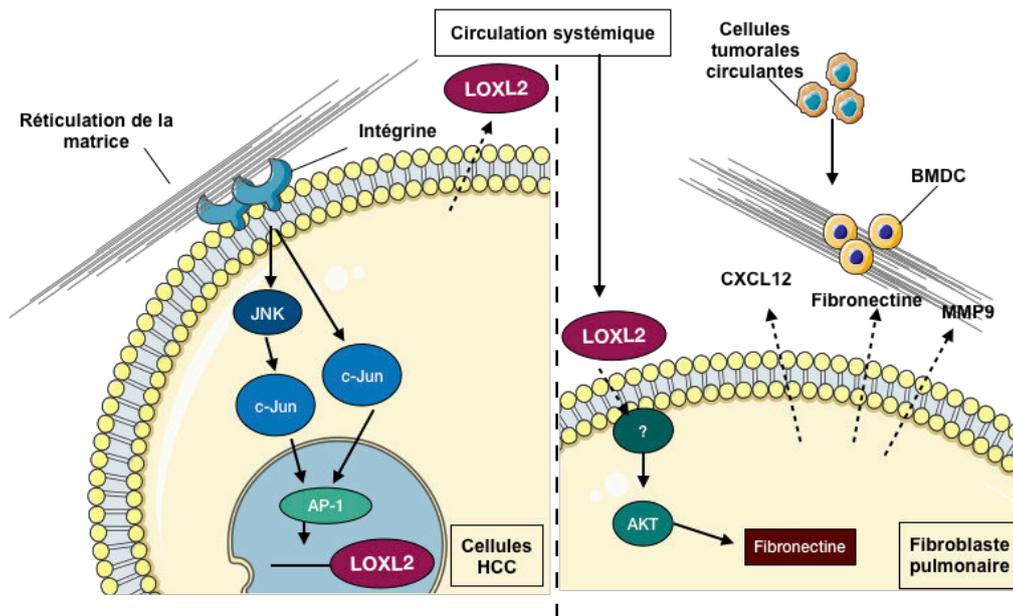


Figure 29: Le rôle de LOXL2 dans la formation de la niche pré-métastatique pulmonaire de carcinome hépatocellulaire

La rigidité plus élevée de la matrice régule à la hausse l'expression de LOXL2 dans les cellules HCC ce qui va induire la sécrétion de LOXL2 afin de favoriser la production de fibronectine, l'expression de MMP9 et CXCL12 et le recrutement de BMDC pour aider à la formation de niches pré-métastatiques (Adapté de (S. Wu et al. 2018)).

Dans la littérature, peu d'études sont disponibles au sujet de l'implication de LOXL2 dans les métastases osseuses. Cependant, il a été montré que l'inhibition de LOXL2 à l'aide d'un anticorps monoclonal sur des lignées de cancer du sein MDA-MB-231 ou par le biais de shARN sur des lignées mammaire murine 4T1 réduisait de manière significative les métastases osseuses (Barry-Hamilton et al. 2010; Barker et al. 2011).

3. Les inhibiteurs ciblant LOX et LOXL2

Comme on a pu le voir dans les précédents paragraphes, LOX et LOXL2 sont impliquées dans de multiples processus et voies de signalisation influençant la tumorigénèse et le développement métastatique (Fig.30). De par leurs implications multiples, cibler LOX et/ou LOXL2 est une perspective prometteuse dans le développement de nouveaux médicaments pour prévenir la progression et les métastases du cancer.

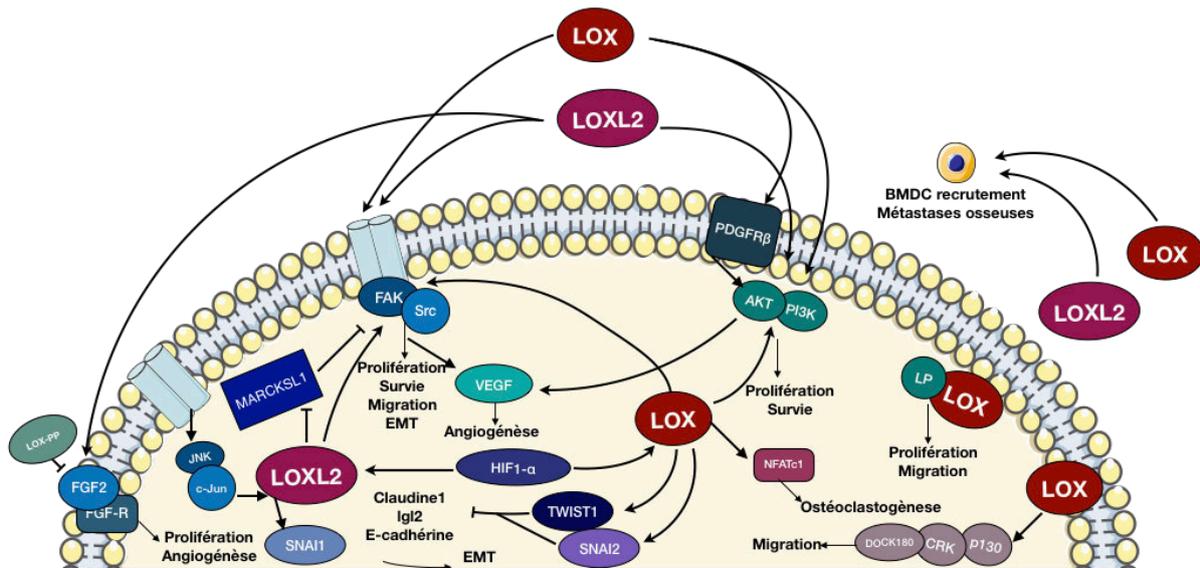


Figure 30: Schéma récapitulatif des nombreuses voies de signalisation utilisées par LOX et LOXL2 pour favoriser la progression tumorale et le développement de métastases

Illustration des implications de LOX et LOXL2 abordés dans les précédents paragraphes. Influence sur l'initiation tumorale, l'hypoxie, l'angiogénèse, l'EMT, l'invasion et la formation des métastases. (Mise en page inspiré par (Barker, Cox, et Erler 2012))

Des anticorps solubles anti-LOX/ anti-LOXL2 ou des inhibiteurs chimiques tel que le β APN ont été utilisés chez la souris lors des premières études démontrant le rôle de LOX dans la formation de métastases. Ils ont induit une diminution de la formation de celles-ci (Erler et al. 2006; Levental et al. 2009; Barker et al. 2011). Toutefois, ils doivent être utilisés à fortes doses pour induire ces effets, et de ce fait l'administration de ces agents peut être limitée par des effets indésirables importants (par exemple, lathyrisme, réaction immunitaire). C'est pourquoi à l'heure actuelle, les inhibiteurs de LOX servent à améliorer la compréhension de la biologie de LOX dans les cancers ou dans d'autres pathologies, mais ne peuvent être utilisés en clinique.

Des nanoparticules contenant des anticorps anti-LOX ont été développées afin de palier à la toxicité. Elles présentaient des effets thérapeutiques améliorés sur l'inhibition de la croissance tumorale *in vitro* et dans un modèle de xénogreffe de souris *in vivo*, par rapport à l'anticorps soluble avec une dose cinquante fois inférieure à celui-ci. Bien que prometteur, ces nanoparticules ont été décrites dans un unique article paru en 2012 (Kanapathipillai et al. 2012). Récemment, un composé inhibiteur de LOX le CCT365623 a été développé par Tang et son équipe. La molécule pharmaceutique inhibe LOX à des concentrations de 5 μM alors que le βAPN inhibe à environ 350 μM , et permet un retard considérable du développement de la tumeur primitive et une diminution de la charge pulmonaire métastatique chez la souris. Ce traitement présente des propriétés médicamenteuses prometteuses, une bonne stabilité des microsomes hépatiques, une biodisponibilité orale, des propriétés pharmacocinétiques robustes et il est bien toléré chez la souris. Par conséquent, CCT365623 est un inhibiteur qui devrait permettre d'améliorer encore la compréhension de la biologie de LOX (H. Tang et al. 2017).

Un anticorps anti-LOXL2 monoclonal murin AB0023, inhibiteur allostérique spécifique de l'activité LOXL2 en ciblant le domaine SRCR4 a été développé. Il a été mis en évidence que cet anticorps inhibe la formation de métastases ainsi que la fibrose pulmonaire et hépatique chez la souris (Rodriguez et al. 2010; Barry-Hamilton et al. 2010; Ikenaga et al. 2017). Or, l'équivalent de cet anticorps chez l'homme, l'anticorps monoclonal humanisé simtuzumab n'a montré aucun effet dans un essai clinique de phase II dans le cas du traitement du cancer du pancréas. Il est également inefficace chez les patients atteints de fibrose hépatique ou de cirrhose comme cela a été montré dans un essai clinique de phase II incluant des patients souffrant de stéatose hépatique non alcoolique. (Benson et al. 2017; Harrison et al. 2018). Cela ne semble donc pas être une piste à poursuivre en clinique.

Des petites molécules inhibitrices de LOX/LOXL2 ou spécifique de LOXL2 ont été évaluées lors d'études précliniques. Elles se présentent sous une forme biodisponible qui se répartit dans les tissus, et dont la dose quotidienne n'induit pas de signe clinique délétère décelable. Les premières caractérisations de ces molécules ont confirmé un rôle fonctionnel de l'activité de

LOXL2 dans la progression du cancer du sein. L'inhibition de LOXL2 diminue la croissance et réduit l'angiogenèse des tumeurs primaires. La double inhibition de LOXL2 et de LOX a un effet plus important et a également entraîné une charge métastatique globale plus basse dans les poumons et le foie. Ces premières données appuient fortement ce qui a été démontré précédemment, et semble promettre des bonnes perspectives pour le développement des inhibiteurs sélectifs destinés au traitement des cancers du sein humains (Chang et al. 2017).

Chapitre II: Sujet de thèse

I. Résultats publiés

Lors de mon arrivée au laboratoire, l'équipe s'intéressait au rôle de la Lysyl Oxydases LOX dans le développement tumoral. Comme on l'a vu précédemment, LOX est impliqué dans la tumorigénèse et le développement des métastases.

L'inhibition de l'expression de LOX par les cellules tumorales diminue *in vitro* le potentiel invasif de différents cancers (pancréas, sein, col, tête et cou, rein, poumon, mélanome) (Kirschmann et al. 2002; Payne et al. 2005). Inversement, une forte expression de LOX corrèle avec l'augmentation du risque de rechute métastatique et une diminution de l'espérance de vie chez les patientes atteintes d'un cancer du sein invasif. Cette activité pro-tumorale des lysyl oxydases semble liée au fait que ces enzymes, en réticulant les fibres de collagènes, rigidifient la matrice extracellulaire. Il en résulte un meilleur ancrage et une survie accrue des cellules cancéreuses dans le tissu colonisé (Erlor et al. 2006; 2009).

Caroline Reynaud, qui co-encadre cette thèse, a mis en évidence en 2011 lors de ces précédents travaux que LOX est un acteur majeur dans le développement du cancer colorectal (Pez et al. 2011). C'est donc pour cela que durant la fin de mon master et la première année de mon doctorat, j'ai collaboré à son projet qui s'intéressait au rôle de LOX dans la formation des métastases du cancer du côlon (Reynaud et al., 2017, Annexe). Les cellules tumorales de côlon sont connues pour métastaser préférentiellement aux poumons, au foie et, dans une moindre mesure, à l'os. En effet, les métastases osseuses de cancer du côlon sont observées dans 3,7 à 11% des cas cliniques. Néanmoins, lors de l'autopsie, elles sont observées dans 8,6 à 27% des cas (Suresh et al, 2017). Ceci suggère que les métastases osseuses sont un événement tardif dans la maladie tumorale colique, mais que des cellules tumorales disséminées doivent s'y trouver dès le début du processus métastatique.

Nous avons mis en évidence que l'expression de LOX dans le cancer colorectal est associée cliniquement à mauvais pronostic. En effet, lors d'une étude de la survie globale et de la survie sans rechute, dans une cohorte de patients atteints de cancer colorectal sur la base des taux d'expression élevés et faibles de LOX dans les tumeurs primitives, nous avons constaté qu'une expression élevée de LOX dans les tumeurs primitives était associée à une faible survie globale et une faible survie sans rechute (fig.31).

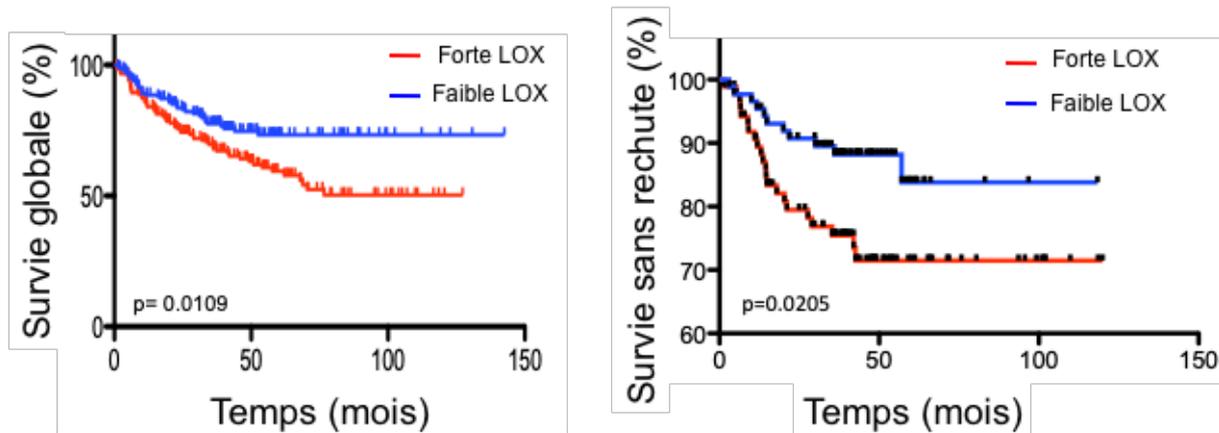


Figure 31: Expression de LOX et issue clinique

Les analyses de Kaplan-Meier de la survie globale et de la survie sans rechute, respectivement, dans une cohorte de patients atteints de CCR (n = 552) basées sur les niveaux d'expression élevés vs faibles de LOX dans les tumeurs primitives.

En utilisant l'immunohistochimie avec un anticorps anti-LOX, nous avons montré qu'il y avait une coloration préférentielle modérée à forte pour LOX associée aux cellules de carcinome dans les métastases osseuses (fig.32).

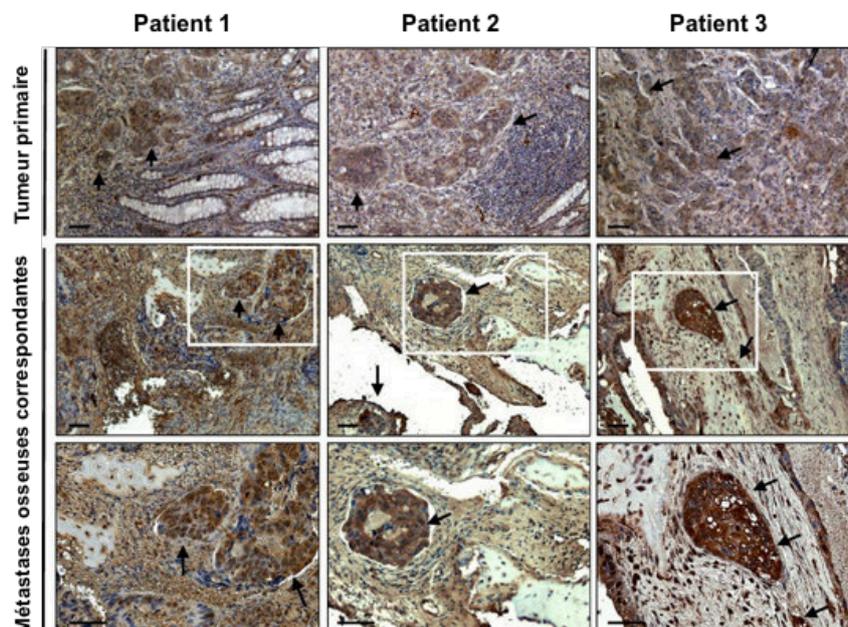


Figure 32: Expression de LOX dans les carcinomes colorectaux primaires humains et leurs métastases osseuses correspondantes

Expression de LOX dans des carcinomes colorectaux primaires humains et leurs métastases osseuses correspondantes. Un fort immuno-marquage de LOX (en marron) est observé dans les cellules néoplasiques (flèches) et, dans une moindre mesure, dans le stroma tumoral desmoplastique. Dans les os, LOX a été observée également dans les lacunes ostéocytaires. Barre d'échelle 1 mm.

Lors de nos études *in vivo*, nous avons observé que LOX sécrétée par les lignées de cellules tumorales du colon génère des lésions ostéolytiques et favorise la colonisation de la moelle osseuse (fig.33).

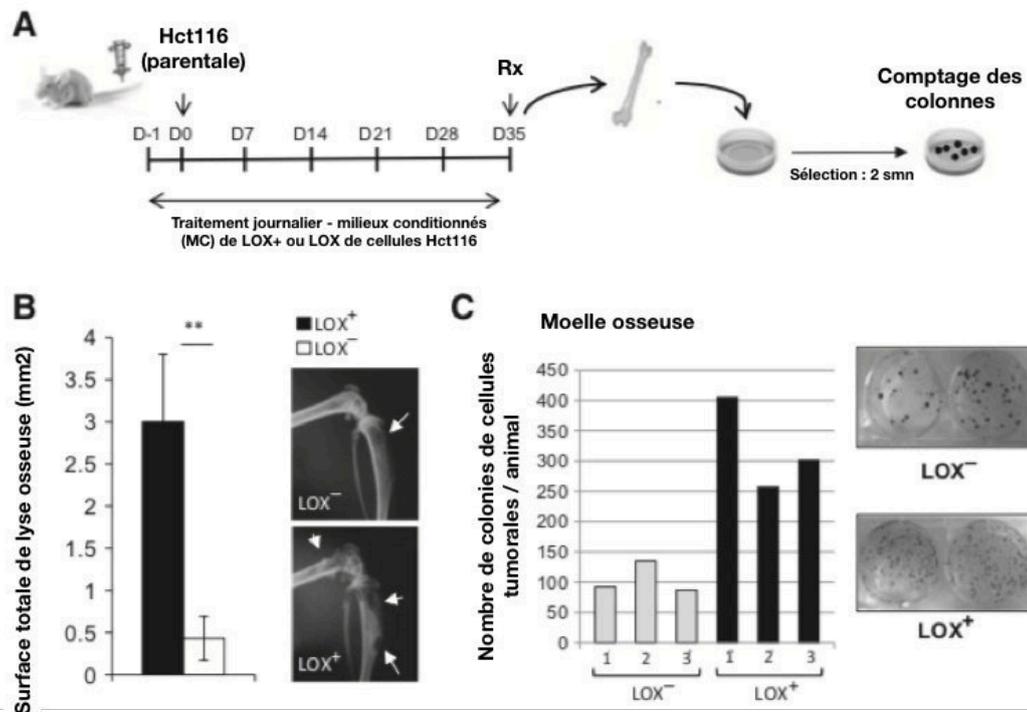


Figure 33: LOX sécrétée par les cellules tumorales favorise l'ostéolyse et la croissance des cellules tumorales dans la moelle osseuse

A, représentation schématique du protocole expérimental. Les cellules Hct116 parentales ont été inoculées par voie intra-artérielle dans des souris BALB/c nude. De j-1 à j-35, les animaux ont également été injectés quotidiennement en intra-péritonéal avec le milieu conditionné provenant de cellules Hct116 LOX- ou LOX+. Les souris ont été analysées par radiographie (RX) chaque semaine, puis la moelle osseuse a été collectée pour des dosages de colonies de cellules tumorales. *B*, quantification des lésions ostéolytiques (mm²) sur les radiographies. Encart, radiographies représentatives des membres postérieurs présentant des lésions ostéolytiques (flèches) provenant d'animaux traités avec le milieu conditionné de cellules Hct116 LOX- ou LOX+. *C*, graphiques montrant le nombre total de colonies de cellules tumorales formées dans la moelle osseuse de chaque souris traitée avec le milieu conditionné LOX- ou LOX+. Des images représentatives des colonies de cellules tumorales sont présentées pour chaque groupe.

Nous avons mis en évidence que LOX sécrétée par les cellules de cancer du côlon perturbe l'équilibre entre la résorption osseuse et la formation osseuse, en activant la différenciation des ostéoclastes et en inhibant les ostéoblastes. En effet, LOX agit sur l'ostéoclastogénèse en induisant une production d'IL-6 par les cellules tumorales (fig.34).

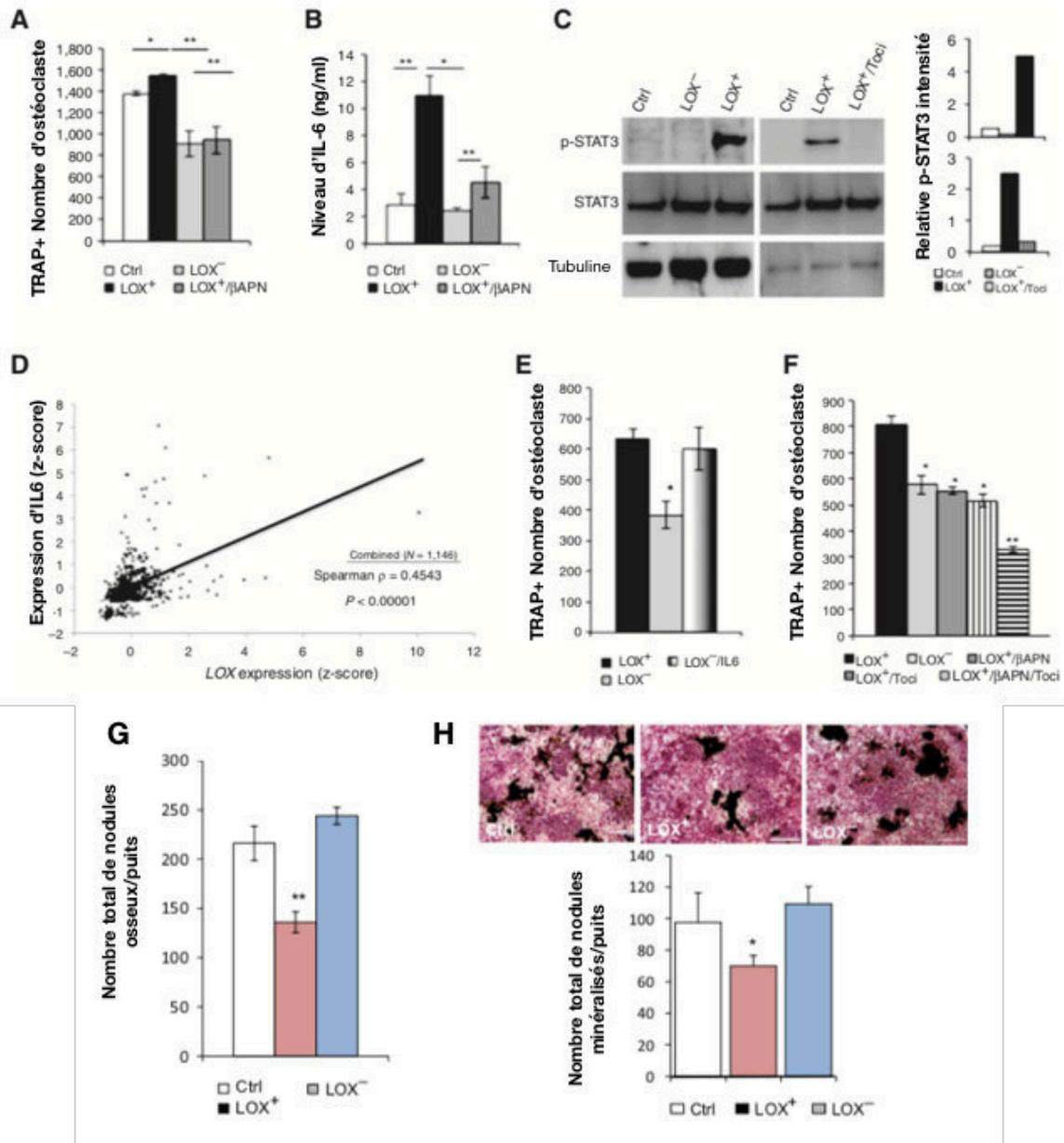


Figure 34: LOX stimule l'ostéoclastogénèse et inhibe l'ostéoblastogénèse

A, Différenciation ostéoclastique *in vitro* de cellules de moelle osseuse murine traitées avec du M-CSF + RANKL en combinaison avec le milieu conditionné provenant de cellules Hct116 Ctrl, LOX⁻ ou LOX⁺. Le milieu conditionné provenant de cellules Hct116 LOX⁺ traitées au βAPN a également été testé. Les ostéoclastes matures, multinucléées (plus de trois noyaux) et positives pour le marqueur TRAP, ont été quantifiées. B, mesure ELISA de IL6 dans le milieu conditionné de cellules Hct116 Ctrl, LOX⁻, LOX⁺ ou LOX⁺/βAPN. C, analyse par immunoblot de STAT3 phosphorylée dans des cellules Hct116 Ctrl, LOX⁻ et LOX⁺, traitées ou non au tocilizumab (anticorps se liant au récepteur de l'IL6 et inhibant son action). Les graphiques montrent les intensités de STAT3 phosphorylée par rapport au total de STAT3. La tubuline a été utilisée comme témoin. D, analyse de corrélation des intensités d'expression de LOX et IL6 à partir de 7 bases de données de cancer du côlon (1 146 patients). E, effet de l'IL6 exogène (10 ng/mL) sur l'ostéoclastogénèse induite par M-CSF + RANKL en association avec le milieu conditionné de cellules Hct116 LOX⁻ ou LOX⁺. F, effets du tocilizumab (100 ng / mL) et du βAPN (350 μM) sur la différenciation des ostéoclastes. G et H, différenciation *in vitro* de cellules primaires de calvaria de souris cultivées dans des conditions ostéogéniques avec un milieu conditionné provenant de cellules Hct116 Ctrl, LOX⁻ et LOX⁺. Les nodules osseux minéralisés (colorés en noir avec une coloration de Von Kossa) ont été comptés en microscopie optique.

Nous nous sommes finalement intéressés aux étapes précoces de la dissémination métastatique, en montrant que LOX sécrétée par les cellules tumorales du colon favorisait la formation de micrométastases en augmentant l'adhésion des cellules tumorales au collagène I présent dans l'os (fig.35).

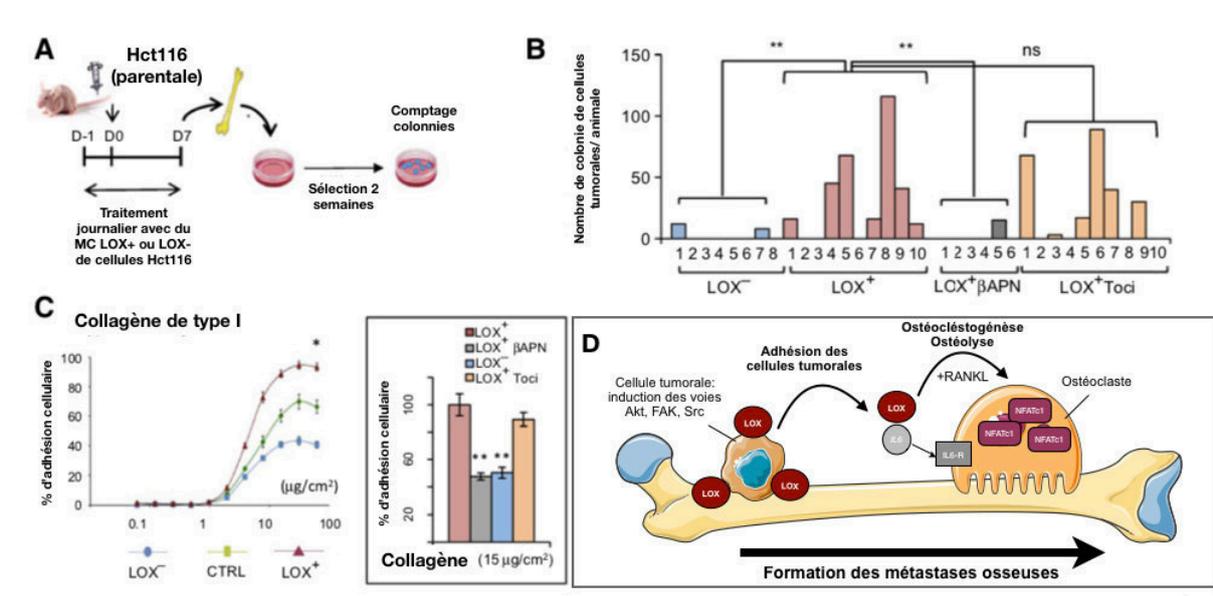


Figure 35: La libération systémique de LOX sécrétée favorise la colonisation de la moelle osseuse par les cellules de cancer colorectal

A, représentation schématique du protocole expérimental. Des cellules Hct116 parentales ont été inoculées à des souris nude par voie intra-artérielle, puis les animaux ont été traités avec du milieu conditionné de cellules Hct116 LOX⁻ ou LOX⁺ (traitées ou non traitées avec le βAPN ou le tocilizumab). *B*, graphiques montrant pour chaque groupe le nombre moyen de colonies de cellules tumorales récupérées de la moelle osseuse. Chaque barre correspond à une seule souris. *C*, adhésion des cellules Hct116Ctrl, LOX⁻ et LOX⁺ à des concentrations croissantes de collagène. Encadré : modèle proposé pour expliquer l'action de LOX dans la formation des métastases osseuses.

L'ensemble de nos résultats montre que LOX favorise la dissémination des cellules du cancer colorectal dans la moelle osseuse et révèle un nouveau mécanisme de perturbation de l'homéostasie osseuse via la production d'IL6 induite par LOX dans les cellules du cancer colorectal.

II. Perspectives de recherche

Les métastases osseuses représentent un problème fondamental en oncologie clinique. Les études actuelles, établissent que 90% de tous les patients qui sont décédés de tumeurs malignes avaient des métastases osseuses. Une fois que les cellules tumorales ont colonisé l'os, une réaction osseuse peut apparaître avec une nette augmentation du remodelage osseux, en particulier la résorption. Celle-ci survient chez 93% des patients atteints de métastases osseuses et conduit à des événements tels que des fractures pathologiques, des compressions nerveuses et des douleurs osseuses (Bartl et Bartl 2019). A ce stade de la maladie, les patients sont traités de manière palliative. En effet, actuellement, aucun traitement curatif ciblant les métastases osseuses n'est disponible. Les cliniciens ont recours à des traitements visant à limiter la perturbation de l'homéostasie osseuse tel que le biphosphonate ou le dénosumab qui possèdent à long terme une toxicité importante (Z. Wu et Lu 2018). De plus, il est actuellement admis que la suppression de la tumeur primitive par traitement systémique pour le cancer du sein à un stade avancé présentant des métastases, n'influçait pas la survie globale des patients. Enfin, une apparition de lésions osseuses est également observée même lors d'une prise en charge précoce des patients. C'est pourquoi il est primordial de comprendre les étapes précoces de formation des métastases osseuses, comprendre les mécanismes moléculaires, dans le but de développer des thérapies ciblées contre les micrométastases afin de ralentir leurs développements et d'améliorer le pronostic vital des patients.

Il est actuellement compliqué d'anticiper le développement des métastases osseuses. Les techniques de dosage des cellules tumorales circulantes (CTC) et cellules tumorales disséminées (DTC) représentent une réelle avancée pour examiner le processus métastatique chez les patients et étudier les processus moléculaires (génomiques, transcriptomiques et protéomiques) associés à la propagation des cellules tumorales dans le corps. Mais il existe encore des limites cliniques à leur utilisation. En effet la détection de DTC est hautement invasive pour les patients puisqu'elle nécessite une ponction lombaire, et ne peut donc pas être proposée en routine. En ce qui concerne la détection de CTC, elle est techniquement réalisable par le biais d'une simple prise de sang mais demande une amélioration des stratégies de détection/quantification. Deux catégories d'isolement de ces cellules existent

actuellement et reposent sur l'immunoaffinité ou sur les propriétés biophysiques des cellules. Du fait du faible nombre de CTC et de leur hétérogénéité, le risque de faux négatifs est important (Bidard et al. 2009; Magbanua et al. 2019). A l'heure actuelle, un approfondissement des connaissances en ce qui concerne les acteurs du développement des métastases osseuses est donc encore nécessaire.

Les connaissances actuelles sur la formation des métastases osseuses ont été récapitulées dans une revue rédigée pendant ma thèse (Bernard et al. 2019) (Annexe). Ces métastases sont dûes entre autre au fait que certaines tumeurs présentent une affinité particulière pour métastaser à l'os, ce que l'on définit comme l'ostéotropisme. Les tumeurs à fort ostéotropisme incluent les tumeurs du sein, de la prostate, du poumon, des reins et de la thyroïde. Nous avons montré une implication de LOX dans la formation de métastases osseuse de cancer colorectal. Une étude récente a de plus montré que LOX participe à la formation de lésions osseuses pré-métastatiques dans le cancer du sein (Cox et al. 2015). Il a également été démontré que LOXL2 intervient dans les phénomènes de tumorigénèse, et dans la formation de métastases (L. Wu et Zhu 2015). Son expression, comme celle de LOX, est corrélée avec le potentiel invasif et la diminution de l'espérance de vie chez les patients atteints de cancer du sein (Ahn et al. 2012). Il a été mis en évidence que la réticulation de la matrice extracellulaire via l'enzyme LOXL2, favorisait le développement de métastases (Barker et al. 2011). Cependant, son implication dans la formation de métastases osseuse reste très peu étudiée.

L'analyse de l'expression de LOX ou de LOXL2 dans des cohortes de patientes atteintes de cancer du sein a montré qu'une expression élevée de ces protéines était corrélée à une diminution de la survie globale, et à la rechute métastatique dans les cancers hormono-indépendants (fig.36; Erlor et al. 2006; Barker et al. 2011).

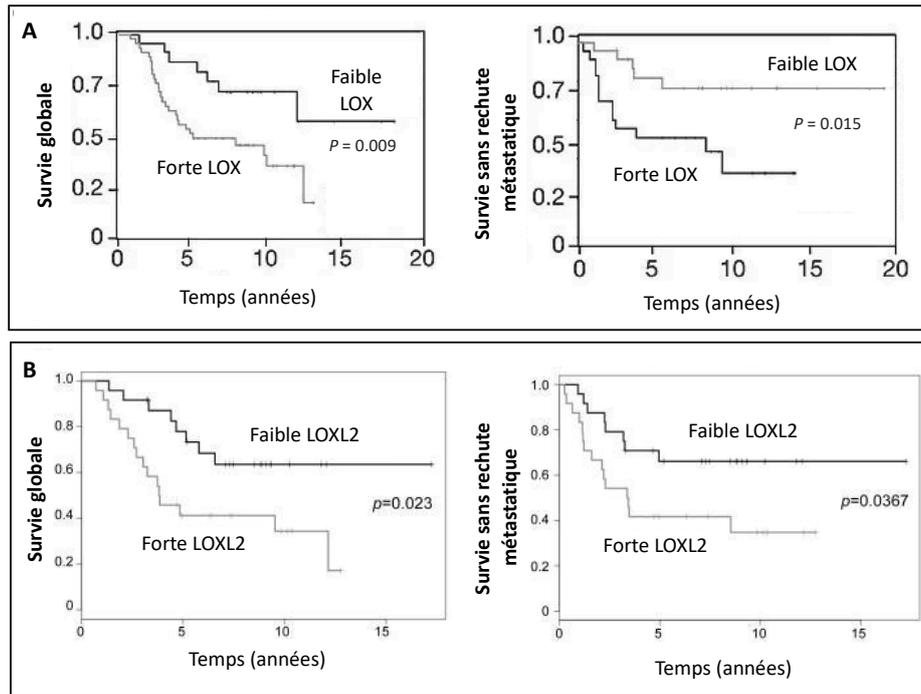


Figure 36: Expression de LOX/LOXL2 et issue clinique

Les analyses de Kaplan-Meier de la survie globale et de la survie sans rechute métastatique pour LOX (A) ou LOXL2 (B) de patients atteints de cancer du sein (tiré respectivement de Erler et al. 2006; Barker et al. 2011)

Dans ce contexte, mes travaux de thèse avaient pour objectif de clarifier le rôle LOX et de LOXL2 dans les métastases osseuses de cancer du sein, et plus particulièrement dans l’ancrage précoce des cellules tumorales de cancer du sein dans l’os. Je devais donc répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que LOXL2 possède les mêmes propriétés à favoriser le développement de métastases osseuses que LOX ?

A l’heure actuelle, aucune étude n’a été faite en parallèle sur le rôle de LOX et de LOXL2. Le but de cette thèse était donc de travailler en parallèle sur ces deux protéines afin de pouvoir conclure sur leur rôle similaire ou non dans la formation de métastases osseuses. Pour ce faire, toutes les analyses de caractérisations des lignées cellulaires *in vitro*, ainsi que les tests *in vivo* devant élucider leur implication dans les métastases osseuses ont été faits en parallèle sur les lignées cellulaires dont l’expression de LOX ou LOXL2 a été modulée.

- Est-ce que LOX et LOXL2 favorisent l’ancrage des cellules tumorales de cancer du sein dans l’os ?

Nous avons comme hypothèse, que LOX et LOXL2 pouvaient permettre aux cellules tumorales disséminées (DTCs) de coloniser la moelle osseuse. La présence de DTCs constitue un facteur de mauvais pronostic, puisqu'elles peuvent à plus ou moins long terme évoluer en métastases difficilement guérissables (Patel et al. 2011). Les études actuelles permettent de penser que les DTCs se logent dans les niches endostéales de la moelle osseuse. Celles-ci sont principalement constituées d'ostéoblastes et de cellules mésenchymateuses souches et elles ont pour fonction principale de se loger dans la niche endostéale et de maintenir les cellules souches hématopoïétiques en quiescence. Une de nos hypothèses ici est que les DTCs pourraient rentrer en compétition avec les cellules souches hématopoïétiques pour se loger dans les niches endostéales puis entrer en quiescence afin d'échapper aux traitements anti-cancéreux ciblant la prolifération tumorale (Shiozawa et al. 2011). Une autre hypothèse serait que les cellules surexprimant LOX ou LOXL2 seraient capables d'interagir avec les composants osseux dans le but de favoriser l'ancrage des cellules tumorales dans l'os. Pour ce faire, nous avons développé des modèles de cellules tumorales mammaires exprimant des niveaux de LOX et LOXL2 plus ou moins élevé, susceptibles de nous permettre de répondre à notre problématique.

Pour répondre à ces questions, j'ai caractérisé l'effet de l'inhibition ou de la surexpression de LOX et de LOXL2 *in vitro*, afin de savoir si ceci impactait les fonctions des cellules tumorales telles que la prolifération, la migration et l'adhésion aux composants de la matrice ou aux cellules qui composent la niche endostéale ainsi que leur capacité de survie.

Dans un second temps, j'ai étudié l'impact de ces modulations sur l'ancrage précoce des cellules tumorales dans l'os et sur le développement de métastases *in vivo*. A ce stade, nous avons mis en évidence un rôle différent de LOX et de LOXL2 en ce qui concerne l'ancrage précoce des cellules tumorales dans l'os et le développement de métastases, avec un effet pro-métastatique de LOX non retrouvé pour LOXL2. Comme ces résultats allaient à l'encontre de la littérature, j'ai multiplié ces études dans différents modèles cellulaires. Ceci s'est fait au détriment des études concernant le rôle des LOXs dans la compétition entre cellules tumorales et CSH. Cependant, les données obtenues au cours de ces trois années, renforcent les données publiées sur le rôle pro-métastatique de LOX et apportent un éclairage non attendu sur LOXL2 dont la fonction n'est peut-être pas aussi clairement définie que ce que laisse entendre la littérature.

Chapitre III: Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

A. Études in vitro

1. Culture cellulaire

Les cellules ont été cultivées en milieu (Gibco) 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 4.

Cellules	Milieu	SVF % (V/V)	P/S % (V/V)
MCF-7 (ATCC^R HTB-22TM) (Lignée humaine de cancer du sein) Epithéliale, effusion pleurale dérivée d'un site métastatique d'adénocarcinome mammaire	RPMI-1640	10	1
T47D (ATCC^R HTB-133) (Lignée humaine de cancer du sein) Epithéliale, dérivée d'un site métastatique d'adénocarcinome mammaire (effusion pleurale)	RPMI-1640	10	1
B02 (Lignée humaine ostéostropique, sous clone des MDA-MB-231)	DMEM 1.5 g/l glucose	10	1
MDA-MB-231 (ATCC^R HTB-26) (Lignée humaine de cancer du sein) Epithéliale, effusion pleurale dérivée d'un site métastatique d'adénocarcinome mammaire	DMEM 1.5 g/l glucose	10	1
Hs-578T (ATCC^R HTB-126) (Lignée humaine de cancer du sein)	RPMI-1640	10	1
MC3T3-E1 (ATCC^R CRL-2594) (Lignée de pré-ostéoblastes murins, issue de calvaria)	α -MEM +/+	10	1
Cellules Souches Mésenchymateuses (cellules humaines issues de déchet opératoire de la hanche)	α -MEM +/+	20	1
GP2-293 Lignée cellulaire transcomplémentante Dérivée des HEK-293 (Clontech)	DMEM 4.5 g/l glucose	10	1
HEK-293T (Life Technologies)	DMEM 4.5 g/l glucose	10	1

Tableau 4: Caractéristiques des lignées cellulaires et leur milieu de culture

Toutes les lignées cellulaires sont testées en routine pour la détection de mycoplasme par mesure de l'intensité de la bioluminescence dans le surnageant de culture (MycoAlert Plus, Mycoplasma Detection Kit, LONZA).

2. Génération des lignées Hs-578T, MDA-MB-231 et B02 dont l'expression de LOX ou LOXL2 est inhibée, par stratégie lentivirale shERWOOD-UltramiR shRNA

La lignée MDA-MB-231 est de type claudin-low, triple négatif, elle métastase à divers sites après inoculation chez la souris, notamment au poumon, et plus faiblement à l'os.

La lignée B02 est de type basal, triple négatif. C'est un sous-clone de la lignée MDA-MB-231, obtenu après isolement par pression de sélection chez la souris. Cette lignée exprime des gènes qui lui confèrent des propriétés ostéotropiques et d'ostéomimétisme. Elle est utilisée dans le modèle expérimental murin de métastases osseuses du laboratoire, car c'est un modèle qui forme des métastases osseuses.

La lignée Hs-578T est quant à elle également de type claudin-low et triple-négatif, elle possède un phénotype hybride de cellules mésenchymateuses (CD44+/CD24-) et épithéliales (CD44-/CD24+). Elle présente un phénotype migratoire/invasif mais prolifère très lentement. De manière intéressante, ces cellules expriment des caractères de cellules souches cancéreuses (Croset et al. 2018) et forme des mammosphères en plus forte proportion que les deux précédentes lignées qui possèdent une structure beaucoup plus compacte.

Afin d'étudier l'effet de la LOX et de la LOXL2 sur les caractères phénotypiques liés à la dissémination tumorale et au développement de métastases osseuses, nous avons analysé le niveau d'expression de ces molécules. Les analyses en RT-qPCR et par western blot, reportées en figure 38 montrent une forte expression de LOX et LOXL2 dans ces lignées. Nous avons donc inhibé l'expression de LOX et LOXL2 dans les cellules par la stratégie lentivirale de l'ARN interférent short hairpin (sh), shERWOOD-UltramiR shRNA (transOMIC technologies Inc, AL, USA).

a) Génération des lignées cellulaires exprimant la luciférase2

Afin de mener des études de bioluminescence *in vivo*, les cellules ont préalablement été transduites par un vecteur rétroviral codant pour la luciférase2 (Luc2).

Les lignées cellulaires B02, MDA-MB-231, Hs-578T et MCF-7 ont été transduites en utilisant le système d'expression rétroviral « pantropic retroviral expression packaging system (Clontech Laboratories, Takara Bio Company, CA USA) ».

Brièvement, la lignée cellulaire GP2-293 qui exprime de manière stable les gènes gag et pol, est transfectée avec le plasmide pVSV-G et le vecteur rétroviral pmiR-Vec –Luciférase2 (Croset et al. 2018). Les cellules GP2-293 sontensemencées dans des boîtes de 10 cm et sont transfectées lorsqu'elles atteignent 70-80% de confluence, en utilisant le kit CAPHOS, Calcium Phosphate Transfection Kit (*Sigma-Aldrich*). Les cellules sont incubées 12h, dans 5 ml de milieu DMEM 4.5 g/l glucose, 10% SVF, 1% P/S (milieu complet) contenant les plasmides et les agents de transfection, CaCl₂ et HEPES/phosphate de sodium. Le milieu de transfection est retiré et les cellules sont incubées dans du milieu complet pendant 72h. Ce surnageant de culture contenant les particules infectieuses est prélevé, centrifugé (2500g, 10 min., +4°C) et filtré sur membranes de nitrocellulose de 0.45 µM. Pour transduire les lignées cellulaires de cancer du sein, celles-ci sont cultivées en P10 cm, dans leur milieu respectif complet. Lorsque la confluence atteint 60-70%, les cellules sont incubées dans 5ml de mélange de milieu complet et de particules rétrovirales (50:50 V/V), contenant 10 µg/ml de polybrene (*Sigma-Aldrich*). Après 24 h, les cellules sont trypsinées et cultivées en présence de l'antibiotique de sélection blasticidine (10 µg/ml, Invitrogen) jusqu'à la mort cellulaire complète des lignées non-transduites, cultivées en parallèle.

b) Génération des lignées cellulaires de cancer du sein dont l'expression de LOX ou LOXL2 est inhibée

Les cellules de cancer du sein qui expriment Luc2, B02-Luc2, Hs578T-Luc2 et MDA-MB-231-Luc2 sont transduites dans le but d'inhiber de façon stable la LOX ou LOXL2 en utilisant le Kit « Lenti-X™ Lentiviral Expression System » (Clontech Laboratories, Inc, Takara Bio Company, USA).

Les cellules HEK-293T (ThermoFisher Scientific) sontensemencées en P6 cm (2.5 X10⁵ cellules/puit) dans du milieu DMEM 4.5 g/l glucose, 10% SVF, 1% P/S et 24 h après lorsque la

confluence est de 60-90%, elles sont utilisées pour la transfection. Pour chaque transfection, on prépare 2 tubes eppendorf contenant:

Tube 1		Tube 2	
Xfect Reaction buffer QSP	250µl	Xfect Reaction buffer	247 µl
LTX-HTX-Packaging Mix	15 µl	Xfect Polymer	3 µl
Lentivector Lox/LoxL2)	3 µg		

Mélange des vecteurs et de l'agent de transfection, préparé pour la transfection des cellules HEK-293T.

Après agitation, on ajoute la solution du tube2, contenant le polymère et l'agent de transfection, dans le tube1 contenant les plasmides. On agite à vitesse maximum pendant 10 sec. On laisse ensuite les complexes de nanoparticules se former pendant 10 min à température ambiante. On ajoute 1,5 ml de milieu DMEM 4.5 g/l glucose, 1% P/S, 10% de SVF (Tetracycline System Approved FBS, TakaraBio, cat. 631105) sur les cellules HEK-293T.

Les cultures sont placées dans l'incubateur pendant 6-10 h et le milieu de transfection est remplacé par 2 ml de milieu complet. A la suite de ce temps d'incubation, les cellules sont cultivées pendant 48 h, puis le surnageant contenant les particules infectieuses est récupéré, centrifugé à 2500g, 10 min à 4°C, puis filtré sur membrane d'acétate de cellulose 0.45 µM.

Les lignées B02-Luc2, Hs-578T-Luc2 et MDA-MB-231-Luc2 sont mélangées, à raison de 10⁵ cellules dans 0.5 ml de milieu complet, à 0.5 ml de particules infectieuses etensemencées dans des boites de culture 12 puits dont le fond est recouvert de rétronectine (Takara Bio, Cat. T100A).

Au préalable, les puits ont été incubés avec 0.5 ml de rétronectine (50 µg/ml dans le PBS 1X) pendant 2h à température ambiante, puis les sites aspécifiques de la protéine ont été bloqués par une solution de BSA 3% dans le PBS 1X et rincés par du PBS 1X avant l'ensemencement des cellules.

Après 48 à 72 h d'incubation, les cellules sont cultivées dans du milieu complet jusqu'à confluence, puis détachées etensemencées en boites de 10 cm dans du milieu complet contenant l'antibiotique de sélection puromycine (2 ug/ml).

3. Génération des lignées B02-Luc2 et MCF-7Luc2 surexprimant LOX ou LOXL2

Les cellules de cancer du sein qui expriment Luc2, B02-Luc2 et MCF-7Luc2 ont été transduites afin d'exprimer fortement LOX et LOXL2. Concernant les cellules MCF-7, les données de la figure 38 montre une expression très faible des transcrits, les protéines étant indétectables par western blot, ceci en accord avec de précédents travaux (Kirschmann DA, Cancer Res., 62, 2002). En ce qui concerne la lignée B02-Luc2, les niveaux d'expression des 2 molécules étant peu élevés, nous avons choisi d'augmenter leur expression. Il a donc été nécessaire d'utiliser les lignées contrôles (B02-Luc2-Ctrl-Lox et B02-Luc2-Ctrl-LoxL2) dont l'expression de LOX ou LOXL2 était réprimée. Nous avons alors utilisé ces lignées cellulaires déplétées en LOX et LOXL2 par la stratégie lentivirale shERWOOD-UltramiR shRNA, afin de générer des lignées contrôles qui ont été transduites par le plasmide PQCXIN-Ctrl. Les lignées B02-Luc2-sh-Ctrl ont alors été transduites avec les vecteurs rétroviraux de surexpression, selon le tableau 5.

Les lignées cellulaires MCF-7Luc2 et B02-Luc2 ont été transduites en utilisant le système d'expression rétroviral «pantropic retroviral expression packaging system (Clontech Laboratories, Takara Bio Company) ».

La lignée cellulaire transcomplémentante, GP2-293 qui exprime de manière stable les gènes gag et pol, est transfectée avec le plasmide pVSV-G et l'un des vecteurs rétroviraux pQCXIN-Ctrl, ou pQCXN-Lox ou pQCXN-LoxL2. Les cellules GP2-293 sontensemencées dans des boîtes de 10 cm et sont transfectées lorsqu'elles atteignent une confluence de 70-80%, en utilisant le kit CAPHOS, Calcium Phosphate Transfection Kit (*Sigma-Aldrich*).

Les cellules sont incubées 12 h, dans 5 ml de milieu DMEM 4.5 g/l glucose, 10% SVF, 1% P/S (milieu complet) contenant les plasmides et les agents de transfection, CaCl₂ et HEPES/phosphate de sodium. Le milieu de transfection est retiré et les cellules sont incubées dans du milieu complet pendant 72 h. Le surnageant de culture contenant les particules infectieuses est prélevé, centrifugé (2500g, 10 min, +4°C) et filtré sur membrane de nitrocellulose de 0.45 µM.

Pour transduire les lignées cellulaires de cancer du sein, celles-ci sont cultivées en P10cm, dans leur milieu respectif complet. Lorsque la confluence atteint 60-70%, les cellules sont incubées dans 5 ml d'un mélange de milieu complet et de particules rétrovirales (50:50 V/V), contenant

8 µg/ml de polybrene (*Sigma-Aldrich*), pendant 12 h et remis dans leur milieu complet pendant 48 h. Les cellules sont trypsinées et cultivées en présence de l'antibiotique de sélection néomycine (*Sigma*) à 800 µg/ml, jusqu'à la mort cellulaire complète des lignées non-transduites.

Lignées cellulaires transduites	Plasmides		
	PQCXIN-Ctrl	PQCXIN-Lox	PQCXIN-LoxL2
B02Luc2 shLox	B02Luc2-CtrlLox		
B02Luc2 shLoxL2	B02Luc2-CtrlLoxL2		
B02Luc2 Ctrl shLox		B02Luc2-HighLox	
B02Luc2 Ctrl shLoxL2			B02Luc2-HighLoxL2

Tableau 5: Génération des lignées B02-Luc2 qui expriment fortement la LOX ou la LOXL2 et de leur lignée contrôle

La lignée MCF-7Luc2 a été transduite en utilisant les plasmides rétroviraux PQCXIN-Lox, PQCXIN-LoxL2 et PQCXIN-Ctrl.

4. Construction des vecteurs plasmidiques

a) Plasmides lentiviraux d'inhibition d'expression : pZIP-hCMV-UltramiRshRNA

L'inhibition stable d'expression de LOX et LOXL2 a été obtenue par transduction des cellules avec les plasmides lentiviraux shRNA hairpin ciblant LOX ou LOXL2 et également avec un sh universel non-ciblant comme control, dit « control-négatif ». La construction des vecteurs pZIP-hCMV-UltramiRshRNA (Transomic, Technologies Inc.) est basée sur une stratégie de « RNA interférence » avec la séquence du shRNA adaptée pour la biosynthèse de l'ARN interférant au niveau des clivages Dicer/Drosha, placée en aval d'un promoteur fort CMV. Ceci génère alors un brin mature guide pris en charge par le complexe RISC (RNA-induced silencing

complex) et une séquence sens qui s'hybride efficacement et spécifiquement sur le mRNA cible. Ces vecteurs ont également un IRES (internal ribosomal entry site) dans leur séquence, ce qui permet la transcription simultanée de la résistance antibiotique, ici la puromycine, et de la protéine fluorescente ZsGreen (fig.37).

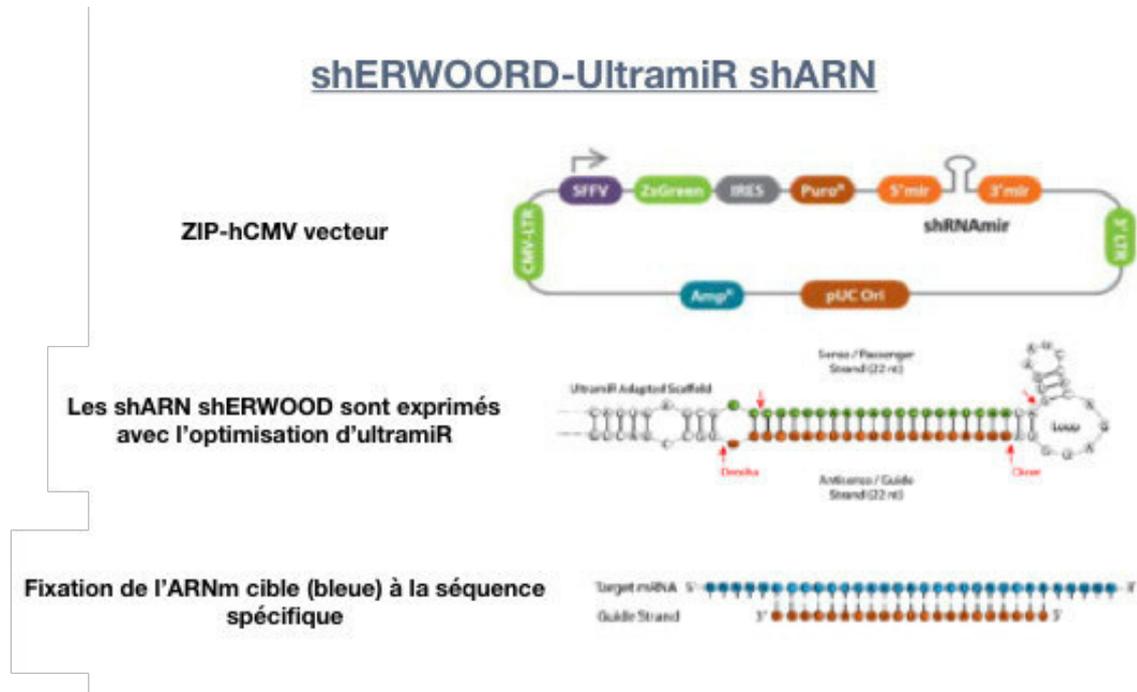


Figure 37: Les vecteurs pZIP-hCMV-UltramiRshRNA utilisés dans la stratégie d'ARN interférant (transOMIC technologies Inc.)

Les séquences de trois vecteurs ayant trois différentes séquences sh dirigées contre LOX et LOXL2 ont été prédites par l'algorithme shERWOOD développé par le laboratoire du Dr Gregory Hannonn's (Cold Spring Harbor Laboratory, USA). Les séquences des plasmides sont indiquées dans les tableaux ci-dessous (tableau 6).

	Gène:	LOXL2
ULTRA-3322481	Séquence:	TGCTGTTGACAGTGAGCGAACCTGCTGAACCTCAATGGCAT AGTGAAGCCACAGATGTATGCCATTGAGGTTTCAGCAGGTCT GCCTACTGCCTCGGA
	3':	TGCCATTGAGGTTTCAGCAGGTC
	5':	AACCTGCTGAACCTCAATGGCA
	boucle:	TAGTGAAGCCACAGATGTA

ULTRA- 3322482	Gène:	LOXL2
	Séquence:	TGCTGTTGACAGTGAGCGAACTACCTGTTCCAGGTTGTTAT AGTGAAGCCACAGATGTATAACAACCTGGAACAGGTAGTCT GCCTACTGCCTCGGA
	3':	TAACAACCTGGAACAGGTAGTC
	5':	AACTACCTGTTCCAGGTTGTTA
	boucle:	TAGTGAAGCCACAGATGTA
ULTRA- 3322485	Gène:	LOXL2
	Séquence:	TGCTGTTGACAGTGAGCGCTTCGTTGATCAACCAGATAGAT AGTGAAGCCACAGATGTATCTATCTGGTTGATCAACGAATT GCCTACTGCCTCGGA
	3':	TCTATCTGGTTGATCAACGAAT
	5':	CTTCGTTGATCAACCAGATAGA
	boucle:	TAGTGAAGCCACAGATGTA
ULTRA- NT#4	Gène:	LOXL2
	Séquence:	TGCTGTTGACAGTGAGCGaaggcagaagtatgcaaagcatT AGTGAAGCCACAGATGTAatgctttgcatacttctgcctgT GCCTACTGCCTCGGA
	3':	atgctttgcatacttctgcctg
	5':	aaggcagaagtatgcaaagcat
	boucle:	TAGTGAAGCCACAGATGTA

ULTRA- 3322450	Gene:	LOX
	Sequence:	TGCTGTTGACAGTGAGCGAAGGGCAGATGTCAGAGATTATT AGTGAAGCCACAGATGTAATAATCTCTGACATCTGCCCTGT GCCTACTGCCTCGGA
	3':	ATAATCTCTGACATCTGCCCTG
	5':	AAGGGCAGATGTCAGAGATTAT
	Loop:	TAGTGAAGCCACAGATGTA

ULTRA-3322451	Gene:	LOX
	Sequence:	TGCTGTTGACAGTGAGCGATGGATTGATATTACAGATGTAT AGTGAAGCCACAGATGTATACATCTGTAATATCAATCCACT GCCTACTGCCTCGGA
	3':	TACATCTGTAATATCAATCCAC
	5':	ATGGATTGATATTACAGATGTA
	Loop:	TAGTGAAGCCACAGATGTA
ULTRA-3322452	Gene:	LOX
	Sequence:	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCTGGCTGTTATGATACCTAAT AGTGAAGCCACAGATGTATTAGGTATCATAACAGCCAGGAT GCCTACTGCCTCGGA
	3':	TTAGGTATCATAACAGCCAGGA
	5':	CCCTGGCTGTTATGATACCTAA
	Loop:	TAGTGAAGCCACAGATGTA
ULTRA-NT#4	Gene:	LOX
	Sequence:	TGCTGTTGACAGTGAGCGaaggcagaagtatgcaaagcatT AGTGAAGCCACAGATGTAatgctttgcatacttctgcctgT GCCTACTGCCTCGGA
	3':	atgctttgcatacttctgcctg
	5':	aaggcagaagtatgcaaagcat
	Loop:	TAGTGAAGCCACAGATGTA

Tableau 6: séquence des plasmides pZIP-hCMV-UltramiRshRNA utilisés pour inhiber l'expression de LOX et LOXL2 dans les lignées cellulaires

(1) Amplification et purification des plasmides

Les plasmides nous proviennent de la société transOMIC, sous forme de culture bactérienne incluses dans le glycérol dilué dans du LB-Browth, que nous stockons à -80°C.

L'amplification de ces plasmides se fait par inoculation de 10 ml de milieu LB-Browth contenant l'antibiotique de sélection procaryote, ampicilline (100 µg/ml), par 10-20 µl de culture stock en glycérol. La suspension bactérienne est incubée à 37°C jusqu'à ce que le milieu soit trouble, puis ajoutée à 250 ml de milieu LB- Browth/ampicilline et cultivée sous agitation à 37°C.

L'ADN plasmidique des bactéries est alors isolé et purifié suivant le protocole du kit de MaxiPrep de Macherey-Nagel (Duren, Allemagne) : Endotoxin-free plasmid DNA purification (NucleoBond® Xtra Midi EF / Maxi EF).

Brièvement, la culture bactérienne est centrifugée à 5000g pendant 10 min. Le culot bactérien est ensuite lysé à l'aide de tampon Buffer LYS-EF, suivi par la neutralisation du milieu qui est alors placé sur glace. Le lysat est filtré (NucleoBond Xtra Column Filter) et récupéré pour être purifié sur une colonne de silice (NucleoBond Xtra Column) lavée séquentiellement par plusieurs tampons (Buffer ENDO-EF, Buffer WASH-EF).

L'ADN plasmidique est ensuite élué de la colonne par 15 ml de tampon d'éluion (Elution Buffer ELU-EF) et précipité par 10.5 ml d'isopropanol. Après précipitation, le mélange est placé dans une seringue de 30 ml équipée d'un filtre (NucleoBond Finalizer) qui retient l'ADN plasmidique précipité. Le filtre est lavé à l'éthanol 70% (endotoxin-free 70 % EtOH), avant éluion du plasmide par 1 ml d'H₂O (H₂O-EF).

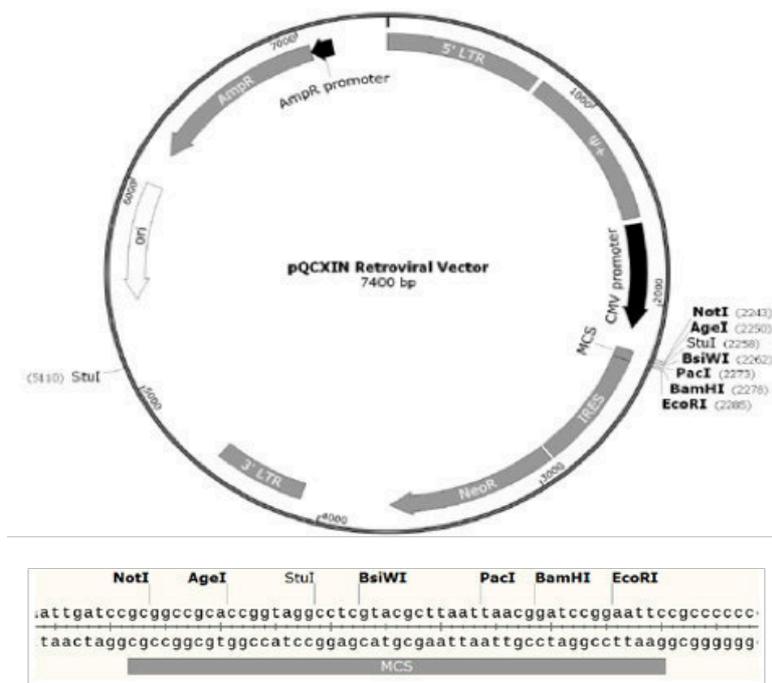
La concentration en ADN a été mesurée par absorbance à 260 nm et la pureté a été évaluée par le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm.

b) Plasmide rétroviraux de surexpression

Pour exprimer la LOX et la LOXL2 dans les cellules de cancer du sein, nous avons utilisé le vecteur rétroviral pQCXIN (Clontech) qui est un vecteur bi-cistronic permettant de co-transcrire le gène d'intérêt et le gène de résistance eucaryote à la néomycine, via un IRES.

(1) pQCXIN-Lox

La première étape du clonage consiste à insérer la séquence de la LOX dans le site multiple de clonage (MCS) du plasmide par recombinaison homologue en utilisant le kit « In-Fusion HD Cloning Kit » (Clontech).



Localisation:

- 5' LTR (5' longue répétition terminale): 1-728
- Extension du packaging signal: 758-1567
- CMV promoteur: 1601-2132
- MCS: 2242-2290
- IRES (Site d'entrée de ribosome interne): 2292-2881
- NeoR (Gène résistant à la néomycine): 2895-3689
- 3'LTR (3' longue répétition terminale): 4106-3689
- Ori (Origine de réplication): 5419-6007
- AmpR (Gène résistant à l'ampiciline): 6178-7038
- AmpR promoteur: 7039-7143

Figure 38: Caractéristiques du plasmide rétroviral pQCXIN utilisé pour exprimer LOX, LOXL2 dans les lignées cellulaires de cancer du sein

Une première construction plasmidique a été obtenue par insertion dans pQCXIN (fig. 36), de la séquence codante de LOX (ORF Open Reading Frame) amplifiée par PCR à partir du vecteur de clonage pEN-Tmcs-LOX. Ce vecteur de 5264 pb contient en aval du promoteur TRE la séquence de Lox (-22 à +1298 bp) et d'un gène de résistance procaryote à la gentamycine.

La séquence insérée comporte 22 pb avant le codon d'initiation de la transcription ATG et 46 pb après le codon stop.

L'amplification par PCR a été obtenue avec le kit PrimeSTAR® Max DNA Polymerase selon le protocole du fournisseur (Takara Clontech cat RO45A) :

PrimeSTAR Max Premix (2X)	25 µl
Primer Forward* 10µM	1.5 µl
Primer Reverse* 10µM	1.5 µl
Template vector 50 ng/µl (pEN-Tmcs-LOX)	1 µl
H2O QSP 50 µl	21 µl

Mélange réactionnel pour l'amplification par PCR

(* : La séquence des primers est présentée dans le tableau 7)

Le programme de PCR est : 98°C 10 sec, 52°C 15 sec, 72°C 10 sec, Hold 4°C (35 Cycles).

10 µl de la réaction de PCR sont déposés sur gel d'agarose 1% pour vérifier la présence d'une seule bande de séquence comprise entre 1000 et 1500 pb (1321 pb) et les 40 µl restants sont purifiés en utilisant le kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Le produit PCR est élué de la colonne de silice par 70 µl d'H2O et dosé au biophotomètre (Eppendorf).

Pour l'insertion du produit PCR dans le plasmide pQCXIN par recombinaison homologue. Le plasmide est linéarisé par digestion BamH1/EcoR1 et purifié sur colonne de silice (PCR clean-up, gel extraction). Le kit « In-Fusion HD Cloning » permet l'insertion du produit de PCR grâce aux amorces de PCR utilisées pour l'amplification du gène qui sont complémentaires sur 15bp aux extrémités du vecteur. Le milieu réactionnel est :

5X In-Fusion HD Enzyme Premix	2 µl
Linearized pQCXIN	2.5 µl
Purified PCR Fragment	5.5 µl
Total Volume	10 µl

Milieu réactionnel pour l'insertion du produit PCR dans le site multiple de clonage de pQCXIN, par recombinaison homologue

Après 15 min d'incubation à 50°C, le milieu est placé sur glace et 1 µl est utilisé pour la transformation des bactéries Stellar (Clontech). 50 µl de bactéries sont incubées avec 1 µl de

la réaction de ligation pendant 30 min dans la glace, suivi d'un choc thermique de 45 sec à 42°C puis 2 min dans la glace et un ajout de 500 µl de milieu LB.

Après incubation sous agitation, les bactéries sont étalées sur un milieu gélosé LB supplémenté à 100 µg/ml d'ampicilline (LB-Ampi) pour la sélection des clones porteurs du gène de résistance.

Les colonies bactériennes résistantes sont ensemencées dans le LB-Ampi et après 24 h à 37°C sous agitation, les plasmides sont extraits en utilisant le Kit de MiniPrep « Nucleospin plasmid, Macherey-Nagel ». Ils sont ensuite mis en double digestion par les enzymes de restriction, BamH1/EcoR1 (ThermoFisher Scientific) et déposés sur gel d'agarose 1% pour la sélection des cultures bactériennes. L'une d'elles, positive pour l'insertion de la séquence LOX est remise en culture dans 250 ml de LB-Ampi pour extraire le plasmide par le kit de MaxiPrep, comme décrit ci-dessus (Endotoxin-free plasmid DNA purification, Macherey-Nagel).

Une seconde construction plasmidique a été obtenue par insertion dans pQCXIN, de l'ORF de LOX, amplifiée par PCR à partir des ARNm extraits des cellules Hs-578T qui expriment fortement LOX. Les ARN totaux sont extraits par le kit Nucleospin RNA (Macherey-Nagel) et utilisées comme matrice pour l'obtention d'ADNc (Acide Désoxyribonucléique) de LOX. L'ADNc est obtenue en utilisant le protocole standard du « PrimeScript High Fidelity RT-PCR » (Takara, cat R022A) qui comporte deux étapes successives : la synthèse de l'ADNc à partir d'ARN par la PrimeScript RTase, suivie de l'amplification du cDNA par la PrimeSTAR Max DNA Polymerase. Le milieu réactionnel : dNTP Mixture (10mM) 1 µl, Oligo dT Primer (2.5 µM) 1 µl, Template (total RNA 850 ng/µl) 8 µl, est incubé 5 min à 65°C.

On y ajoute alors le mélange suivant : 5X PrimeScript Buffer 4 µl, RNase Inhibitor (40U/ µl) 0.5 µl, PrimeScript RTase 0.5 µl, RNase free dH₂O 5 µl. Cette réaction se fait dans un ThermoCycler selon le programme : 10min à 30°C, 59min à 42°C, et 5min à 95°C. L'amplification par PCR est faite à partir de 14 µl de la réaction de reverse transcription précédente avec le mélange : PrimeStar Premix 2X 25 µl, Primer Forward (10µM) (tableau 7), 1.5 µl, Primer Reverse (10µM) (tableau 7), 1.5 µl, Template (RT reaction) 14 µl, d'H₂O 8 µl.

Le programme de température de la PCR est : 98°C 10 sec, 52°C 15 sec, 72°C 10 min, Hold 4°C (30 Cycles).

	Amorce Sens	Amorce Antisens
pQCXIN ForwBamH1LOX	CTTAATTAACggATCCggTCAAT CTggCAAAAgg	
pQCXIN REVECOR1LOX		ggggggggCggAATTCAgAACACC AggCACTgAT
pQCXIN ForwBamH1 LOXL2	CTTAATTAACggATCCAAGACAg ggATggAgAggCCT	
pQCXIN REVECOR1 LOXL2		ggggggggCggAATTCACgCAggC TTCTTACTgCgg

Tableau 7: Séquence des amorces Sens et Antisens utilisées pour la recombinaison homologue

Un aliquot de 10 µl de cette réaction est déposé sur gel d'agarose 1% pour vérifier la présence d'une seule bande de séquence comprise entre 1000 et 1500 pb (1321 pb) et les 40 µl restants sont purifiés en utilisant le kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Les étapes suivantes de clonage par recombinaison homologue en utilisant le kit In-fusion HD Cloning, puis les étapes de sélection des colonies bactériennes, purification et amplification par MaxiPrep ainsi que les vérifications par digestion par les enzymes de restriction BamH1/EcoR1, sont identiques aux étapes décrites précédemment.

(2) pQCXIN-LOXL2

La construction du vecteur plasmidique pQCXIN-LOXL2 utilisé pour l'expression de LOXL2 dans les lignées cellulaires B02-Luc2 et MCF-7Luc2 a été obtenue avec la même stratégie de clonage que ci-dessus, c'est à dire par insertion de l'ORF de LOXL2 dans pQCXIN (fig. 36).

L'ADNc a été obtenue par une réaction de reverse transcription à partir des ARNs polyA extraits de cellules Hs-578T qui expriment fortement LOXL2.

Les ARNs polyA ont été extraits de culots cellulaires par le kit NucleoTrap mRNA Mini (Macherey Nagel). Le culot cellulaire est dilué dans 600 µl de tampon RMO et agité vigoureusement au vortex avant d'être déposé sur un filtre (NucleoSpin Filter) et centrifugé à 11 000g, 1 min.

On ajoute ensuite 600 µl d'H₂O et 20µl d'oligo-dT couplés à des billes de latex, suivi d'une incubation à 68°C pendant 5 min puis d'une centrifugation. Ce culot est déposé sur une colonne (NucleoTrap Microfilter), centrifugé, et lavé avant élution par H₂O.

L'ADNc est obtenue en utilisant le protocole standard du « PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR » (Takara, Cat R022A), comme précédemment. L'amplification de l'ADNc par PCR dont les amorces sont indiquées dans le tableau 7, génère un produit PCR de 2300 pb qui est inséré dans le vecteur pQCXIN par recombinaison homologue en utilisant le kit In Fusion HD Cloning. Les étapes de sélection des colonies bactériennes résistantes et purification des plasmides sont identiques à celles précédemment décrites. La digestion du vecteur pQCXIN-LOXL2 par les enzymes de restriction BamH1 et EcoR1 génère 2 bandes sur gel d'agarose à 1600 pb et 773 pb, dû à la présence de sites unique de coupure BamH1 (152 pb) et EcoR1 (925 pb), dans la séquence insérée de la LOXL2.

5. RT-qPCR 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 (iScript (Biorad)).

La PCR en temps réel a été effectuée sur un système Applied Biosystems QuantStudio 7 (ThermoFisher Scientific) en utilisant le PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific) ainsi que les amorces adéquates (tableau 11) 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 de la

protéine ribosomale L32. Les résultats sont exprimés en quantité relative par la méthode des $\Delta\Delta C_t$.

Nom	Forward	Reverse
LOX	GGATACGGCACTGGCTACTTC	TTGGTCGGCTGGCTAAGAAAT
LOXL2	ATGACGACTTCTCCAATCCAC	TGCAAGGGTCGCCTCGTT
E-cadhérine	GTACCACTGCCACATTCT	CCACGTCTTCTTGAACCTCAG
N-cadhérine	GACAATGCCCTCAAGTGT	CCATTAAGCCGAGTGATGGT

Tableau 8: Primer utilisés en RT-qPCR

6. 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). Pour l'analyse en western blot des milieux conditionnés, les surnageants ont été collectés et concentrés à l'aide de filtres à centrifuger Amicon ultra-15 (Merck) par une centrifugation à 5000g pendant 25min à 25 °C.

Les extraits protéiques (20µg) ont été dénaturés à 70°C pendant 5 minutes avant d'être séparés sur un gel SDS-PAGE de concentration en polyacrylamide de 4 à 12% (NuPage, Bis-tris Gel, Invitrogen) à 150V 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-Tween (TBS-T) 0,01% + 5% de lait écrémé puis incubées sur la nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires (tableau 9).

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).

Cible	Référence	Fournisseur	Type d'anticorps	Source	Concentration	Secondaire
LOX	AB31238	Abcam	Polyclonal	Lapin	1/1000	1/10000
LOX	AB174216	Abcam	Monoclonal	Lapin	1/1000	1/1000
LOX	ABT112	Sigma	Polyclonal	Lapin	1/1000	1/10000
LOX	PA1-16953	Thermo Fisher	Polyclonal	Lapin	1/100	1/1000
LOX	Pg11	Laboratoire du Dr P.Sommer	Polyclonal	Lapin	1/2000	1/4000
LOXL2	ab96233	Abcam	Polyclonal	Lapin	1/1000	1/10000
LOXL2	ab179810	Abcam	Monoclonal	Lapin	1/4000	1/10000
α -tubuline	21445	Cell Signaling	Polyclonal	Lapin	1/500	1/3000

Tableau 9: Anticorps utilisés en western-blot

7. Tests fonctionnels

a) Test colorimétrique 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 de culture puis après 16h d'incubation, 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).

b) Test de migration

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 cellules tumorales (1.10^5 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 $\text{DO} = 570 \text{ nm}$.

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

Les cellules MC3T3-E1 ou CSM ont étéensemencées à 1.10^4 cellules par puits de plaques de culture cellulaire 96 puits. Après trois jours de culture, les cellules osseuses ont été lavées au PBS puis les lignées cancéreuses qui expriment la protéine fluorescente ZsGreen ont été rajoutées pendant 24h sous incubation à 37°C sous 5% de CO_2 . Les cellules ont été ensuite fixées avec du PFA (paraformaldehyde) 4%. Les puits ont été ensuite pris en photo à l'aide d'un microscope inversé Axio Vert sous lampe FITC. La surface d'adhésion des cellules tumorales a été mesurée à l'aide du logiciel image J.

d) Test de formation de sphéroïde

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 4.10^4 cellules/mL. En parallèle, 300 μL de milieu sont déposés 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 8.10^4 cellules/mL et 250 μL de chaque suspension cellulaire est ajoutée. Trois jours plus tard, 300 μL de milieu est ajouté. Après une semaine d'incubation à 37°C sous 5% de CO_2 , les sphères sont fixées avec du PFA 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.

e) Test d'ostéoclastogénèse

Des cellules de moelle osseuse de souris OF1 âgées de 6 semaines sont cultivées pendant 7 jours dans du milieu α -MEM/- (Invitrogen) supplémenté avec 10% (v / v) de sérum de veau foetal (Invitrogen), 25 ng/mL de macrophage colony-stimulating factor (M-CSF; R&D Systems), et 25 ng/mL de soluble recombinant receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL; R&D Systems. Après 1 jour de culture, du milieu conditionné de cellules tumorales (Ctrl, shLOX, LOX+, shLOXL2, LOXL2+) (25 μ g/ml) est ajouté. Après environ 7 jours en culture, les ostéoclastes matures ont été colorés en utilisant le kit TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) (Sigma). Le nombre d'ostéoclastes est dénombré sous microscope sur la base du nombre de noyaux (plus de trois noyaux).

B. 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 menés 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 : DR2018-13 "Caractérisation du rôle de LOX/LOXL2 dans la formation de métastases osseuses dérivées de cancer du sein chez la souris" - DAP 2018021915315343

1. Formation des micro-métastases dans la moelle osseuse des souris : étude 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 5.10^5 cellules dans 100 μ L 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 l'analyse de 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.

2. Formation des micro-métastases dans la moelle osseuse des souris : étude par isolement des cellules tumorales de la moelle

Les injections intra-artérielles (IA) ont été réalisées chez des souris femelles BALB/c nude âgées de 6 semaines. Les cellules (1.10^5 ou 5.10^5 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, 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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.

3. Ostéolyse

Les expériences de formation de métastases osseuses ont été réalisées chez les femelles immunodéprimées BALB/c. Les cellules (1.10^5 ou 5.10^5 cellules dans 100 μL 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 radiographie (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. Lorsque les souris présentaient des lyses osseuses avant d'atteindre les points limites, elles ont été sacrifiées 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.

4. Tumorigénèse

Des xénogreffes tumorales en sous-cutanée ont été menées chez des souris immunodéficientes nude. Les cellules tumorales ont été injectées au niveau dorsal des souris (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.

5. Niches osseuses humanisées

Pour réaliser une niche d'os ectopique humanisée, un mélange comprenant : 55 mg d'hydroxyapatite, du calcium (7,5 μ l ; 90,1 mM), et des cellules souches mésenchymateuses humaines ($2 \cdot 10^6$) diluées dans 50 μ l 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 μ l 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.

6. 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.

C. Analyses statistiques

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 \pm écart-type (SD). Des valeurs p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives (*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001).

Chapitre IV: Résultats

I. Expression de LOX et LOXL2 dans différentes lignées de cancer du sein

Pour répondre à nos problématiques, nous avons choisi de tester l'expression de LOX et LOXL2 dans 5 lignées humaines de cancer du sein différentes : deux lignées de cancer luminaux, MCF-7 et T47D ; deux lignées de cancer triple négatif, Hs578t et MDA-MB-231, ainsi que dans une sous-population de la lignée cellulaire MDA-MB-231, le clone B02, qui métastase spécifiquement à l'os.

Par qPCR nous avons montré que LOX et LOXL2 sont exprimées de manière importante dans les lignées ER- : Hs578t, MDA-MB-231, B02 alors que les niveaux sont anecdotiques voir nuls dans les lignées MCF-7 et T47D (fig. 39A). Afin de caractériser nos cellules tumorales, nous nous sommes intéressées à l'expression d'un marqueur épithélial, la E-cadhérine, et mésenchymateux, la N-cadhérine. Nous avons pu confirmer que les lignées ER+ ont une expression plus importante d'E-Cadhérine, et que les lignées ER- expriment plus fortement la N-Cadhérine, et plus particulièrement la lignée Hs578t (fig. 39B).

Nos premiers résultats indiquent que l'expression de LOX et de LOXL2 est corrélée avec un phénotype plus mésenchymateux et invasif dans nos lignées cellulaires. En effet, celles-ci sont hautement exprimées dans les lignées triples négatives qui sont plus mésenchymateuses, et plus faiblement exprimées voir pas du tout dans les lignées de cancer basaux où les cellules possèdent un phénotype plus épithélial moins capable de disséminer (fig. 39C).

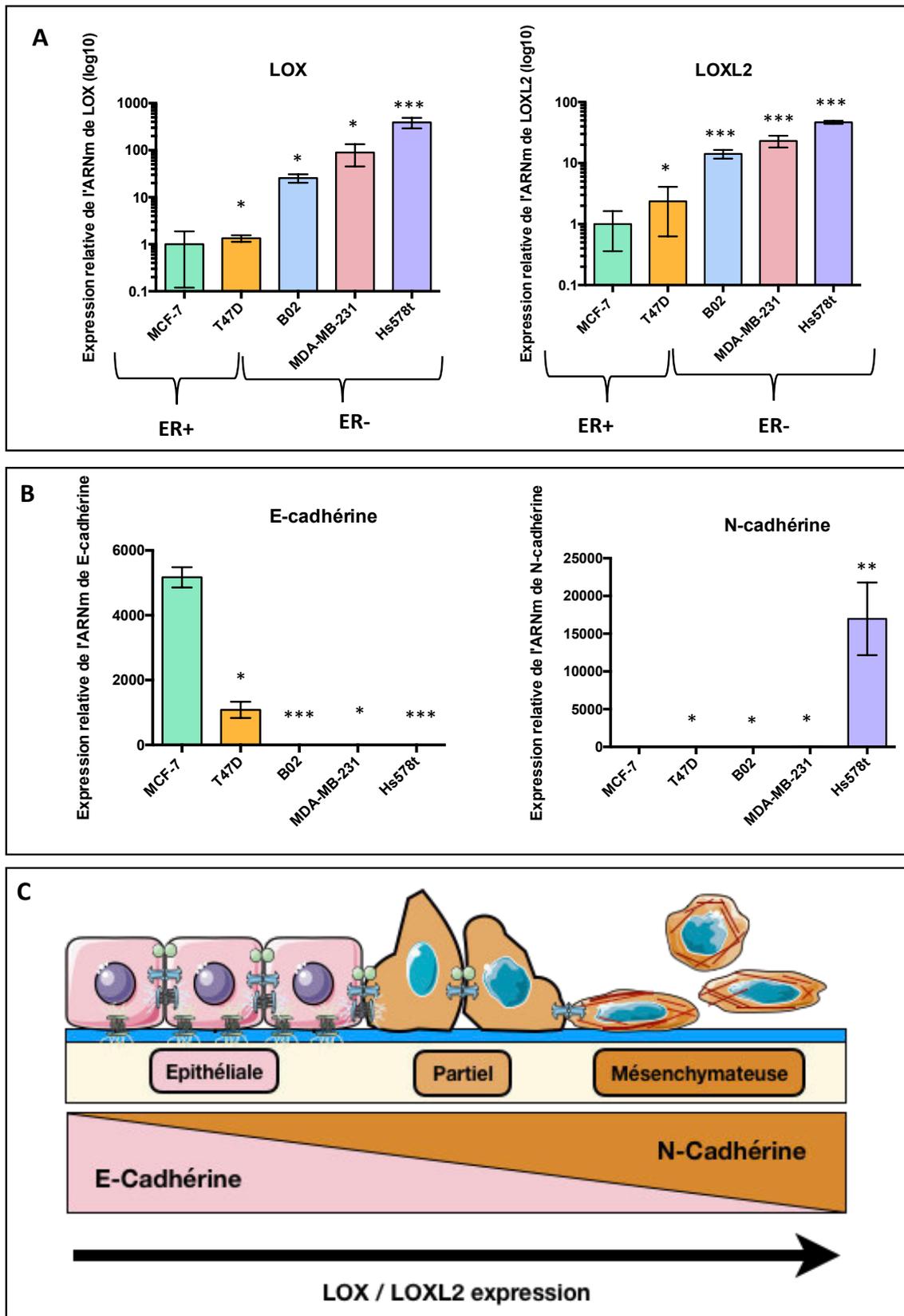


Figure 39: Caractérisation des différentes lignées de cancer du sein

A-B. les résultats de qPCR pour LOX, LOXL2 E-cadhérine et N-cadhérine sont représentés sous forme de niveau d'expression relative, normalisé sur l'expression du gène de ménage L32, et rapportés à l'expression de la lignée MCF-7. C. Schéma représentant l'expression de LOX et LOXL2 dans les cellules selon leur phénotype. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

II. Validation et sélection des lignées cellulaires dont l'expression de LOX et LOXL2 inhibée

Afin d'étudier le rôle de LOX et de LOXL2 dans la formation de métastases osseuses de cancer du sein, nous avons décidé d'inhiber leur expression dans les lignées où ces protéines sont fortement exprimées: Hs578t, MDA-MB-231, et B02. Nous avons utilisé des shARN qui sont des ARNs adoptant une structure en tige et boucle spécifique pour inhiber l'expression d'un gène cible via un phénomène d'interférence par ARN. Nous avons choisi d'écarter la méthode de transfection transitoire qui est un système interférant dont l'efficacité est limitée à quelques jours et nous avons préféré une stratégie d'infection virale. En plus d'être une méthode d'interférence stable, à une multiplicité d'infection de 1 on considère que toutes les cellules sont infectées, et ont reçu la séquence de shRNA en un exemplaire, ce qui évite de faire une sélection clonale.

La validation de l'inhibition a débuté avec la lignée MDA-MB-231 et son sous-type ostéotropique la lignée B02. L'inhibition a été analysée au niveau des transcrits par technique de RT-qPCR, et puis au niveau protéique par western-blots sur les lysats cellulaires et, comme ce sont des protéines sécrétées, sur les milieux conditionnés.

L'analyse par RT-qPCR a confirmé l'inhibition de LOX dans les cellules shLOX, et de LOXL2 dans les cellules shLOXL2 pour nos 2 lignées cellulaires (fig. 40A). Par western-blot nous avons montré que LOX et LOXL2 sont inhibées dans les lysats et dans les milieux conditionnés des cellules B02 shLOX et shLOXL2 respectivement. En ce qui concerne la lignée MDA-MB-231, l'inhibition de LOXL2 dans les lysats a été confirmée, ainsi que celle de LOX et de LOXL2 dans les milieux conditionnés.

Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'inhibition de LOX dans les lysats cellulaires des MDA-MB-231. Nous avons testé 4 anticorps qui reconnaissaient soit une bande à la taille de LOX dans toutes les conditions (Abcam n°174313, anticorps sigma), soit ne reconnaissait rien (Pgl11, Abcam n°31238) (fig. 40B). Ceci pourrait s'expliquer par une aspécificité des anticorps, ou par une modification post-traductionnelle de LOX dans ces cellules spécifiquement et qui pourrait empêcher la reconnaissance de la protéine par l'anticorps. Le fait de ne pas retrouver LOX dans les milieux conditionnés nous incite cependant à conclure que l'inhibition a été efficace.

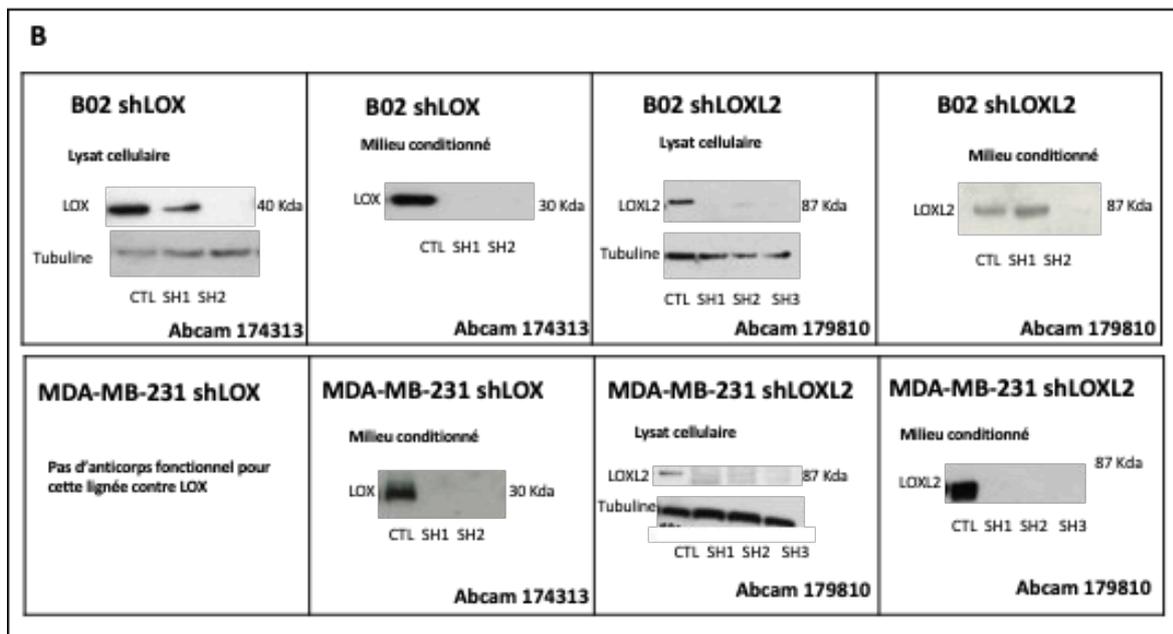
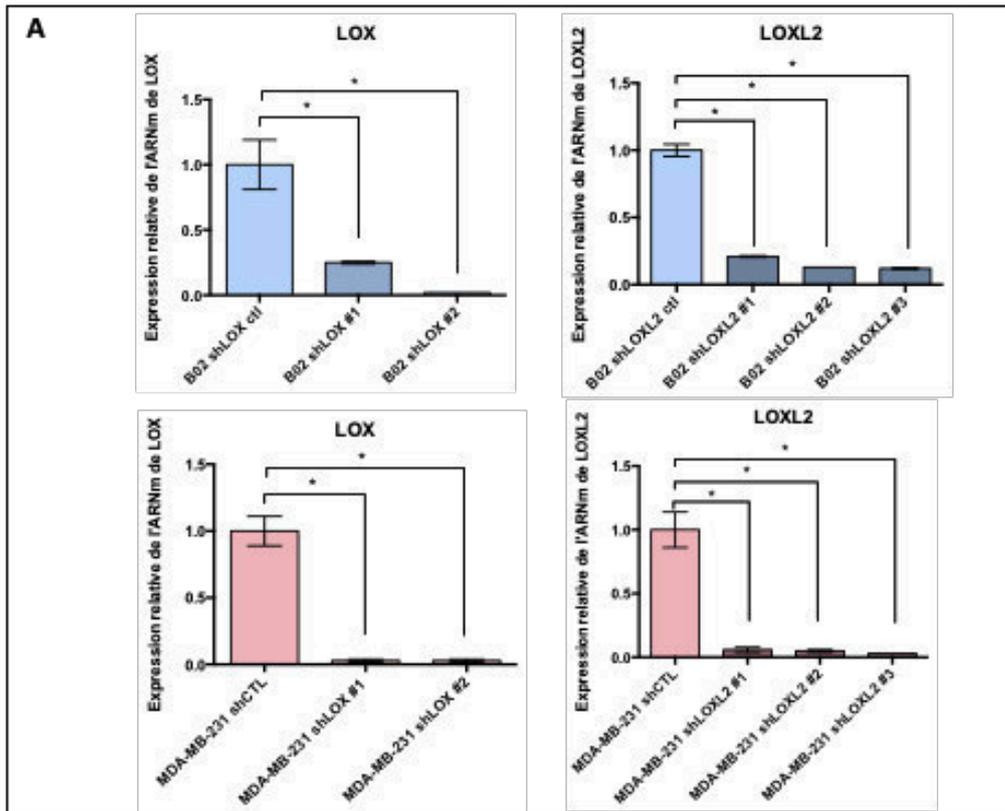


Figure 40: Validation de l'inhibition de LOX ou LOXL2 dans les lignées MDA-MB-231 et B02 par RT-qPCR et Western Blot

A. Le niveau d'expression des ARNm LOX et LOXL2 est évalué dans les différentes lignées par RT-qPCR. Les résultats sont représentés sous forme de niveau d'expression relatif, normalisés sur l'expression du gène de ménage L32, et rapporté à l'expression de la lignée CTL. B. L'expression des protéines LOX et LOXL2 est analysée par western blot avec les différents anticorps indiqués. La tubuline est utilisée comme contrôle dans les lysats cellulaires. * $p < 0,05$.

Les membres de la famille LOXs ayant une très forte homologie de séquence, nous avons vérifié que l'expression des autres isoformes n'était pas modifiée par l'inhibition de LOX et LOXL2. L'inhibition de LOX ne semble pas altérer l'expression de LOXL2 dans la lignée cellulaire B02 shLOX #1 préalablement choisi comme candidat, ni au niveau du transcrite (qPCR), ni au niveau de la protéine (Western Blot) (fig. 41A-B). En ce qui concerne la lignée MDA-MB-231, l'inhibition de LOX n'a aucun effet sur l'expression de LOXL2 dans la population MDA-MB-231 shLOX #2, mais semble altérer l'expression de LOXL2 dans la lignée MDA-MB-231 shLOX #1. On observe une légère diminution du transcrite et une sécrétion plus importante de la protéine.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression des autres membres de la famille LOXs, dont l'expression n'est pas altérée quelque soit la lignée sh considérée (fig. 41C).

Nous avons ensuite réalisé les mêmes invalidations dans la lignée Hs578t. Cette lignée est la plus mésenchymateuse des lignées que nous avons testées, c'est aussi celle qui exprime la plus grande quantité de LOX et de LOXL2.

Nos données expérimentales nous confirment l'inhibition de LOX dans les cellules Hs578t shLOX, et de LOXL2 dans les cellules Hs578t shLOXL2. On constate aussi que l'inhibition de LOX n'altère pas l'expression de l'isoforme de LOXL2 et inversement (fig. 42A-B). De même, l'expression des autres isoformes, LOXL1, LOXL3 et LOXL4, n'est pas touchée par la modulation de LOX et de LOXL2 (fig. 42C).

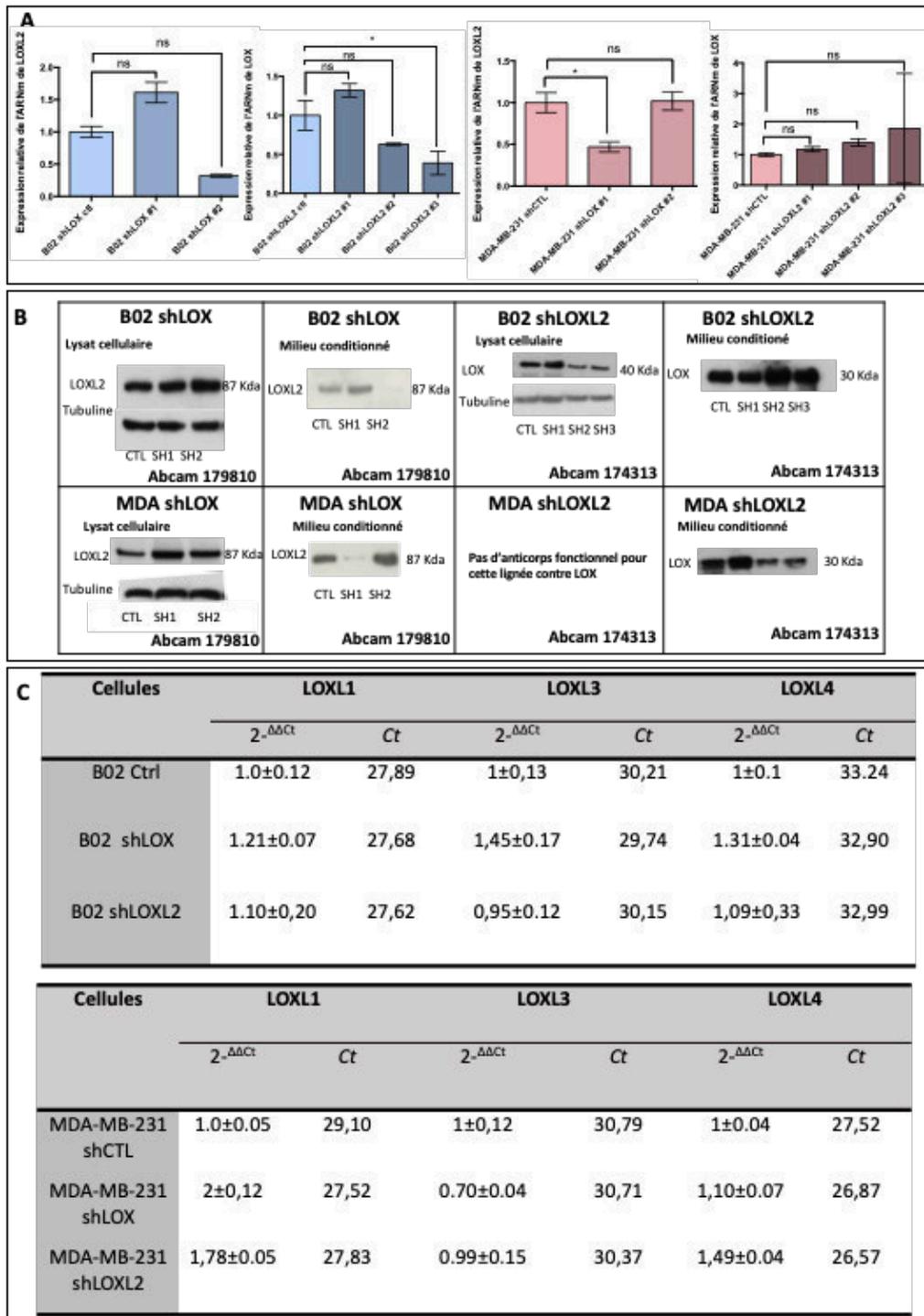
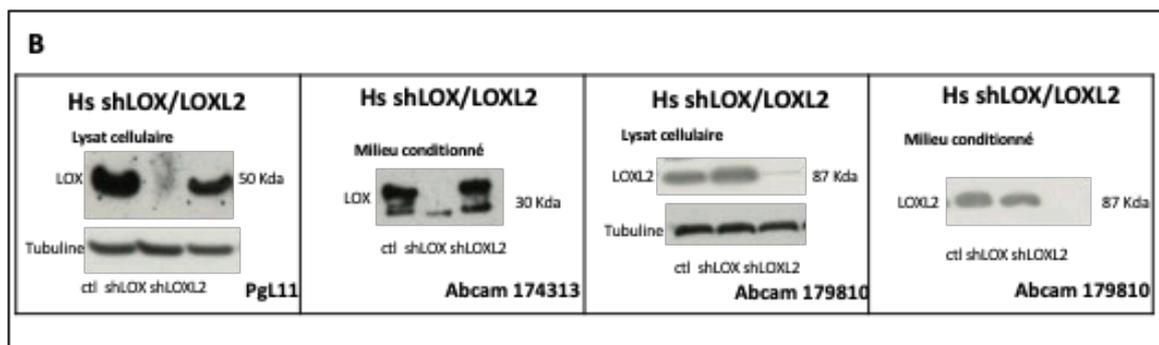
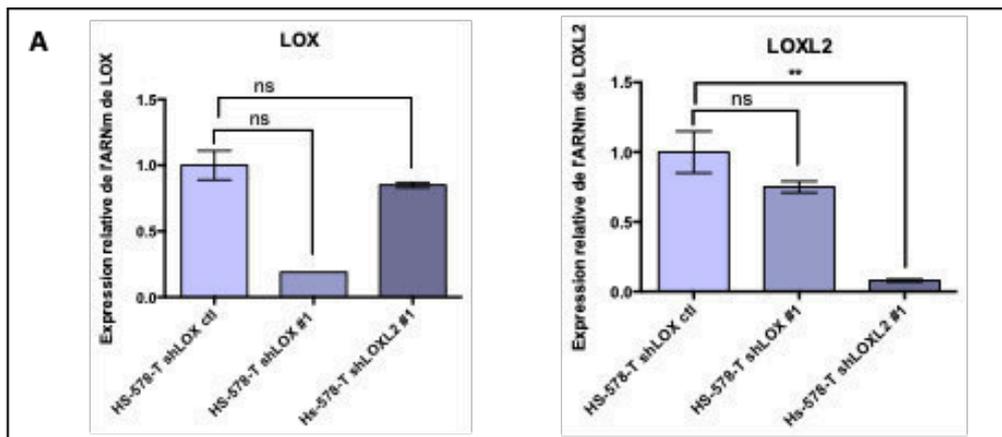


Figure 41: Impact de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur les autres membres de la famille des lysyl oxydases dans la lignée B02 et MDA-MB-231

A. Le niveau d'expression des ARNm LOX et LOXL2 est évalué dans les différentes lignées par RT-qPCR. Les résultats sont représentés sous forme de niveau d'expression relatif, normalisés sur l'expression du gène de ménage L32, et rapportés à l'expression de la lignée CTL. B. L'expression des protéines LOX et LOXL2 est analysée par western blot avec les différents anticorps indiqués. La tubuline est utilisée comme contrôle dans les lysats cellulaires. C. Le niveau d'expression de LOXL1, LOXL3 et LOXL4 est évalué dans les différentes lignées par RT-qPCR, les résultats sont représentés sous forme de niveau d'expression relatif, normalisés sur l'expression du gène de ménage L32, et rapportés à l'expression de la lignée CTL. * $p < 0,05$, ns = non significatif.



Cellules	LOXL1		LOXL3		LOXL4	
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ct
Hs578t Ctrl	1.0±0.08	23,89	1±0,02	24,68	1±0.75	38,18
Hs578t shLOX	0,77±0.05	24,09	0,64±0.04	25,14	5,99±1,23	35,06
Hs578t shLOXL2	0,75±0,10	24,43	0,39±0,01	26,15	6,28±4,05	35,57

Figure 42: Validation de l'inhibition de LOX ou LOXL2 dans la lignée Hs578t par RT-qPCR et Western Blot
 A. Le niveau d'expression des ARNm LOX et LOXL2 est évalué dans les différentes lignées par RT-qPCR. Les résultats sont représentés sous forme de niveau d'expression relatif, normalisés sur l'expression du gène de ménage L32, et rapportés à l'expression de la lignée CTL.. B. L'expression des protéines LOX et LOXL2 est analysée par western blot avec les différents anticorps indiqués. La tubuline est utilisée comme contrôle dans les lysats cellulaires. C. Le niveau d'expression de LOXL1, LOXL3 et LOXL4 est évalué dans les différentes lignées par RT-qPCR, les résultats sont représentés sous forme de niveau d'expression relatif, normalisés sur l'expression du gène de ménage L32, et rapportés à l'expression de la lignée CTL. . ** $p < 0,01$, ns = non significatif.

III. Caractérisation fonctionnelle des lignées cellulaire inhibées en LOX ou LOXL2

Comme nous l'avons précédemment décrit dans le paragraphe sur la biologie du cancer, de nombreuses caractéristiques sont nécessaires à la progression tumorale. Afin de savoir si l'inhibition de LOX ou de LOXL2 dans nos modèles pouvait favoriser la progression tumorale puis par la suite le développement de métastases osseuses, nous nous sommes intéressés à certaines de ces caractéristiques fonctionnelles lors de nos études *in vitro*.

Nous avons regardé si l'inhibition de LOX ou de LOXL2 modulait la prolifération, la migration, et le potentiel de survie en suspension, mais également si les cellules modulées en LOX ou LOXL2 possédaient des capacités différentes à interagir avec des composants présents dans l'os tel que certaines protéines de la matrice extracellulaire, ou avec des cellules présentes dans la niche endostéale.

A. Effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur la prolifération

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si l'inhibition de LOX ou de LOXL2 modulait la prolifération de nos différentes lignées modulées pour l'expression de LOX ou LOXL2.

Nous avons pratiqué des tests par incorporation de BrDu pendant 16h. Ce test montre que l'absence de LOX ou de LOXL2 ne perturbe pas le cycle de division cellulaire des MDA-MB-231 et des B02, l'incorporation de BrDu n'étant pas significativement différentes pour les 3 lignées cellulaires CTL, shLOX ou shLOXL2. Seule la lignée Hs578t shLOX présente une diminution significative de la prolifération (fig. 43).

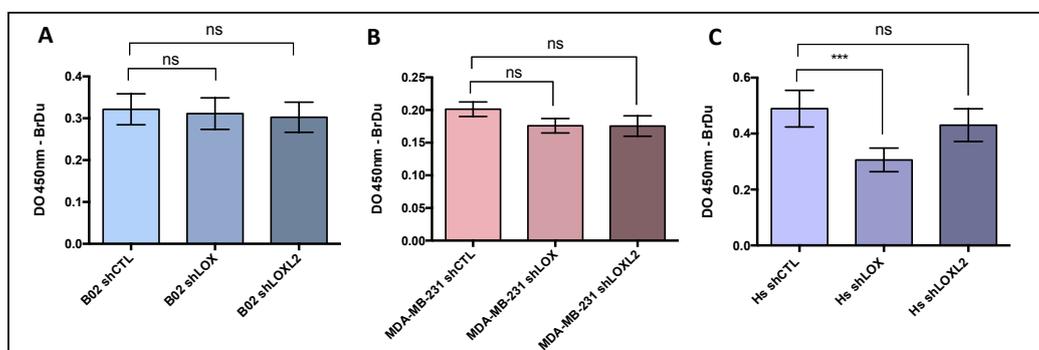


Figure 43: Test d'incorporation de BrDu en présence ou non de LOX ou LOXL2

A-C : Test de prolifération sur les différentes lignées B02, MDA-MB-231 et Hs578t, via incorporation de BrDu pendant 16h puis lecture de l'absorbance à 450 nm. n=3. . *** $p < 0,001$, ns = non significatif.

A part dans la lignée Hs578t shLOX, nous n'avons pas observé d'effet. Il est à noter que dans la littérature, la plupart des études utilisent du β APN, inhibiteur chimique des LOXs, mais pas totalement spécifique. Avant de conclure sur les effets de l'inhibition de LOX ou de LOXL2 sur la prolifération des tests de cinétique sur une semaine seraient donc nécessaires, ainsi que l'utilisation du β APN sur les cellules CTL.

B. Effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur la migration

Comme il l'a été indiqué dans la partie bibliographique, LOX et LOXL2 sont connues pour favoriser la migration cellulaire. Nous avons donc poursuivi la caractérisation fonctionnelle de nos cellules en analysant si l'inhibition de LOX et de LOXL2 influençait la migration des cellules tumorales. Pour ce faire, les cellules ont étéensemencées dans des chambres de Boyden et différents chimio-attractants ont été utilisés (une condition contrôle positif 10% de SVF, une condition contrôle négatif 0,1% de SVF, et une condition standard d'analyse 1% de SVF). Après 24h, les membranes ont été récupérées et marquées au cristal violet afin de pouvoir faire une analyse photographique. Le cristal violet a ensuite été dilué dans de l'acide acétique et quantifié par mesure de l'absorbance à 570 nm afin de comparer les différences de migration (fig. 44A).

Ces résultats nous montrent que l'inhibition de LOX ou de LOXL2 ne module pas les capacités migratoires des cellules tumorales dans aucun de nos trois modèles (fig. 44B-D).

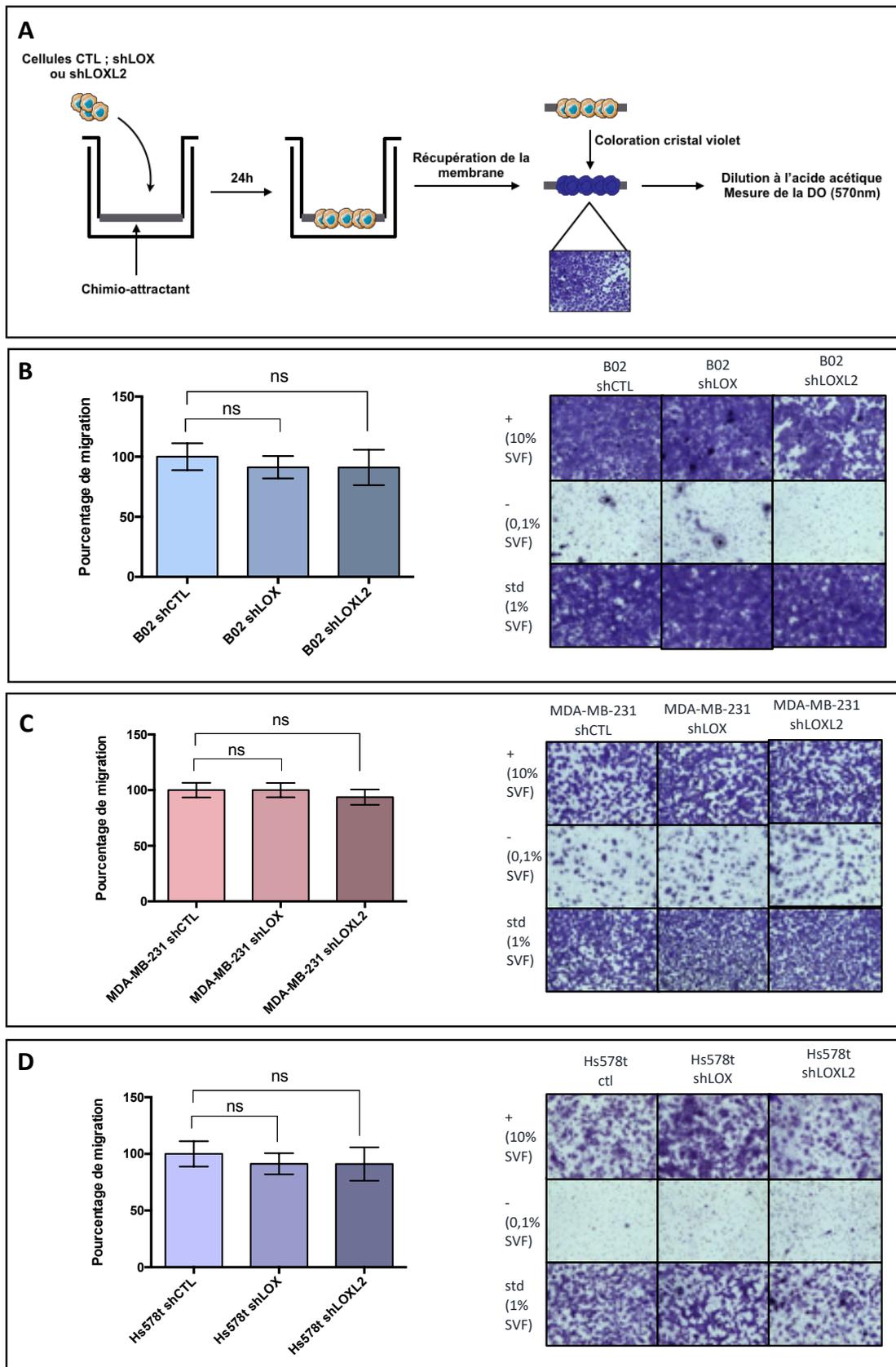


Figure 44: Étude de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur les capacités migratoires de nos cellules

A. Schéma représentatif du protocole expérimental. B-D. Les analyses de migration sont présentées sous forme de pourcentages, rapportés au contrôle, et accompagnées d'images représentatives pour chacune des conditions (B : B02 ; C : MDA-MB-231 ; D : Hs578t). n=3, ns = non significatif.

C. Effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'adhésion sur le collagène de type I et la fibronectine. Le collagène de type I a été sélectionné, car c'est le type de collagène le plus abondant du corps humain et notamment dans l'os. De plus, nous avons démontré lors d'une étude précédente que LOX augmentait la colonisation de l'os par les cellules colorectales tumorales en favorisant l'adhésion au collagène de type I (Reynaud et al.2017). La fibronectine quant à elle est un composant très présent dans l'os et participe aux interactions entre les cellules et le collagène. Nous avons donc cherché à savoir si l'inhibition de LOX ou de LOXL2 allait moduler les capacités des cellules tumorales à adhérer au collagène de type I ou à la fibronectine. Pour ce faire, nous avons réalisé des tests d'adhésion sur des plaques de collagène ou de fibronectine en cinétique à 5, 15, 30, et 45 minutes. A chaque temps, les puits ont été lavés au PBS puis fixés au PFA et colorés au cristal violet. Nous avons obtenu les mêmes profils de résultats pour tous les temps de la cinétique. Par soucis de concision, j'ai choisi de présenter les résultats à 15min et 45min uniquement (Fig. 45). Contrairement à ce que nous attendions l'inhibition de LOX dans la lignée B02 semble présenter une légère augmentation d'adhésion statistique sur le collagène de type I et non statistique sur la fibronectine. La lignée MDA-MB-231 quant à elle présente une légère augmentation d'adhésion statistique sur la fibronectine et non statistique sur le collagène de type I. La lignée Hs578t présentent elle aussi une légère augmentation statistique de l'adhésion sur le collagène et la fibronectine (fig. 45).

Afin de comprendre pourquoi ces cellules adhèrent mieux il serait intéressant de tester si l'inhibition de LOX et surtout de LOXL2 entraîne une modification de l'expression ou du clustering des intégrines susceptibles d'interagir avec la matrice, comme celles contenant la sous-unité $\beta 1$. Il pourrait également être intéressant de pratiquer des tests d'adhésion sur la matrice extracellulaire entière, c'est pourquoi nous sommes actuellement en train de mettre au point au laboratoire des tests d'adhésions sur matrices extracellulaires dé-cellularisées produites par la lignée MC3T3-E1.

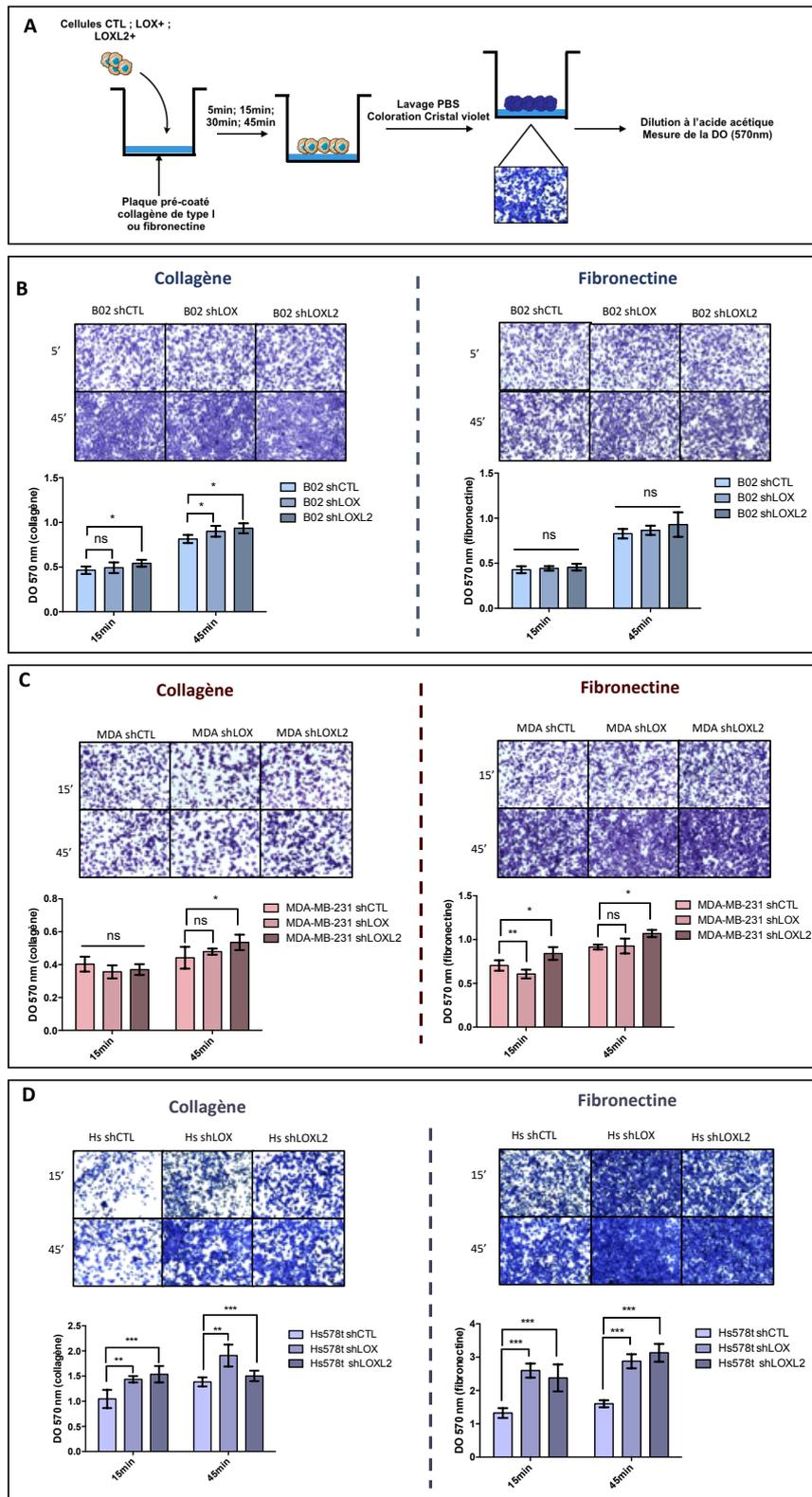


Figure 45: Étude de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur les capacités d'adhésion des lignées cellulaires aux composants de la matrice extracellulaire

A-Schéma représentatif du protocole expérimental. B-D Photographies représentant l'adhésion sur le collagène de type I ou la fibronectine pour chaque lignée à 15 et 45 min et graphique de quantification de la coloration au cristal violet par lecture de DO à 570nm (B : B02 ; C :MDA-MB-231 ; C : Hs578t) (Résultat représentatif d'une des expérimentations réalisées n=3, 8 puits par condition). . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns = non significatif.

D. L'effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur l'adhésion aux cellules de la niche endostéale

Une hypothèse est que les cellules tumorales arrivant dans l'os vont se loger dans la niche endostéale. Dans la niche, les cellules tumorales pourraient rentrer en compétition avec les cellules souches hématopoïétiques qui composent la niche endostéale où elles interagiraient avec les cellules qui composent cette niche telles que les ostéoblastes ou les cellules souches mésenchymateuses. Nous avons donc regardé si les cellules tumorales interagissaient avec ces cellules et si l'inhibition de LOX ou LOXL2 modifiait les capacités d'interaction avec les cellules pré-ostéoblastiques murines MC3T3-E1 et les cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM).

Nous avons utilisé des plaques 96 puits non traitées pour la culture cellulaire, où les cellules tumorales cultivées dans du milieu basal sans SVF ne sont pas capables d'adhérer. Nous avonsensemencé les MC3T3-E1 ou les CSM dans un milieu contenant du SVF et laissé la croissance se poursuivre jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire. Les cellules tumorales ont alors été platées dans du milieu basal, incubées pendant 24h. Après lavage au PBS et fixation à la PFA, les puits sont pris en photo et les surfaces de cellules tumorales GFP+ sont dénombrées à l'aide du logiciel ImageJ (fig. 46).

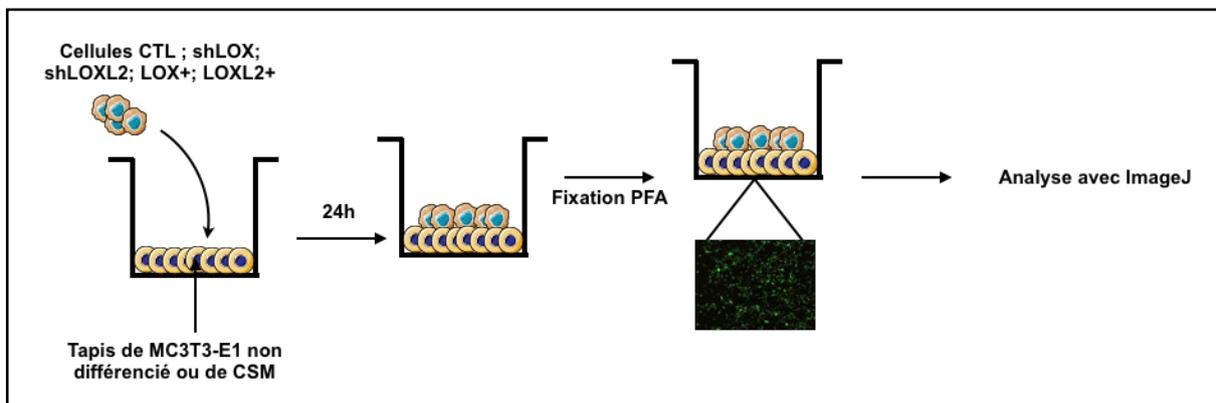


Figure 46: Étude de l'effet de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur l'adhésion aux cellules des niches osseuses – Protocole expérimentale

Schéma représentatif du protocole expérimental.

Nous n'avons observé aucune différence significative d'adhésion des B02 shLOX ou shLOXL2. Les cellules MDA-MB-231 présentent quant à elle une diminution d'interaction aux CSM et aux MC3T3-E1 lorsque l'expression de LOX ou de LOXL2 est inhibée. A l'inverse, pour la lignée

Hs578t, les cellules inhibées en LOXL2 présente une capacité d'interaction avec les CSM et MC3T3-E1 plus élevée (fig. 47 A-C).

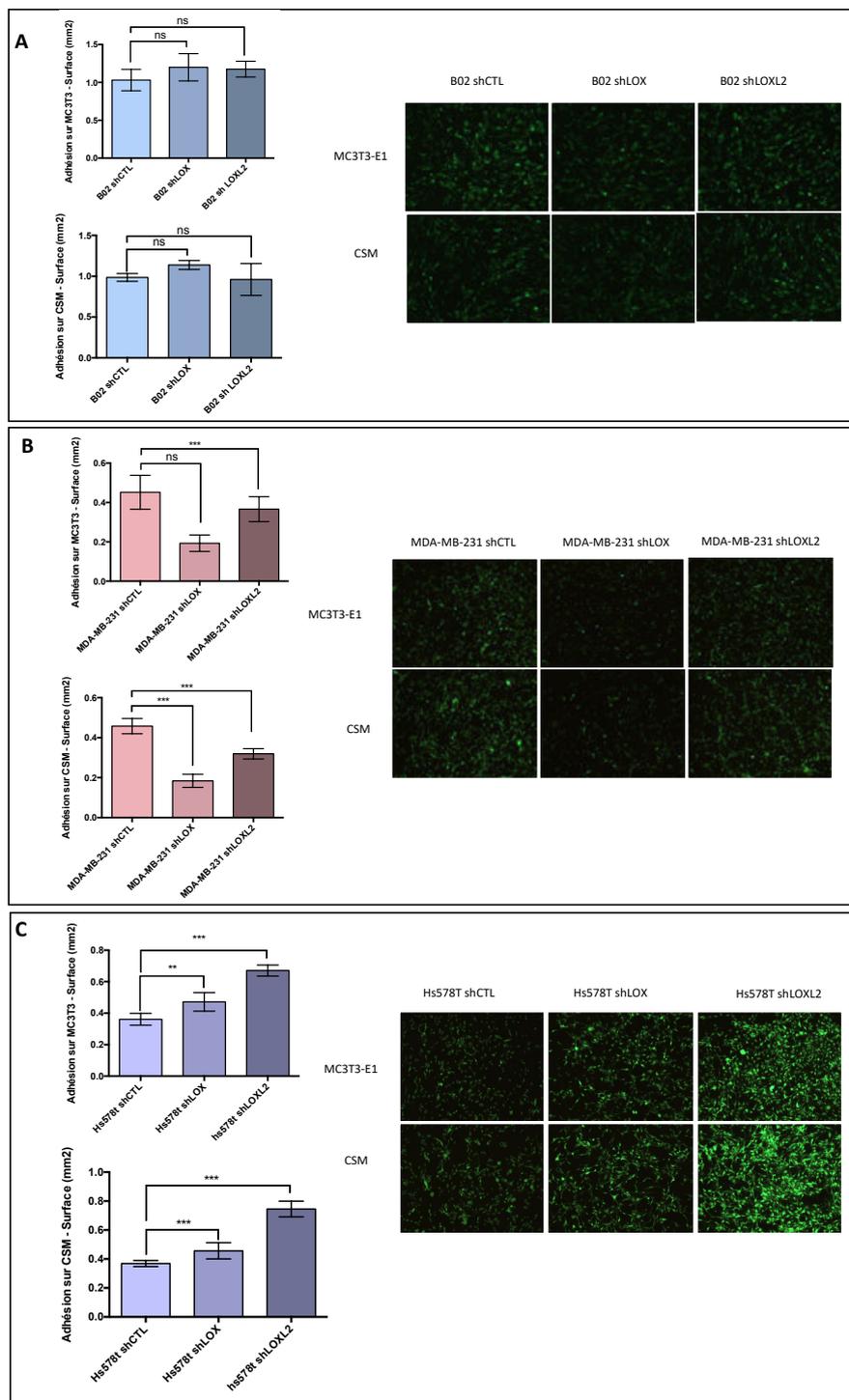


Figure 47: Étude de l'effet de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur l'adhésion aux cellules des niches osseuses
*A. Schéma représentatif du protocole expérimental. B-D Photographies représentant l'adhésion sur MC3T3-E1 ou sur CSM pour chaque condition expérimentale accompagnées du graphique de quantification correspondant (B : B02 ; C : MDA-MB-231 ; D : Hs578t). (Résultat représentatif d'une des expérimentations réalisées n=3, 6 puits par condition). . ** p<0,01, ***p<0,001, ns = non significatif.*

Alors que nous nous attendions, comme nous l'avons vu dans le modèle de cancer colorectal, à ce que l'inhibition de LOX réduise les capacités d'adhésion de nos cellules tumorales, nous avons montré que l'inhibition de LOX et LOXL2 ne semble pas influencer l'adhésion des cellules B02 aux composants cellulaires ou matriciels de la niche endostéale. L'inhibition de LOX et de LOXL2 dans la lignée MDA-MB-231 semble réduire l'interaction aux cellules mésenchymateuses et au préostéoblastes, mais semble à l'inverse augmenter l'adhésion sur les composants matriciels. L'inhibition de LOX ou LOXL2 dans la lignée Hs578t semble quant à elle semble augmenter l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène de type I, de la fibronectine et aux cellules composants la niche endostéale. D'autres composants matriciels comme la vitronectine, ou d'autre cellules de la niche endostéale comme les ostéoclastes, seraient éventuellement à tester. Des adhésions en cinétique sur les cellules seraient également à envisager.

E. Effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur la formation des organoïdes homotypiques ou hétérotypiques en culture 3D

Dans l'organisme vivant, les tumeurs croissent en trois dimensions et sont soumises aux modifications micro-environnementales que cela engendre, comme l'hypoxie et le manque de nutriments pour les cellules au centre de la tumeur. Cela peut induire une sélection cellulaire, ou les cellules les plus résistantes, ayant des caractères cellules souches, peuvent émerger puis devenir invasives.

Le modèle de culture 3D mime de façon plus représentative ce qu'il se passe *in vivo*, et les interactions cellulaires qui peuvent se produire. Dans le but de savoir si l'inhibition de LOX ou LOXL2 modulait les capacités de survie des cellules, leur résistance dans un environnement plus hostile, plus proche de ce qu'il se passe *in vivo*, mais aussi pour approfondir le travail sur l'interaction entre nos cellules tumorales et les cellules qui composent la niche endostéale, nous avons réalisé des tests de formation d'organoïdes en culture 3D. Nous avons donc cultivé nos cellules en trois dimensions dans un milieu sans sérum et dans des plaques à faible adhérence, ce qui permettait la formation d'organoïdes homotypique (une seule lignée), mais aussi de nous intéresser aux interactions cellules-cellules en formant des organoïdes hétérotypiques (avec plusieurs lignées).

Nous avons pu constater que la modulation de LOX ou LOXL2 dans les lignées MDA-MB-231 et B02 seules, ou en présence de MC3T3 ou de CSM, ne modifie pas la capacité des cellules à former des sphères et n'en module pas le nombre. Il est à noter que les formes de sphères étaient d'apparence différentes pour chaque lignée : dans la lignée B02 les sphères étaient compactes, tandis qu'avec la lignée MDA-MB-231 elles étaient peu compactes et en forme de grappe de raisin (fig. 48A-B). Les analyses sont en cours avec les lignées Hs578t qui sont plus difficiles à cultiver.

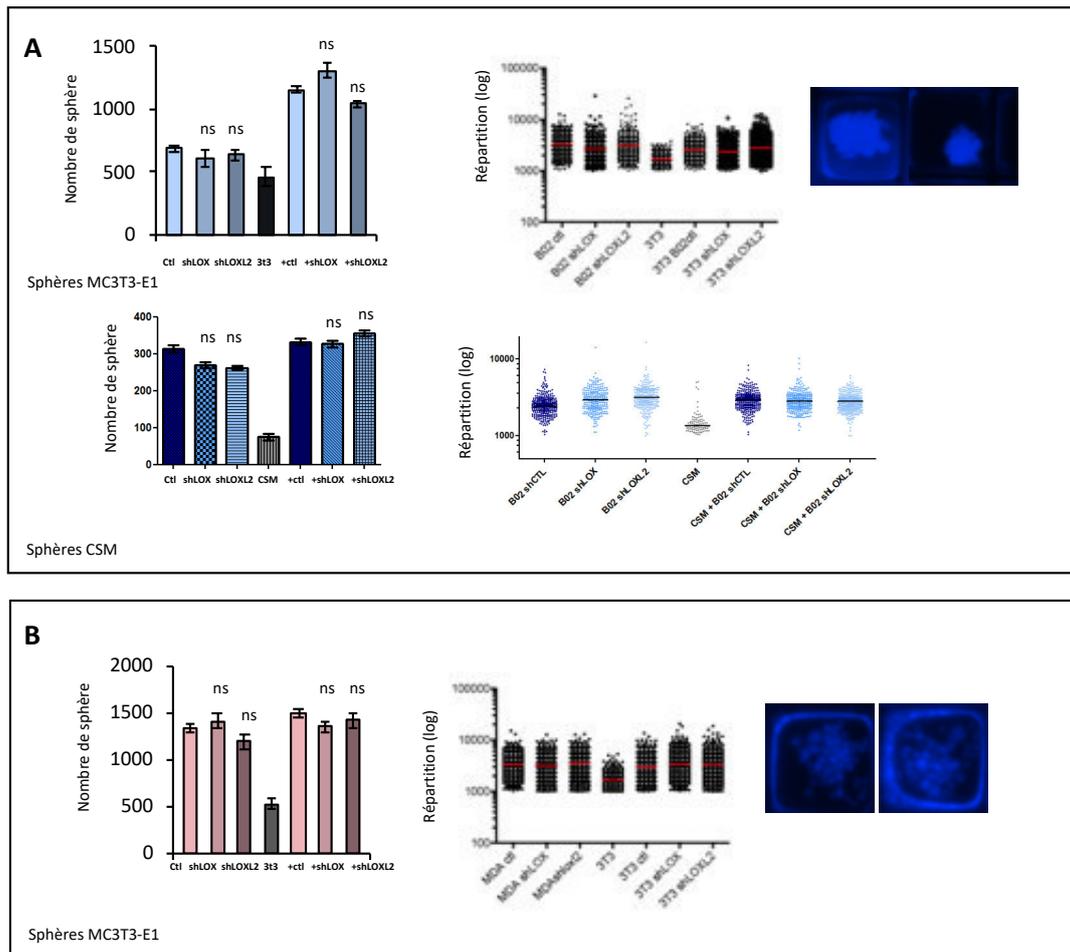


Figure 48: Étude de l'effet de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur la capacité des cellules tumorales B02 et MDA-MB-231 à former des organoïdes homotypiques ou hétérotypiques en présence de cellules constituant la niche osseuse

Pour chaque lignées et conditions, le nombre de sphère a été analysé. La répartition de taille des sphères à été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (A :B02 ; B :MDA-MB-231).(n=3, 4 puits par condition). . ns = non significatif.

IV. Impact de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur la colonisation osseuse et la formation de métastases *in vivo*

Malgré le peu de résultats obtenus avec les analyses *in vitro*, et au vu des données de la littérature, nous avons continué l'analyse de nos lignées *in vivo*. Nous avons comme hypothèse que LOX et LOXL2 pouvaient influencer l'ancrage des cellules tumorale/ la survie dans l'os lors des étapes précoces de colonisation ce qui permettait la formation de métastases osseuses. Pour ce faire, nous avons procédé à trois expériences distinctes.

Dans un premier temps, nous voulions savoir si les modulations de LOX ou de LOXL2 allaient moduler l'ancrage des cellules tumorales dans la moelle osseuse. Nous avons donc réalisé deux protocoles *in vivo* arrêtés à des temps très courts afin de nous intéresser aux étapes précoces de la colonisation osseuse. Afin de déterminer si nos cellules tumorales modulées en LOX ou LOXL2 survivaient dans l'os, et induisaient la formation de métastases osseuses et de lyse osseuse, nous avons ensuite réalisé un protocole à temps long. Nous avons choisi d'étudier principalement la lignée B02. En effet, cette lignée dérivée des MDA-MB-231 ayant été isolée au laboratoire pour sa capacité à former spécifiquement des métastases osseuses, elle nous a semblé être le modèle le plus adéquat.

A. Effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur l'ancrage précoce des cellules tumorales dans la moelle osseuse

Pour analyser les étapes précoces de la colonisation *in vivo*, nous avons cherché à visualiser directement nos cellules dans l'os au démarrage de la colonisation. Une étude préliminaire a été réalisée avec les cellules B02 shCTL, shLOX et shLOXL2 marquées préalablement au DiD (Dihydroethidium) avant injection dans l'artère caudale de souris immunodéficientes. 5 jours après injection, nous avons récupéré les pattes afin de les analyser par microscopie biphotonique (fig. 49A).

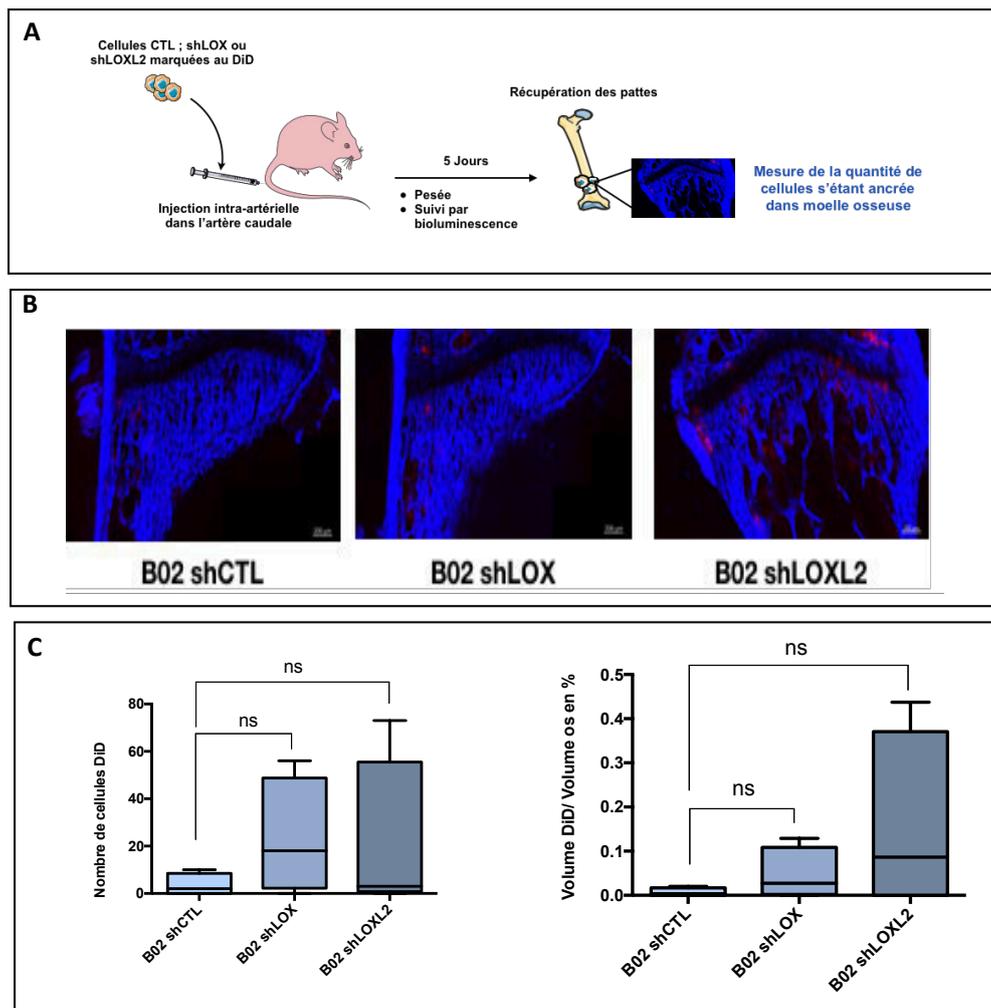


Figure 49: Effet de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur l'implantation précoce des cellules tumorales dans l'os
A. Schéma représentatif du protocole expérimental. B. Photographies de microscopie biphotonique. C. Analyse quantitative du nombre de cellules marquées au DiD (rouge) dans nos échantillons (n=4 pour chacun des groupes).
. ns = non significatif.

Nous avons pu examiner l'implantation des cellules tumorales (rouges) dans le microenvironnement osseux. Elles ont été dénombrées et la surface de ces colonies tumorales a été rapportée à la surface osseuse. Nous avons observé une augmentation du nombre de cellules tumorales présentes dans les tibias des souris injectées avec les cellules B02 shLOX et de manière plus importante encore avec les cellules B02 shLOXL2. Cependant, les résultats ne sont pas significatifs. De plus, peu de cellules ayant été détectées, cette expérience nous donne des informations préliminaires mais est à refaire avec un nombre de cellules injectées plus important (Fig. 49).

B. Effet de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur la formation de micrométastases osseuses

Après avoir regardé l'ostéotropisme de nos cellules, nous avons regardé si l'inhibition de LOX ou de LOXL2 influençait la survie des cellules dans l'os lors des étapes précoces de colonisation. Nous avons donc injecté les cellules dans l'artère caudale de souris immunodéprimées BALB/C nude. 7 jours après l'injection, les souris étaient toutes positives en bioluminescence, confirmant la présence de cellules tumorales dans les pattes arrières. Elles ont donc été sacrifiées et la moelle osseuse et les poumons ont été dilacérés et mis en culture sous sélection antibiotique pendant 17 jours. Ceci nous a permis de dénombrer les colonies formées, qui sont le reflet des micrométastases en cours de formation dans l'os et les poumons au moment de la mise à mort (fig. 50). La variabilité individuelle est très importante et le nombre de souris par groupe étant faible nous n'avons pas pu faire ressortir de résultats significatifs.

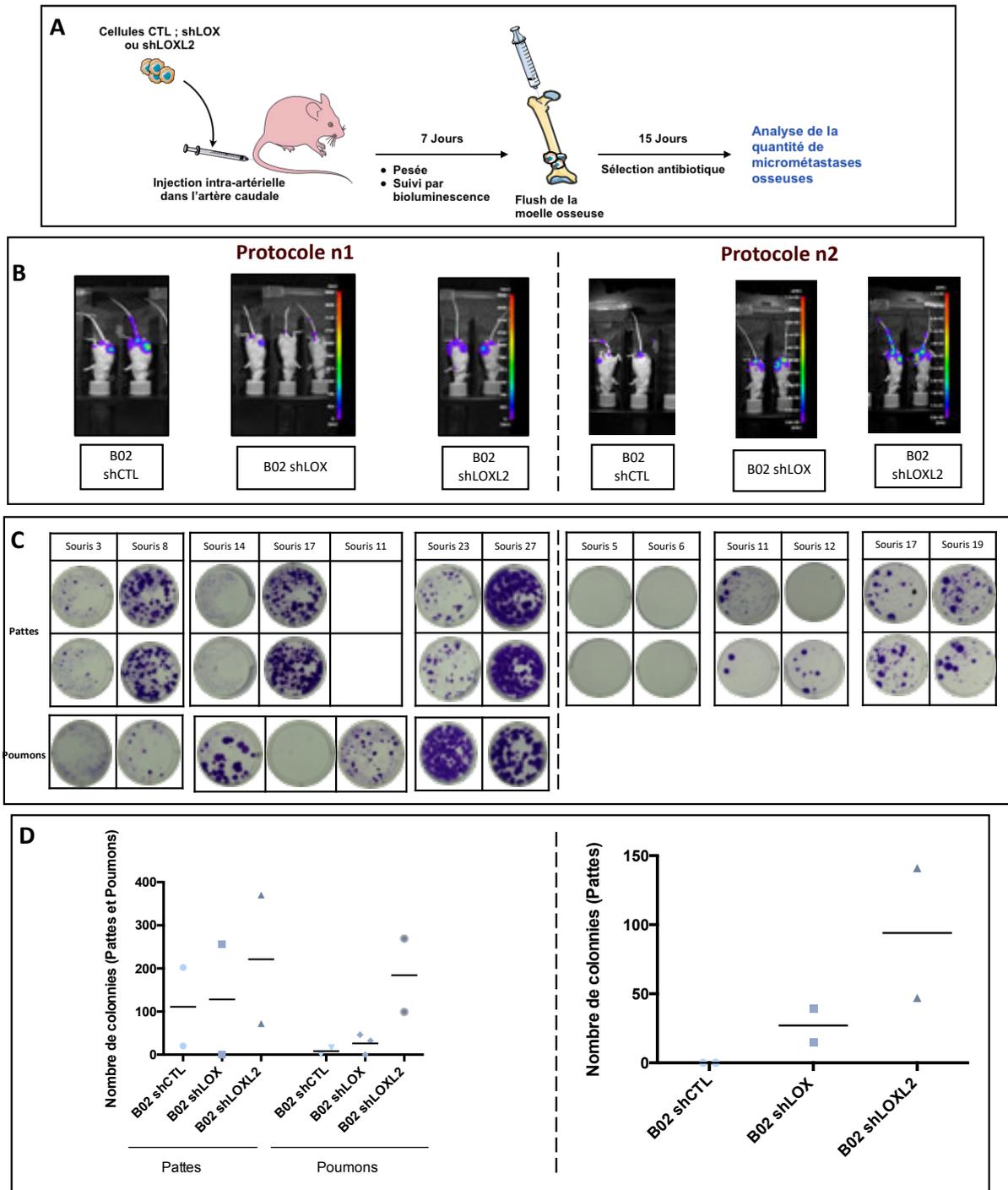


Figure 50: Effet de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur la colonisation de la moelle osseuse

A. Schéma représentatif du protocole expérimental B. Photographies de bioluminescence dans les souris à 7 jours post-injection, C. Photographies des colonies de cellules formées dans les pattes et poumons obtenues après 17 jours de culture sous sélection antibiotique D. Analyse quantitative du nombre de colonies (n=2 pour chacun des protocoles expérimentaux à l'exception de B02 shLOX n=3 dans la condition d'analyse des clones pulmonaires).

C. Étude de l'inhibition de l'expression de LOX ou LOXL2 sur la formation de métastases osseuses.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets de l'inhibition de LOX ou de LOXL2 sur le développement de métastases osseuses proprement dites. En effet, nous voulions voir si l'inhibition de LOX ou de LOXL2 influençait la formation de métastases osseuses ostéolytiques dans notre modèle, et si ces deux protéines avaient le même effet, la même fonction dans ce processus.

Pour ce faire nous avons injecté les lignées cellulaires B02 shCTL, shLOX, shLOXL2 dans l'artère caudale de souris BALB/C nude immunodéficientes. Durant 35 jours, les animaux ont été suivis chaque semaine en bioluminescence et radiographie (fig.51A).

La bioluminescence à 35 jours, équivalente dans les 3 conditions testées, montre que toutes les souris ont développé des tumeurs (Fig. 51B). Les mesures de lyse osseuse et la quantification du Bv/Tv, qui représente le ratio entre le volume osseux (Bone Volume) et le volume tissulaire dans l'os (Tissu Volume), étant également similaire quelles que soient les cellules injectées, indiquent que l'inhibition de LOX ou de LOXL2 ne modifie pas la capacité des cellules B02 à former des métastases osseuses (Fig. 51 C-D).

Contrairement à ce qui a été montré dans la littérature dans le modèle mammaire, l'inhibition de LOX ou de LOXL2 dans nos cellules tumorales ne diminue pas leur potentiel métastatique (Cox et al. 2015, Barker et al, 2011). Concernant LOXL2, si nous avons observé une augmentation, bien que non significative, de la colonisation précoce avec les cellules B02 shLOXL2 (fig. 49, p156), cet effet ne perdure pas, et les B02 shLOXL2 n'induisent pas plus d'oséolyse que les cellules CTL.

Les cellules B02 ont été choisies pour *in vivo* car elles métastasent très bien à l'os comparé aux 2 autres lignées utilisées *in vitro*, les cellules parentales MDA-MB-231, et les Hs578t. Mais ce sont aussi celles qui expriment le moins LOX et LOXL2 parmi les lignées triple négatives que nous avons testé. Inhiber des protéines faiblement exprimées pouvant expliquer l'absence d'effet observé dans nos différentes expériences, nous avons donc réalisé des expériences similaires avec les cellules Hs578t qui elles ont des niveaux endogènes de LOX et LOXL2 très élevés. Malheureusement, nous nous sommes heurté à des difficultés techniques. En effet, les Hs578t sont des grosses cellules qui ont tendance à s'agréger. Nous ne pouvions donc pas

injecter le même nombre de cellules dans les souris pour limiter le risque de décès au moment de l'injection. Avec moitié moins de cellules nous n'avons obtenu aucun résultat. Le protocole est donc à mettre au point.

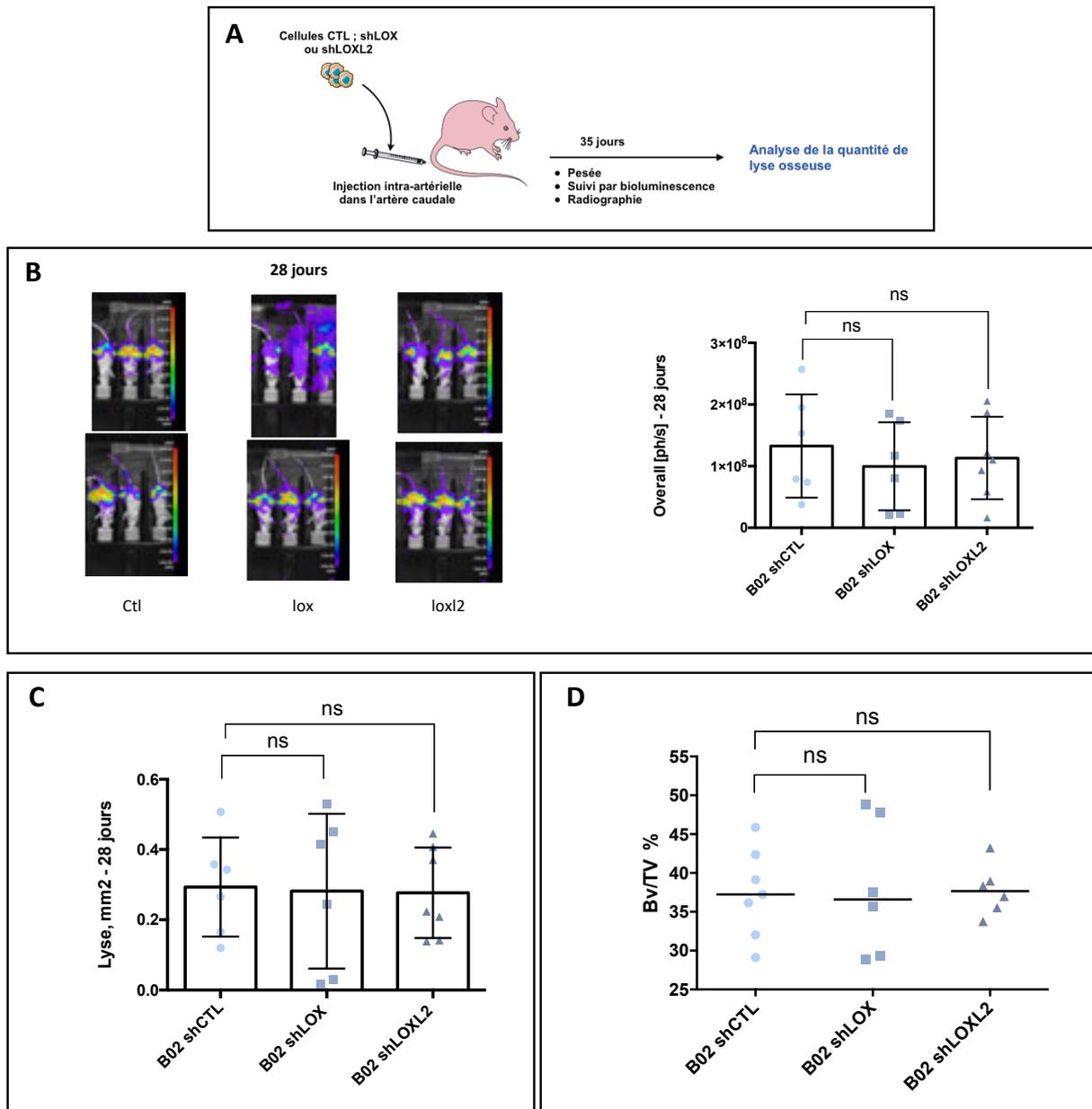


Figure 51: Effet de l'inhibition de LOX ou LOXL2 sur la formation de métastases ostéolytiques

A. Schéma représentatif du protocole expérimental. B. Images de bioluminescence dans des souris 35 jours après l'injection. C. Quantification de la lyse osseuse en mm², mesurée à partir des radiographies. D. Quantification du Bv/Tv. (n=6). ns = non significatif.

V. Les effets de la surexpression de LOX ou LOXL2 dans la lignée B02 et MCF-7

Tous ces résultats cumulés, qui ne devaient servir qu'à établir et caractériser le modèle expérimental indispensable pour répondre à notre question principale, et qui pour être générés ont occupé beaucoup de mon temps de thèse, se sont avérés malheureusement non concluants. La lignée B02 exprimant faiblement LOX et LOXL2 comparé à leurs homologues triple négatives MDA-MB-231 et Hs578t, nous avons donc décidé de les surexprimer. Afin de nous affranchir de l'expression endogène de LOX et LOXL2 et pour pouvoir comparer vraiment si la présence ou l'absence de LOX et LOXL2 engendrait des modifications phénotypiques et d'activité dans le but d'obtenir plus d'information sur le fonctionnement de ces protéines, nous avons réalisé les surexpressions dans les lignées sh : LOX dans la lignée shLOX, et LOXL2 dans la lignée shLOXL2.

Nous avons également surexprimé les protéines dans la lignée MCF-7, car elles ne sont pas exprimées de façon endogène, et également parce que les cancers luminaux bien que peu agressifs, sont connus pour métastaser de manière importante à l'os (voir tableau 3, page 40).

A. Validation de la surexpression de LOX ou LOXL2 dans la lignée B02

Comme lors des expériences d'inhibition, nous avons analysé l'expression de LOX ou de LOXL2 ainsi que des autres membres de la famille LOXs dans les différentes lignées par qPCR. Comme le montre la figure 52, LOX est surexprimée dans la lignée B02 LOX+, et LOXL2 dans la lignée B02 LOXL2+ (fig. 52A). De plus, la surexpression de LOX ou de LOXL2 ne modifie pas l'expression des autres membres de la famille (fig. 52B-D). Les western-blots montrant les niveaux d'expression des protéines sont en cours de réalisation.

B. Validation de la surexpression de LOX ou LOXL2 dans la lignée MCF-7

De la même manière, nous avons validé la surexpression de LOX ou de LOXL2 dans les cellules MCF-7 LOX+ et MCF-7 LOXL2+ par qPCR et vérifié que l'expression des autres membres de la famille n'était pas altérée ou augmentée (fig. 53A-C). Bien que les cellules MCF-7 soient épithéliales et que les protéines LOX et LOXL2 soient connues pour induire l'EMT, les cellules ne semblent pas changer de phénotype en culture (fig. 53D). Des études complémentaires par qPCR et western blot pour déterminer le niveau d'expression des protéines comme la E ou la N-cadhérine sont nécessaires pour confirmer le statut des cellules.

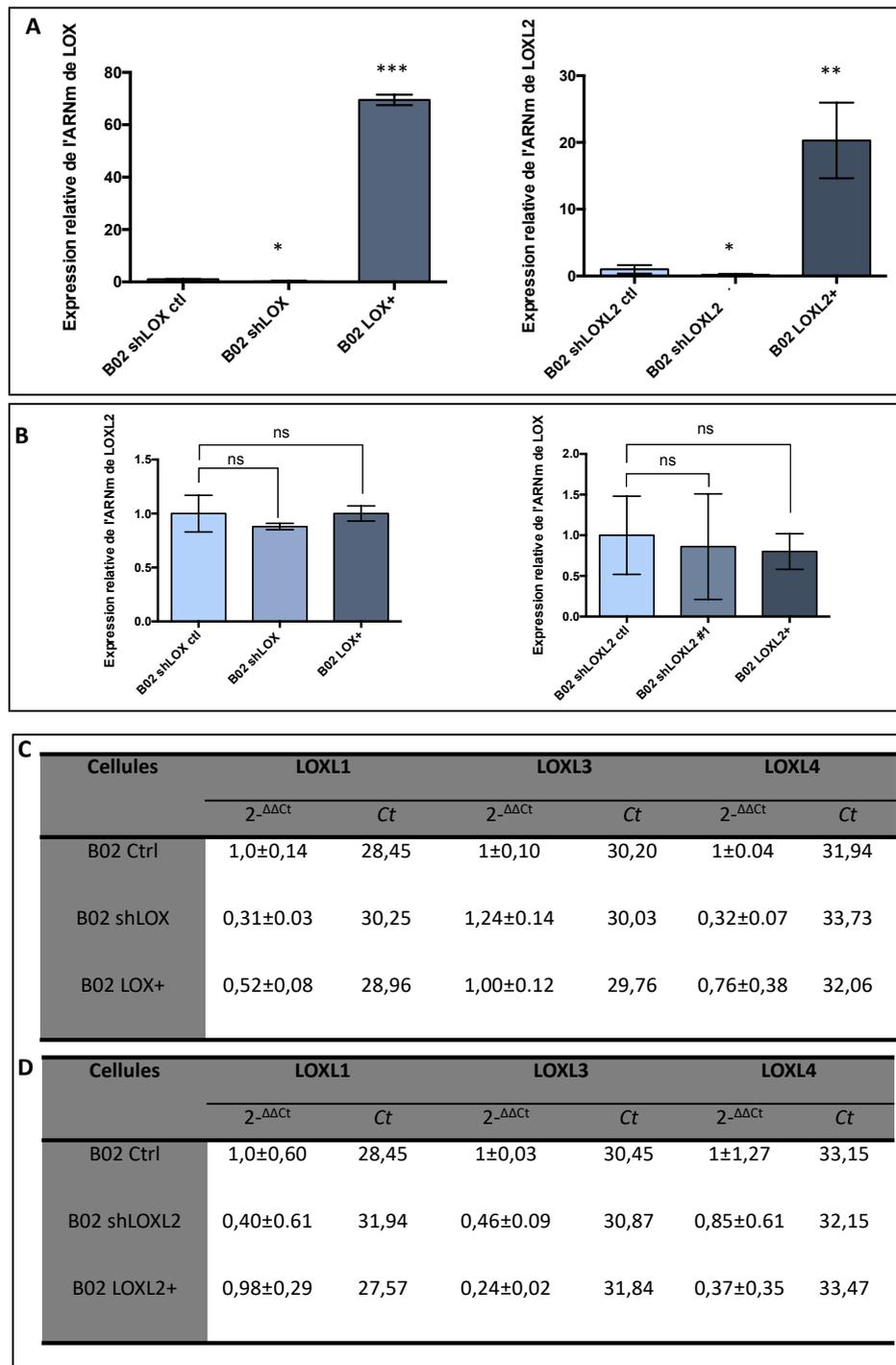


Figure 52: Validation de la surexpression de LOX ou de LOXL2 dans la lignée B02

A-B. Le niveau d'expression des ARNm LOX et LOXL2 est évalué par RT-qPCR. Les résultats sont représentés sous forme de niveau d'expression relatif, normalisé sur l'expression du gène de ménage L32, et rapporté à l'expression de la lignée CTL. C-D Tableau représentant l'expression de LOXL1, LOXL3, et LOXL4 dans nos différentes lignées. Les résultats, exprimés en Ct, sont normalisés sur l'expression du gène de ménage L32, rapportés à l'expression de la lignée CTL. ns = non significatif, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

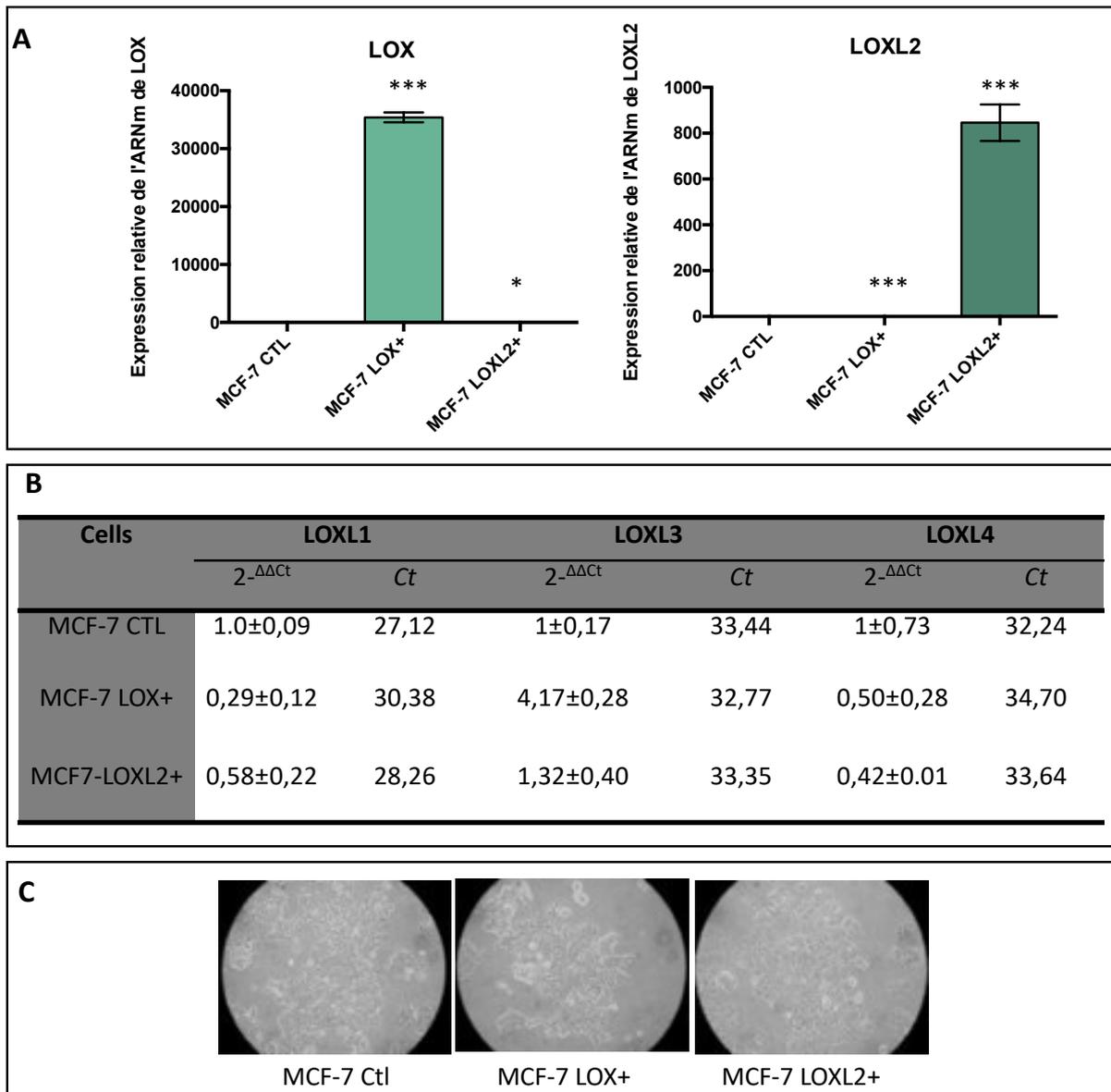


Figure 53: Validation de la surexpression de LOX ou LOXL2 dans la lignée MCF-7

A Le niveau d'expression des ARNm LOX et LOXL2 est évalué par RT-qPCR. Les résultats sont représentés sous forme de niveau d'expression relatif, normalisé sur l'expression du gène de ménage L32, et rapporté à l'expression de la lignée CTL. B. Tableau représentant l'expression de LOXL1, LOXL3, et LOXL4 dans nos différentes lignées. Les résultats, exprimés en Ct, sont normalisés sur l'expression du gène de ménage L32 rapportés à l'expression de la lignée CTL. C. Photo représentative de chaque lignée en culture. **p<0,01 ; ***p<0,001.

VI. Caractérisation fonctionnelle des lignées cellulaires qui surexpriment LOX ou LOXL2

Pour les mêmes raisons que celles abordées lors des expérimentations avec nos cellules inhibées en LOX et LOXL2, nous avons pratiqué une caractérisation fonctionnelle des cellules qui surexpriment LOX ou LOXL2 *in vitro*.

A. Effet de la surexpression sur la prolifération

Nous avons cherché à savoir si la surexpression de LOX ou LOXL2 dans les lignées B02 et MCF-7 allait induire une modulation de la prolifération.

La surexpression de LOX dans les B02 ne modifie pas la prolifération des cellules. Par contre, la surexpression de LOXL2 entraîne une diminution faible mais significative (fig. 54A). Par contre, cet effet n'est pas retrouvé dans les MCF-7 (fig. 54B).

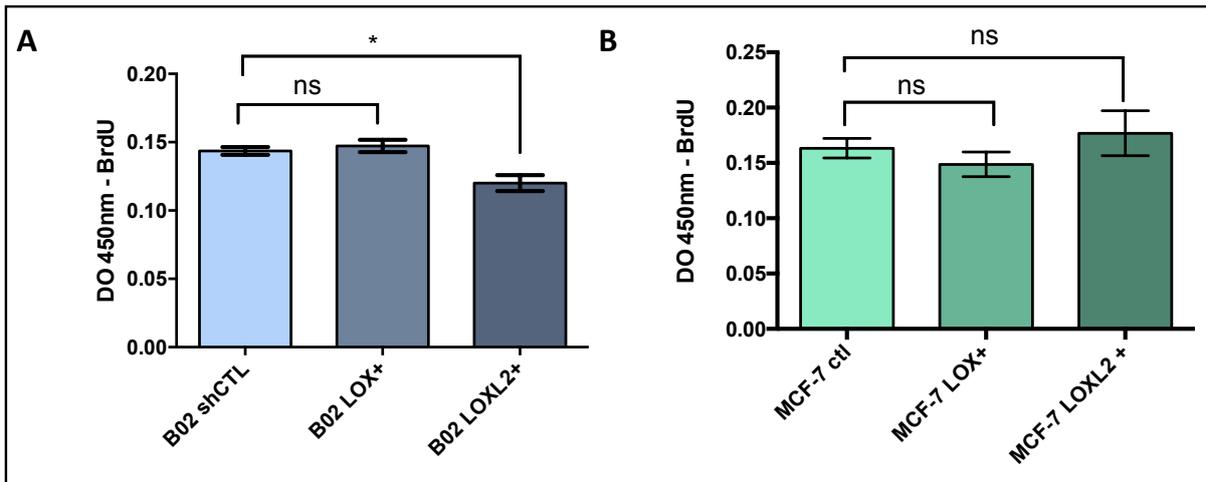


Figure 54: Test d'incorporation de BrdU en présence ou non de LOX ou LOXL2

Test de prolifération sur les différentes lignées B02 (A) et MCF-7 (B) par incorporation de BrdU pendant 16h puis lecture de l'absorbance à 450 nm. (n=3). * p<0,05, ns = non significatif.

B. Effet de la surexpression sur la migration

Après nous être intéressés à la prolifération, nous avons cherché à savoir si la surexpression de LOX ou LOXL2 allait moduler les capacités migratoires de nos cellules. Nous avons réalisé des tests de migration en chambre de Boyden comme décrit dans la partie inhibition.

La surexpression de LOX ou de LOXL2 ne module pas les capacités migratoires des cellules B02 LOX+ ou B02 LOXL2+ (fig. 55B). Les capacités migratoires des cellules MCF-7, qui sont des cellules qui migrent très peu, ne sont pas augmentées non plus quel que soit le niveau d'expression de nos enzymes d'intérêt (fig. 55C).

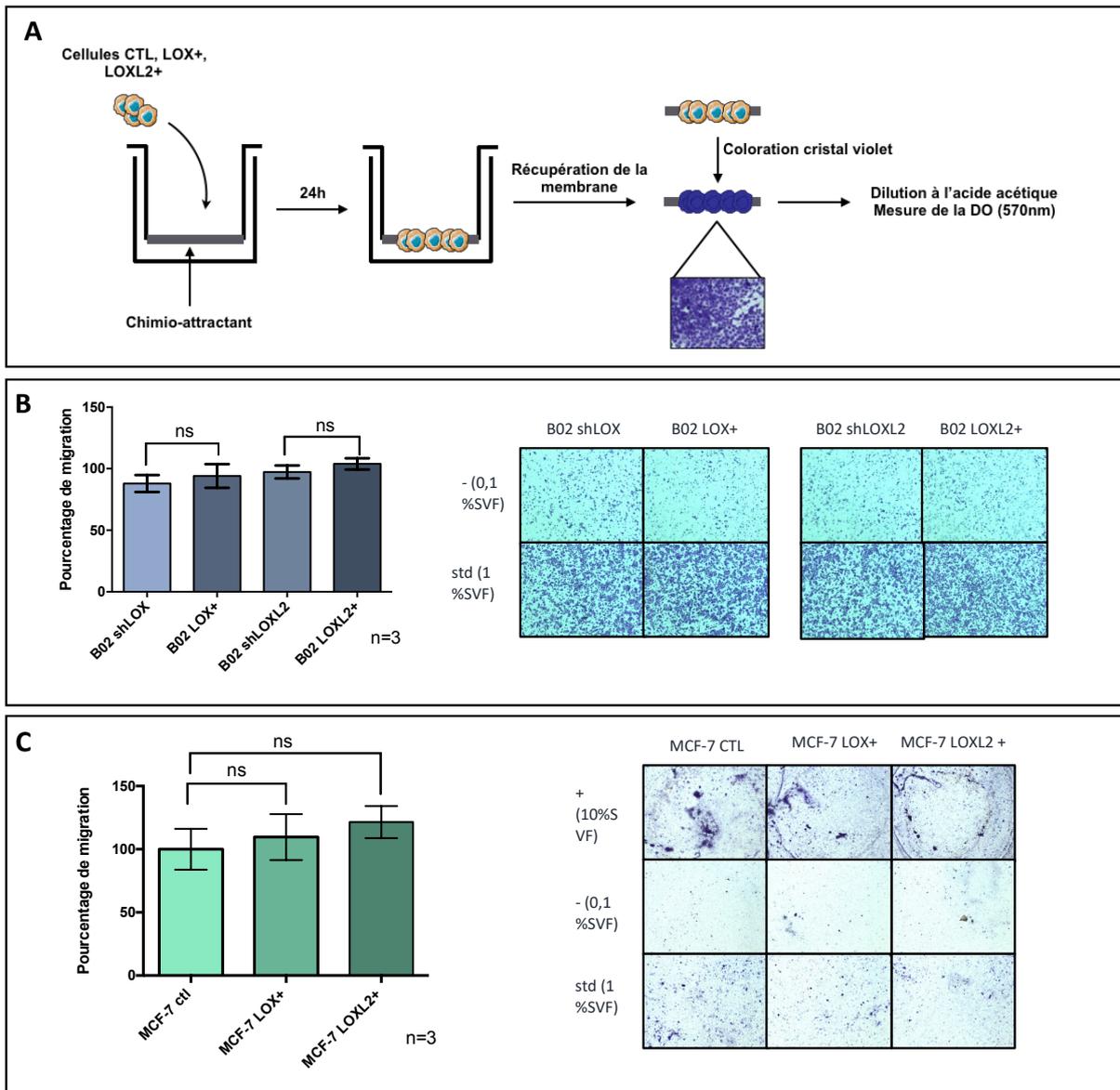


Figure 55: Étude de l'effet de la surexpression de LOX ou de LOXL2 sur la migration

A. Schéma représentatif du protocole expérimental. B-C. Les analyses de migration sont présentées sous forme de pourcentage, rapportées au contrôle, et accompagnées d'images représentatives pour chacune des conditions (B : B02 ; C : MCF-7). (n=3, 4 puits par condition). ns = non significatif.

C. Effet de la surexpression de LOX ou LOXL2 sur l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire

Par la suite, nous avons regardé si la surexpression de LOX ou de LOXL2 induisait des modifications sur les capacités des cellules à interagir avec les composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène de type I et la fibronectine.

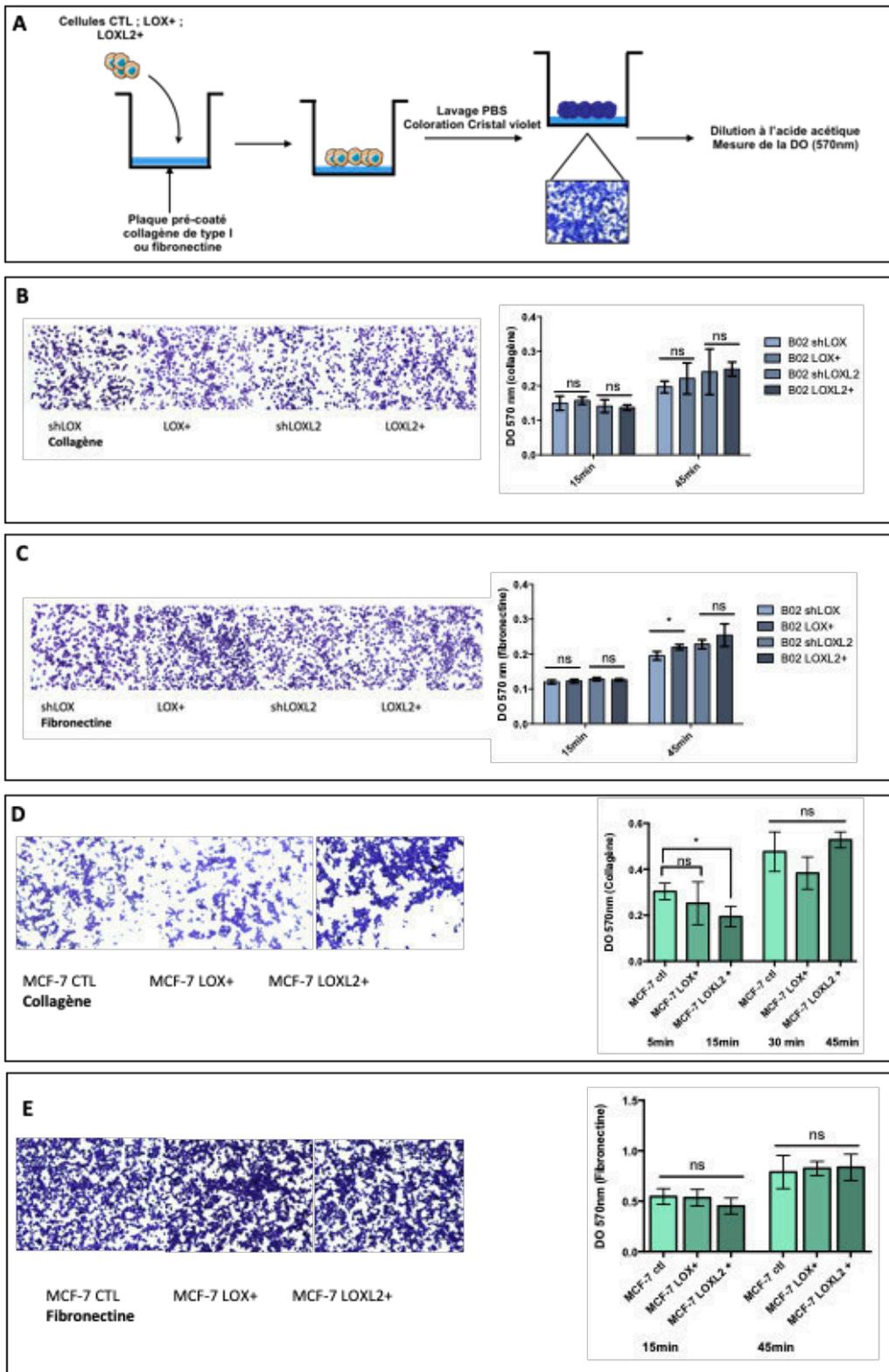


Figure 56: Étude la surexpression de LOX ou LOXL2 sur les capacités d'adhésion des lignées cellulaires aux composants de la matrice extracellulaire

A. Schéma représentatif du protocole expérimental. B-E Photographies représentant l'adhésion sur collagène de type I ou sur la fibronectine pendant 45 min pour chaque condition expérimentale et graphiques de quantification de la coloration au cristal violet par lecture de DO à 570nm (B, C : B02 ; D, E : MCF-7). (Résultat représentatif d'une des expérimentations réalisés n=3, 8 puits par condition). * $p < 0,05$, ns = non significatif.

La figure 56 montre que la surexpression de LOX augmente légèrement mais significativement l'adhésion des B02 sur la fibronectine à 45 min. Aucun effet n'a été observé sur le collagène de type I. Dans les MCF-7 la surexpression de LOX n'a aucun effet. Concernant LOXL2, aucun effet n'a été observé dans les B02 mais on voit une tendance à la diminution de l'adhésion des MCF-7 LOXL2+ sur le collagène de type I à 15min. si nous n'observons plus cet effet à 45 min c'est sans doute dû au fait que nous avons atteint un plateau d'adhésion et que les différences ne sont plus observables.

D. Effet de la surexpression de LOX ou LOXL2 sur l'adhésion aux cellules de la niche endostéale

Après nous être intéressé à l'adhésion avec les composants extracellulaires, nous avons analysés les interactions avec les cellules composant la niche endostéale. Ces expériences n'ont pu être réalisées qu'avec la lignée B02, les cellules MCF-7 ne possédant pas de vecteur d'expression pour la GFP (cf. Matériel et méthode fig.38).

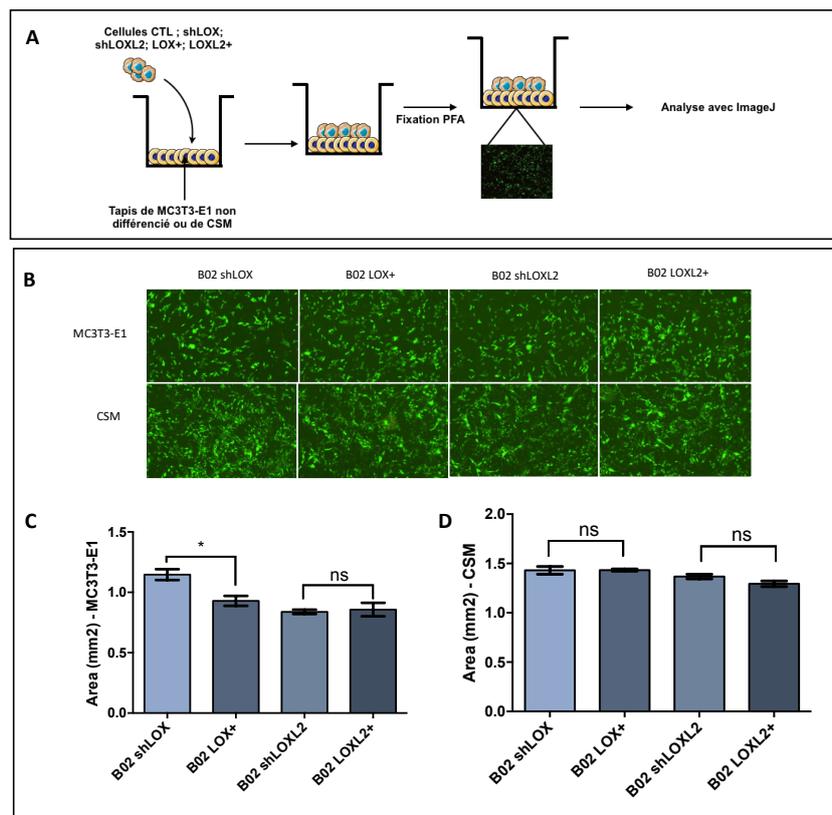


Figure 57: Étude de l'effet de la surexpression de LOX ou LOXL2 dans la lignée B02 sur l'adhésion aux cellules composant les niches osseuses

*A. Schéma représentatif du protocole expérimental. B-Photographies représentant l'adhésion sur MC3T3-E1 ou sur CSM pour chaque condition expérimentale. C- Graphiques de quantification de l'adhésion. (Résultat représentatif d'une des expérimentations réalisées n=3, 6 puits par condition). * $p < 0,05$, ns = non significatif.*

Comme le montre la figure 57, les B02 LOX+ adhèrent légèrement moins sur les MC3T3-E1, mais nous n'avons pas observé de différence significative sur les CSM. La surexpression de LOXL2 n'a aucun effet.

E. Effet de la surexpression de LOX ou LOXL2 sur la capacité des cellules à former des organoïdes homotypiques ou hétérotypiques en culture 3D

Dans le but de finir la caractérisation fonctionnelle de nos lignées surexprimées et de nous rapprocher d'un modèle qui mime un peu plus ce qui peut se passer *in vivo*, nous avons réalisé des tests de formation d'organoïdes avec nos cellules +/-LOX et +/-LOXL2. Que ce soit dans les B02 ou les MCF-7, la modulation de LOX et LOXL2 ne modifie pas le nombre et la taille des sphères homotypiques (Fig. 58).

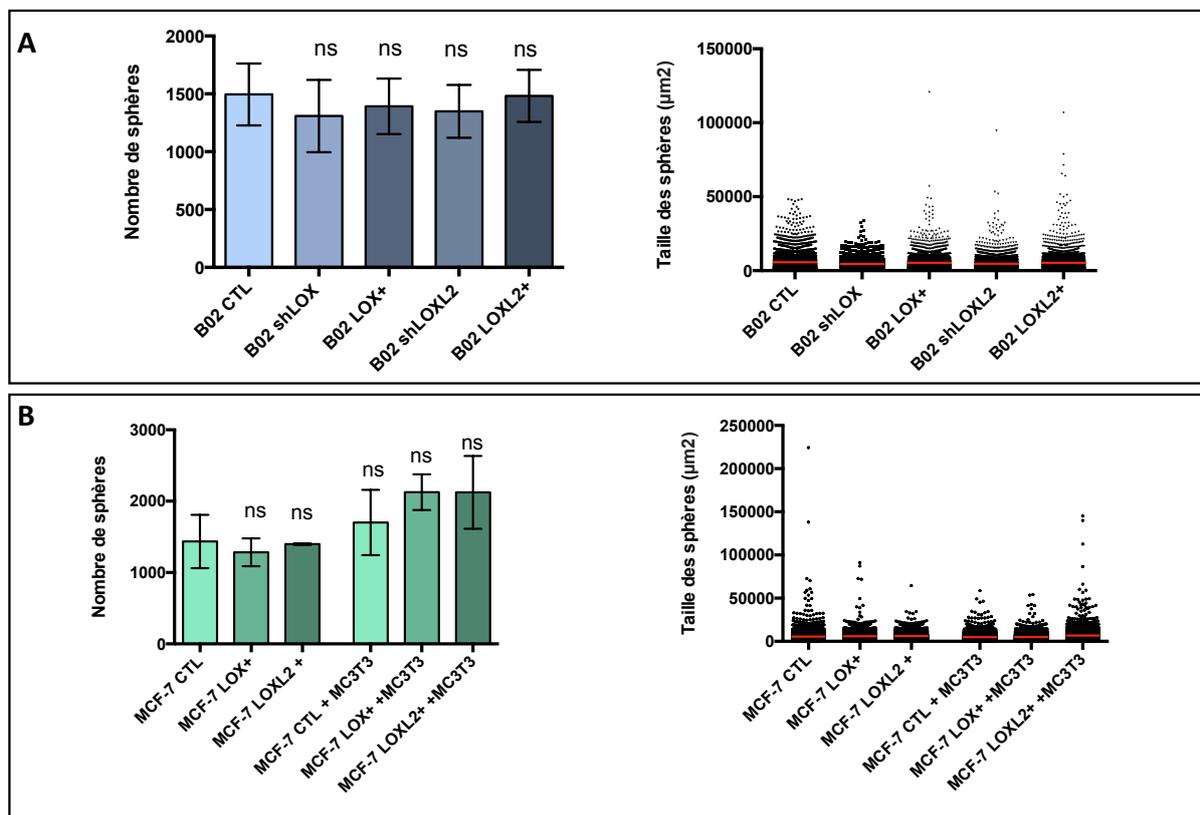


Figure 58: Étude de l'effet de la surexpression de LOX ou LOXL2 sur la capacité des cellules tumorales B02 et MCF-7 à former des organoïdes homotypiques

Pour chaque lignées et conditions, le nombre de sphère a été analysé. La répartition de taille des sphères a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (A : B02 B: MCF-7, MC3T3-E1). (planche A n=3 ; et B n=2, 3 puits par condition). ns = non significatif.

VII. Étude de l'impact de la surexpression de LOX ou de LOXL2 sur la tumorigénèse *in vivo*

Malgré le peu de résultats probants obtenus *in vitro*, et afin d'approfondir notre étude sur le rôle de LOX et de LOXL2 dans la formation des métastases osseuses, nous avons testé l'effet de leur augmentation dans différents protocoles *in vivo*.

A. Étude de la surexpression de LOX ou LOXL2 sur la formation de la lyse osseuse

1. Étude des effets de la surexpression de LOX sur la formation de métastases osseuses

Afin de confirmer les données de la littérature et les résultats obtenus dans le modèle du cancer colorectal, nous avons dans un premier temps choisi de nous intéresser aux effets de la surexpression de LOX sur la formation de métastases osseuse. Nous avons injecté les lignées cellulaires B02 shLOX et B02 LOX+ dans l'artère caudale de souris BALB/C nude immunodéficientes. Durant 35 jours, les animaux ont été suivis chaque semaine en bioluminescence et radiographie. Le nombre de souris par groupe diffère ici en raison des difficultés techniques inhérentes à cette expérimentation.

Comme le montre la figure 59B, à 35 jours post-injection, la bioluminescence semble plus élevée dans les animaux injectés avec les cellules B02 LOX+ comparés à ceux injectés avec les cellules B02 shLOX. Ceci indique la présence d'une masse tumorale plus importante dans ces animaux. Ces résultats ont été analysés par le traitement des données radiographiques mettant en évidence une tendance à l'augmentation, non significative du aux faibles nombres d'animaux ayant survécu à l'injection, des surfaces ostéolytiques dans les membres postérieurs des souris injectées avec les cellules B02 LOX+ comparées à celles observées dans le groupe shLOX (Fig. 59C-D). Paradoxalement les Bv/Tv étaient identiques dans les 2 conditions (fig. 59E). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les analyses Bv/Tv de routine sont pratiquées sur le tibia des souris alors que de nombreuses lésions ont été observées au niveau du fémur des animaux. Une analyse complémentaire des fémurs ainsi qu'une analyse histologique des pattes métastatiques sont en cours pour compléter ces données. Le taux de mortalité des animaux lors de cette expérience s'est avéré bien plus important que d'ordinaire. Il faudrait refaire l'expérience pour augmenter notre échantillonnage à analyser,

ce qui pourrait renforcer nos données et leur force statistique. Malgré tout, nous pouvons dire qu'elles sont en accord avec ce que nous avons observé dans le colon et avec ce qui a été décrit par d'autres, à savoir que l'expression de LOX semble favoriser la colonisation osseuse et la formation de métastases ostéolytiques (Reynaud et al. 2017 ; Eler et al. 2006 ; Cox et al. 2015).

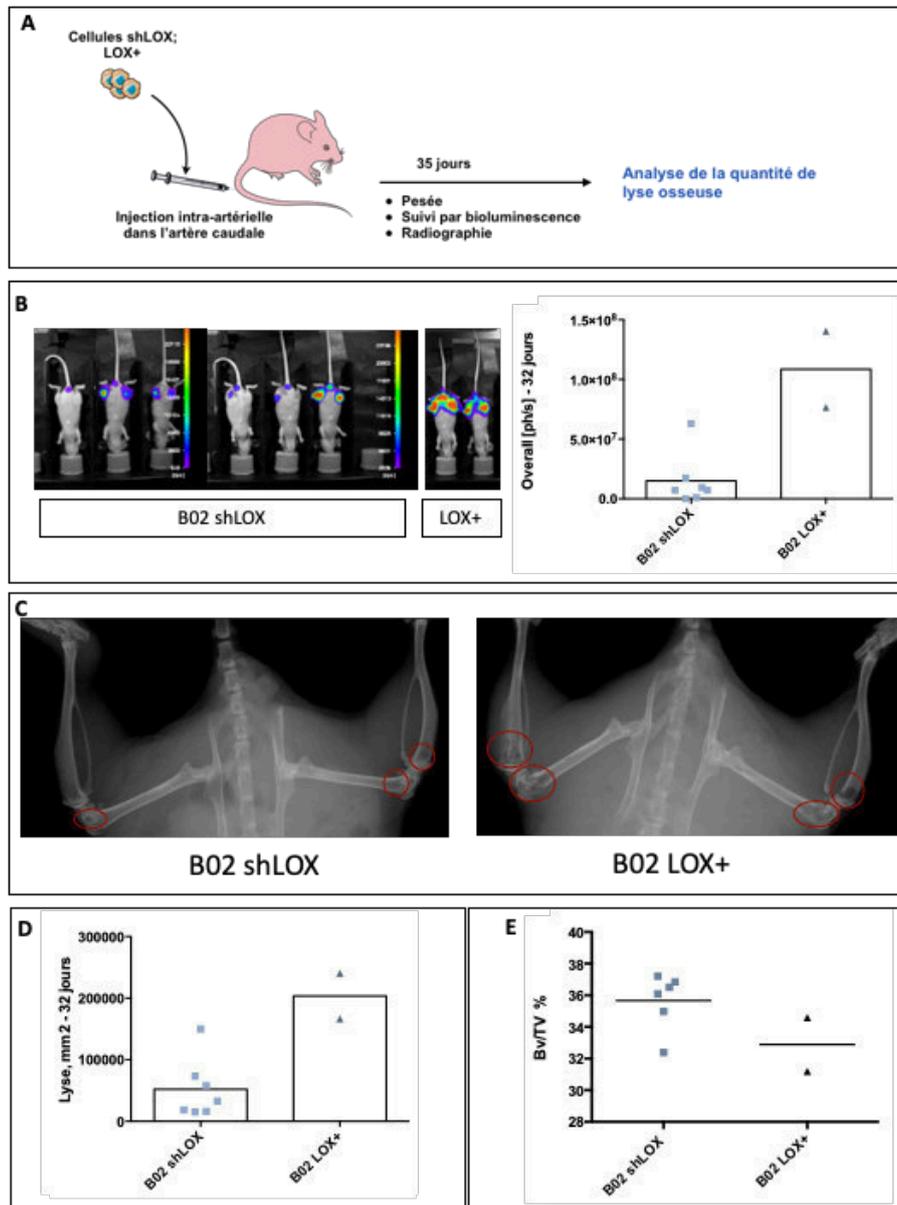


Figure 59: Effet de la surexpression de LOX sur la formation de métastases ostéolytiques

A. Schéma représentatif du protocole expérimental B. Images de bioluminescence dans les souris 35 jours après l'injection et graphiques correspondant C. Radiographie de souris avec lyse osseuse entouré en rouge D. Quantification de la lyse osseuse en mm², mesurée à partir des radiographies. E. Quantification du Bv/Tv. (n=6 B02 shLOX ; n=2 B02 LOX+)

2. Étude des effets de LOXL2 sur la formation de métastases osseuses

Face au peu de données disponibles dans la littérature en ce qui concerne le rôle de LOXL2 dans la formation de métastases osseuses, nous avons pratiqué un protocole *in vivo* et comparé la formation de lyse osseuse dans des animaux injectés avec des cellules B02 shLOXL2 ou LOXL2+.

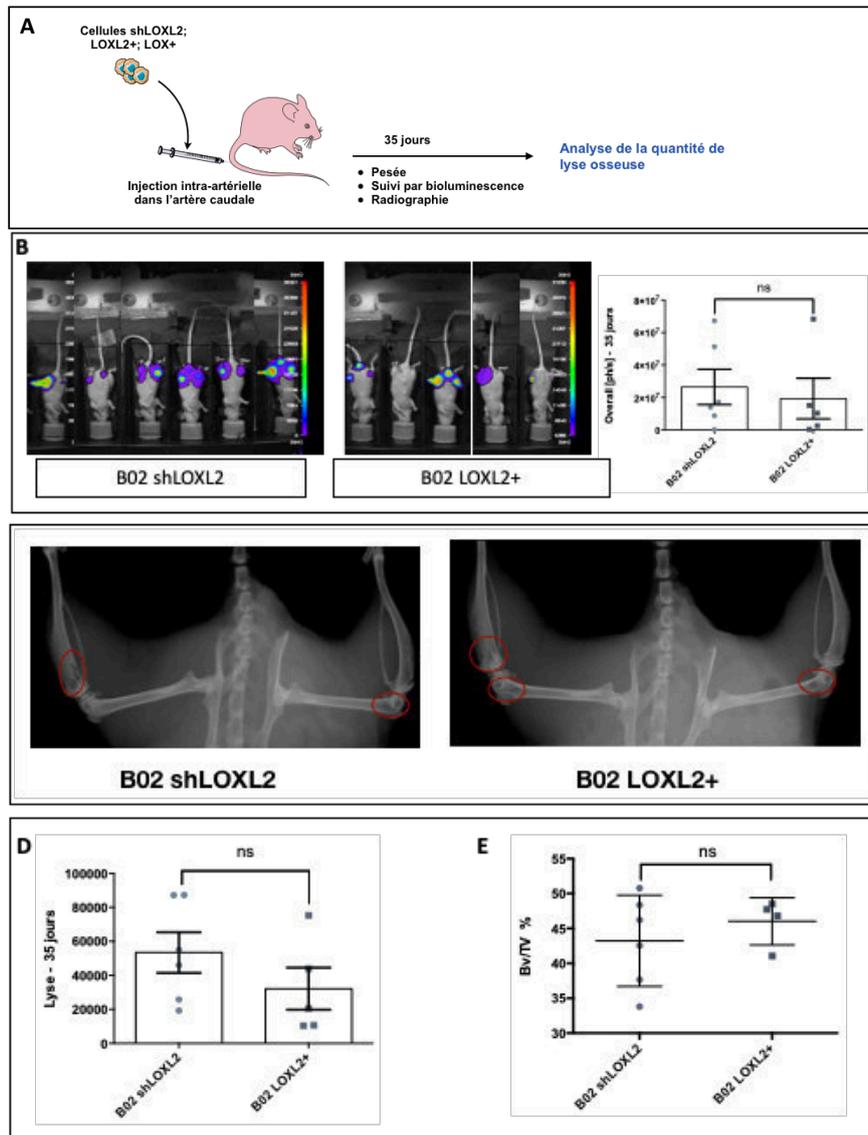


Figure 60: Effet de la surexpression de LOXL2 sur la formation de métastases ostéolytiques

A. Schéma représentatif du protocole expérimental B. Images de bioluminescence dans les souris 35 jours après l'injection et graphique correspondant C. Radiographie de souris avec lyse osseuse entourée en rouge D. Quantification de la lyse osseuse en mm², mesurée à partir des radiographies. E. Quantification du Bv/TV (n=6 B02 shLOXL2 ; n=5 B02 LOXL2+). ns = non significatif.

Comme le montre la figure 60, à 35 jours post-injection, on observe que la bioluminescence est équivalente entre les 2 groupes d'animaux (Fig. 60B). Il en va de même pour la lyse et les

Bv/Tv (Fig. 60C-E). Comme dit précédemment, un calcul du Bv/Tv sur le fémur des animaux ainsi que des analyses histologiques des pattes métastatiques est en cours.

LOXL2 semblerait donc avoir un rôle différent de LOX vis à vis de la formation de métastases osseuses ostéolytiques par les cellules tumorales mammaires, en ne favorisant pas la formation des métastases ostéolytiques.

3. Injection en sous-cutanée des lignées B02 shLOX, LOX+, shLOXL2, LOXL2+

Dans le but de mieux comprendre les résultats obtenus, indiquant que la modulation de LOX et de LOXL2 aurait des effets différents sur la prise tumorale osseuse, nous nous sommes demandé si c'était lié uniquement à leur capacité à s'ancrer dans l'environnement osseux, ou si leur potentiel tumoral proprement dit était également impacté. Nous avons donc décidé de faire des études de tumorigénèse, en injectant nos cellules en sous-cutanée dans des souris BALB/c nude afin d'analyser la prise et la croissance tumorale.

Nous avons réalisé 9 injections pour chaque groupe. Après 35 jours, les souris ont été sacrifiées puis les tumeurs ont été réséquées, pesées et photographiées (fig. 61A).

En termes d'incidence, la surexpression de LOX et de LOXL2 a eu un effet légèrement positif avec 8 tumeurs sur 9 obtenues, contre 6 sur 9 pour les cellules shLOX et shLOXL2 (fig. 61B). Par contre, seule la surexpression de LOXL2 conduit à l'obtention de tumeurs plus volumineuses, même si nous n'avons pas vu de différence dans le poids moyen (fig. 61C, D).

Nous avons utilisé une partie de ces tumeurs pour faire de l'histologie. Les résultats obtenus n'ont aucune valeur statistique puisque nous n'avons pas suffisamment d'échantillons, ils servent juste à illustrer les expériences préliminaires que nous avons entrepris.

Les cellules B02 shLOX, LOX+, shLOXL2, possèdent des niveaux de prolifération équivalents *in vitro*. Nous avons donc mesuré l'index de prolifération des cellules au sein de la tumeur grâce à un marquage avec un anticorps anti-Ki67 humain sans observer de différence en fonction des conditions (Fig. 57E). La densité de micro-vaisseaux a elle aussi été mesurée de manière préliminaire grâce à un marquage de CD31 murin dans les tumeurs. Comme pour l'indice de prolifération, la quantité de micro-vaisseaux est équivalente dans les tumeurs B02shLOX, et

LOX+. Le marquage a par contre tendance à être plus important dans les tumeurs shLOXL2 comparé aux tumeurs LOXL2+ (Fig. 60F). Ces expériences nécessitent d'être reproduites avant d'en tirer quelque conclusion que ce soit.

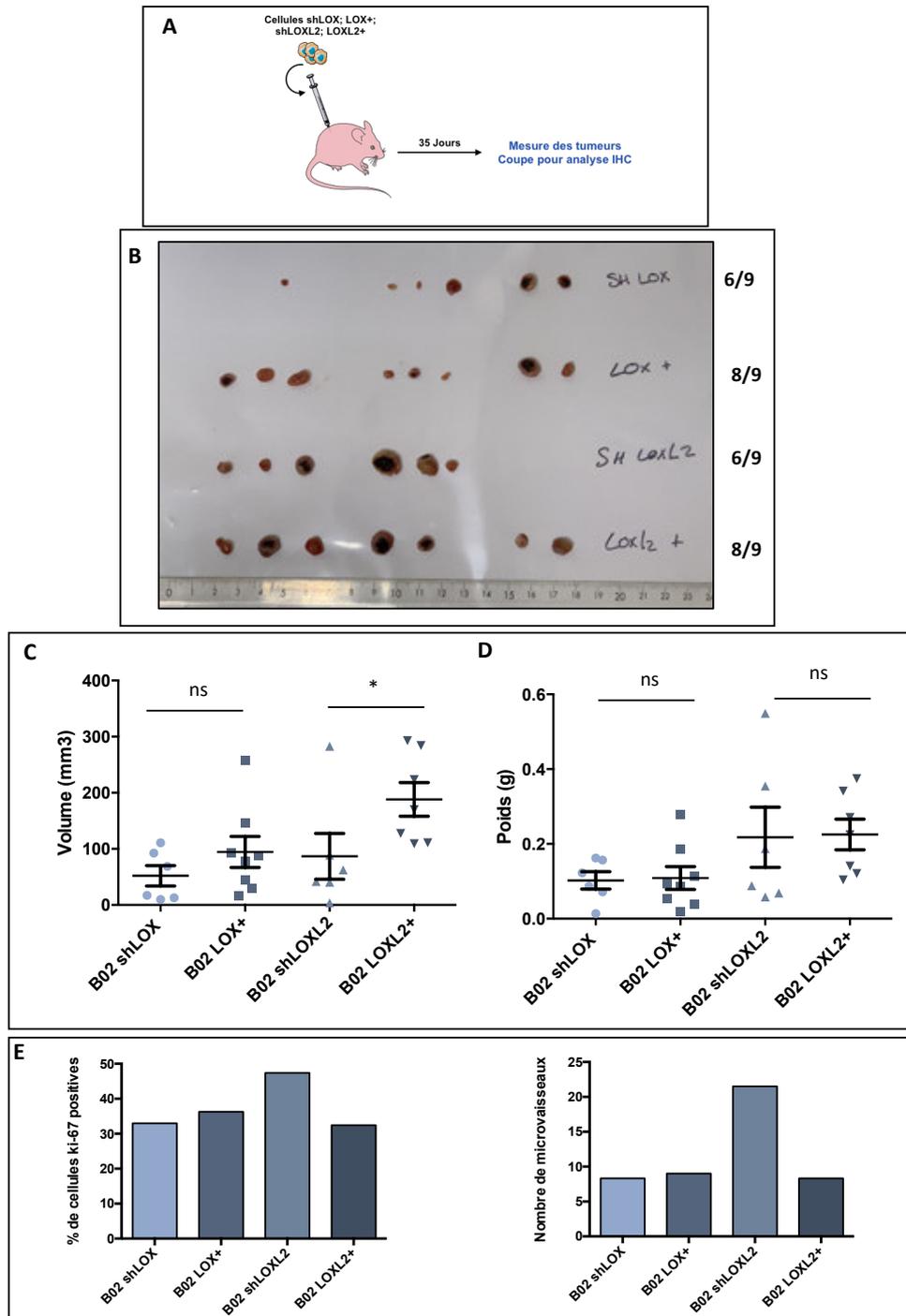


Figure 61: Implication de LOX et LOXL2 dans la formation tumorale

A. Schéma représentatif du protocole expérimental (n=9) B. Photo des tumeurs réséquées. C, D. Graphes représentant les mesures de volume et de poids des tumeurs E-. Quantification des cellules Ki-67 positives en IHC reflétant l'index de prolifération des cellules dans les tumeurs réalisées sur deux coupes par groupe. F- Quantification des cellules CD31 positives en IHC reflétant la densité de micro-vaisseaux dans les tumeurs réalisées sur deux coupes par groupe. *p<0.05, ns = non significatif.

Des expériences similaires sont en cours avec les cellules MCF-7 CTL, LOX+ et LOXL2+. Comme ce sont des cellules hormonaux-dépendantes, nous avons traité les animaux aux œstrogènes avant l'implantation des cellules tumorales. Malgré tout, la prise tumorale se fait très lentement avec ce modèle cellulaire. Nous suivons donc les animaux depuis 3 mois, mais sommes encore loin d'avoir atteint la formation de tumeurs de tailles satisfaisantes pour la résection et l'analyse.

Ces résultats préliminaires, sans réelles différences flagrantes entre les groupes, indiqueraient que si LOX et LOXL2 se comportent différemment en terme de promotion des métastases osseuses, cela serait dû à des différences d'ancrage ou de survie dans l'environnement, ou à la capacité des cellules tumorales à moduler la balance du remodelage osseux, plutôt qu'à leur capacité intrinsèque à former des tumeurs.

4. Les effets de LOX ou LOXL2 secrétées sur l'envahissement de la niche osseuse

Avec l'équipe du Dr. UZAN, notre laboratoire a développé un modèle de niche osseuse humanisée injectée au niveau de la face dorsale de souris immunodéficientes NOD/SCID âgées de 4 semaines. Cet os ectopique est réalisé par une injection sous cutanée d'un mélange composé de poudre d'hydroxyapatite, de phosphate de calcium et de CSM humaines afin de mimer le plus possible l'os humain dans les souris. Les travaux du Dr Margaux Bernard au sein de notre laboratoire ont permis de valider le modèle de niche osseuse humanisée, et elle a démontré que les cellules impliquées dans le remodelage osseux sont présentes dans cette niche et que les cellules B02 sont capables de l'envahir (Fig. 62A).

Nous avons utilisé ce modèle lors d'une étude préliminaire pour analyser les effets induits par LOX et LOXL2 circulantes sur la colonisation de la niche osseuse. Cette expérience avait pour but de déterminer si les enzymes exprimées dans des tumeurs primaires pouvaient préparer un environnement osseux et le rendre propice à l'ancrage des cellules tumorales, comme cela avait été montré dans le modèle colorectal ou au niveau de la préparation de la niche pré-métastatique pulmonaire (Reynaud et al. 2017 ; Erler et al. 2009). Nous avons donc injecté des cellules B02 ctl et traité les animaux quotidiennement par injection intra-péritonéale avec les milieux conditionnés de nos cellules B02 shLOX, LOX+, shLOXL2 et LOXL2+ (Fig. 62).

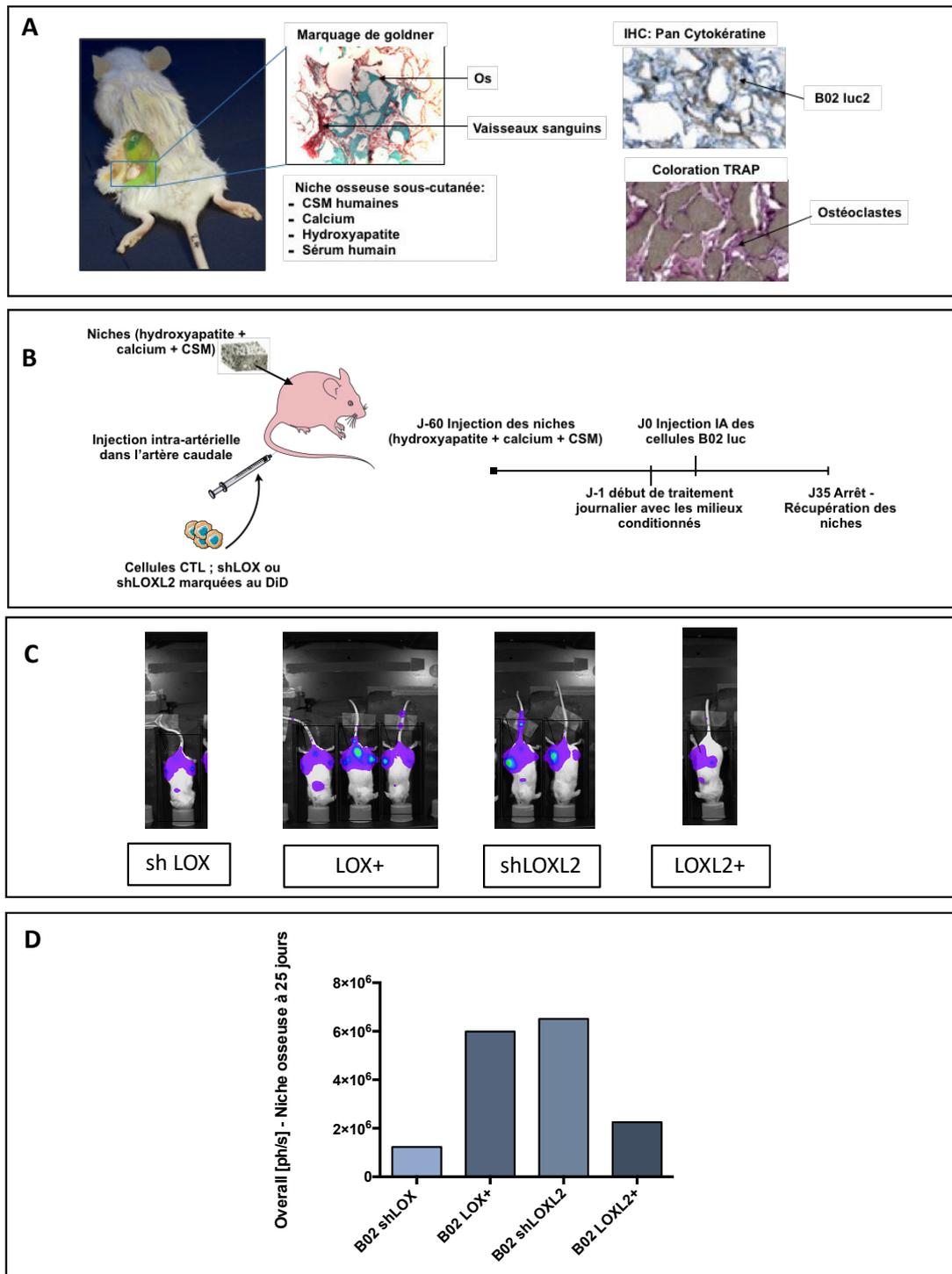


Figure 62: Étude des effets de LOX et LOXL2 sur la colonisation d'os ectopique humanisée par les cellules B02
 A. Description du modèle de niche osseuse humanisée. Les coupes de niches ont été marquées en IHC ce qui confirme la formation d'os néo synthétisé - marquage Goldner. Cette niche est colonisée par les cellules tumorales B02 - marquage pan-cytokératine et par les ostéoblastes - marquage TRAP B. Schéma représentatif du protocole expérimental. C-D. Suivi de la colonisation de la niche par bioluminescence (C) et graphique de quantification correspondant (D) (n=1 B02 shLOX et B02 LOXL2+, n=2 B02 shLOXL2, n=3 B02 LOX+).

Comme le montre la figure 62C, les souris sont bioluminescentes 35 jours après injection des cellules tumorales. La bioluminescence apparaît au lieu d'implantation des niches, et nous avons vérifié par radiographie que les pattes arrières n'étaient pas métastatiques. Ceci indique que ce sont bien les niches humanisées qui ont été colonisées par les cellules tumorales. La bioluminescence semble plus importante lors de l'ajout de milieux conditionnés LOX+ et shLOXL2, et moins importante avec les milieux conditionnés shLOX et LOXL2+ (Fig. 62C-D). Ces résultats sont préliminaires. En effet, ces niches sont faites dans des souris NOD/SCID transgéniques que nous croisons au laboratoire, et nous sommes donc tributaires des naissances. Il faudrait les refaire avec un nombre d'animaux plus conséquent pour augmenter la valeur statistique des données récoltées. De plus, l'analyse par immunohistochimie des niches collectées en fin de protocole est en cours afin de mieux quantifier le volume tumoral dans ces organes ectopiques. Cependant, ces résultats sont en accord avec toutes les tendances obtenues jusqu'à présent et semble indiquer que l'expression de LOX favorise la colonisation osseuse, alors que celle de LOXL2 non.

5. Les effets de LOX ou LOXL2 sur la différenciation ostéoclastique

La dernière question que nous nous sommes posé, concernait la capacité de nos différentes lignées tumorales à déréguler l'homéostasie osseuse, notamment en agissant sur la différenciation des ostéoclastes. Nous avons donc pratiqué des tests d'ostéoclastogénèse *in vitro* en présence de milieux conditionnés de cellules B02 shLOX, LOX+, shLOXL2 et LOXL2+, et de cellules MCF-7 CTL, LOX+ et LOXL2+ (fig.63).

Cette expérience n'a été réalisée qu'une fois et n'a pas donné de résultats différents quelles que soient les conditions testées. Ni la modulation de LOX ou LOXL2, ni le type de cellule pour produire les milieux conditionnés n'a eu d'effet (fig.63). Il a été montré récemment que la quantité de RANKL utilisée classiquement dans les tests d'ostéoclastogénèse (25 ng/ml) pouvait être trop importante pour pouvoir observer des effets de traitements par molécules chimiques ou par des milieux conditionnés (Ell et al., Cancer Cell 2013). Des tests de mise en point avec une plus faible quantité de RANKL (20 ng/ml) sont donc en cours au laboratoire.

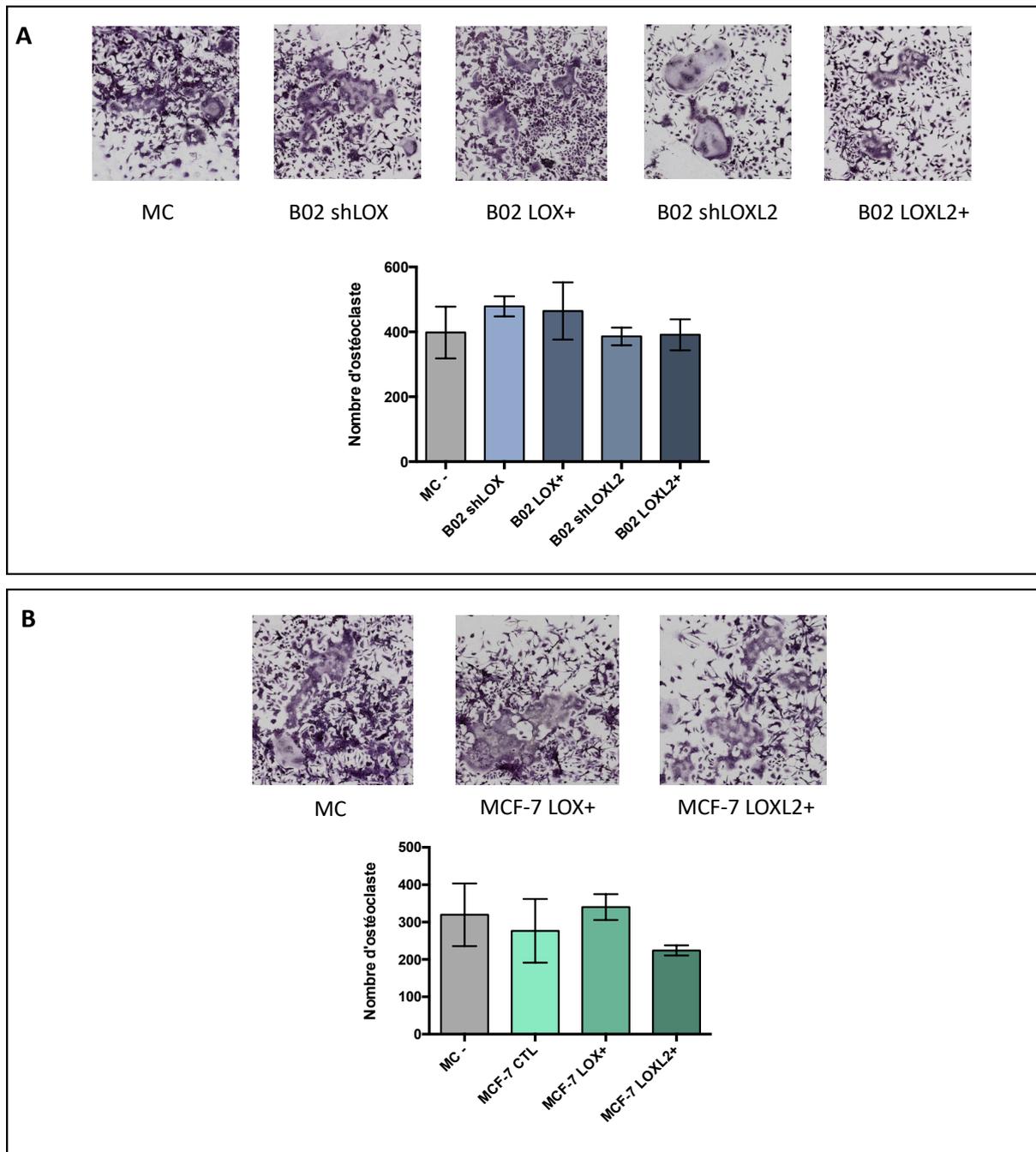


Figure 63: Étude de la modulation de LOX ou LOXL2 sur la différenciation des ostéoclastes *in vitro*

A-B Photographies représentatives des ostéoclastes marqués au TRAP, et graphiques représentant le nombre moyen d'ostéoclastes par conditions (A : B02 ; B : MCF-7).

Chapitre V : Bilan & discussion

Il a été démontré dans la littérature qu'une surexpression de LOX et LOXL2 était impliquée dans de nombreux cancers. Dans le cancer du sein hormono-indépendant notamment, une surexpression de LOX ou de LOXL2 est associée à des cancers plus agressifs, avec des taux de survie globale et de survie sans métastases réduits (Erler et al. 2006; Barker et al. 2011; Ahn et al. 2013). Le rôle pro-tumoral de LOX et LOXL2 est admis par la communauté scientifique et n'est pas à ce jour soumis à controverse.

J'ai pour ma part étudié l'impact des modulations de LOX dans un modèle de cancer colorectal, et comparé celui des modulations de LOX et LOXL2 dans un modèle de cancer du sein. Lors de nos études sur le cancer du côlon, nous avons mis en évidence que LOX, exprimée par les cellules tumorales à distance ou dans l'os, permettait l'ancrage des cellules tumorales dans la moelle osseuse en favorisant l'adhésion des cellules tumorales sur le collagène de type I. Via l'induction de la sécrétion d'IL-6, elle active la différenciation des ostéoclastes et par conséquent la lyse osseuse (Reynaud et al. 2017). Les carcinomes du côlon ne sont pas les cancers les plus ostéotropiques et forment majoritairement des métastases pulmonaires et hépatiques (Nguyen, Bos, et Massagué 2009). Si le nombre de patients avec des métastases osseuses de cancers coliques augmente, c'est sans doute parce que les progrès thérapeutiques ont permis d'allonger la durée de vie, et le développement de métastases osseuses tardives. Si ce modèle n'est pas idéal en termes de transposition à la clinique, la formation de métastases osseuses tardives indique que la moelle doit être un réservoir important pour les cellules tumorales disséminées, et donc en fait un bon modèle pour étudier l'ancrage des cellules tumorales. Il nous a cependant semblé important de réaliser des études dans un modèle plus pertinent cliniquement, et nous avons choisi le cancer du sein. En effet, l'os est un site de métastases particulièrement fréquent de ces tumeurs. Nous nous sommes ainsi demandé si tout comme LOX, LOXL2 favorisait la formation de métastases osseuses ostéolytiques de cancer du sein dans des lignées de cellules tumorales humaines. De plus, une comparaison directe de l'action de LOX et de LOXL2 dans la formation des métastases osseuses de cancer du sein n'avait encore jamais été faite. Nous avons de plus cherché à approfondir les connaissances sur l'implication des LOXs dans la formation de métastases osseuse, en nous intéressant à l'ancrage précoce des cellules tumorales dans la moelle osseuse.

Pour débiter ce projet, nous avons criblé l'expression de LOX et LOXL2 dans différentes lignées de cancer du sein disponibles au laboratoire. Nous avons retrouvé la même association que celle identifiée lors d'études cliniques sur l'expression de LOX ou LOXL2. Ces études ont montré une corrélation entre l'expression des enzymes et le statut triple négatif des cellules (Leo et al. 2018; Ahn et al. 2013). Dans le but d'analyser la fonction de ces enzymes dans le développement du cancer du sein, nous avons donc inhibé ou surexprimé leur expression. Nos expériences d'inhibition n'ont pas donné de résultats probants ni *in vitro* ni *in vivo*, bien que cette stratégie ait été utilisée avec succès par un autre laboratoire (Erlor et al.2006). Dans nos travaux sur le colon, la surexpression de LOX a donné des résultats significatifs (Reynaud et al.2017, cf. Annexe 1). Une telle stratégie a également été utilisée avec succès dans la lignée parentale des B02, les MDA-MB-231 et dans les MCF-7 dans la littérature (El-Haibi et al. 2012).

La modulation d'expression de LOX ou de LOXL2 ne semble pas impacter de manière importante les comportements qui favorisent le développement tumoral et la formation de métastase *in vitro*.

Nous avons ainsi pu montrer que la surexpression de LOX n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Reynaud et al., 2017 ; El-Haibi et al. 2012 ; Erlor et al. 2009). A l'inverse, la surexpression de LOXL2 diminue légèrement la prolifération des cellules B02. Ces tests de prolifération ont été réalisés par incorporation de BrDu pendant 24h. Ce temps est peut-être trop court pour mettre en évidence d'autres différences significatives ou plus marquées. Comme on peut le voir sur cette figure schématique d'une prolifération entre cellules malignes et cellules normales, la prolifération cellulaire est reflétée par une courbe sigmoïde. Pour confirmer les résultats obtenus, il serait donc intéressant de faire des tests de prolifération en cinétique sur des temps plus longs pouvant aller jusqu'à 8 jours (fig.64).

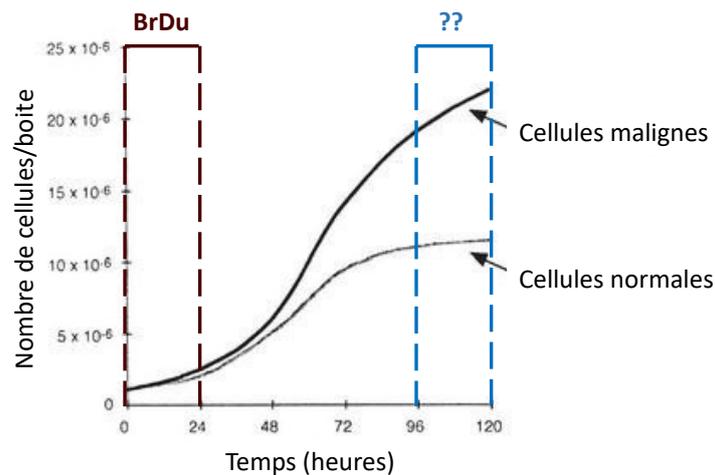


Figure 64: Courbe schématique de prolifération cellulaire
(Adapté de (Harel 2008))

Dans la littérature, les surexpressions de LOX ou LOXL2 ont été décrites comme induisant une augmentation des capacités migratoires des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (Payne et al. 2005 ; Hollosi et al. 2009). La différence de résultat peut s'expliquer tout d'abord techniquement. En effet, leurs tests ont été réalisés sur des temps beaucoup plus courts, 5 heures contre 24 heures dans notre cas. Nous avons donc peut être atteint un plateau de migration. De plus, ils ont été réalisés sur des populations sélectionnées après dilution limite ou sélection clonale, alors que nous avons travaillé sur des populations non sélectionnées. Il se peut donc que les clones cellulaires sur lesquels ils ont travaillé ne reflètent pas l'hétérogénéité cellulaire, très importante dans les tumeurs, et augmentent les différences. Il est également à noter que les tests d'inhibition de LOX réalisés dans ces études, l'étaient avec du β APN, un inhibiteur chimique qui n'est pas spécifique. Ils ont donc potentiellement touché toutes les LOXs en même temps, voire d'autres oxydases.

Deux autres études, où les MDA-MB-231 ont été inhibées pour l'expression de LOX ou de LOXL2 via une technique de shARN, ont montré une diminution de la migration (Erler et al. 2006; Ahn et al. 2013). Au lieu d'utiliser des chambres de Boyden, ils ont réalisé des tests de cicatrisation sur 24h. Ce test consiste à provoquer un espace physique dans une monocouche de cellule, et de suivre le phénomène de migration qui comble cet espace par vidéo ou par prise de photos à différents moments dans le but d'analyser les intervalles de fermeture.

Il serait donc pertinent pour la suite de notre projet de pratiquer ce type de test. Mais également de refaire des études en chambres de Boyden à des temps plus courts, car cela permet d'avoir des informations sur la migration due au chimiotactisme. Enfin, il nous faudra tester l'effet du β APN sur la migration des cellules CTL, LOX+ et LOXL2+. Il est également indispensable de faire des études d'invasion, ce qui reflétera bien plus la dissémination métastatique que de simples tests de migration.

Nous avons également étudié l'effet de la modulation de LOX ou de LOXL2 sur l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire tel que le collagène de type I et la fibronectine car cela confère aux cellules tumorales une meilleure accroche, et favorise l'activation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération/l'invasion (Pickup, Mouw, et Weaver 2014). Contrairement à ce que nous avons observé dans le modèle colorectal où LOX favorisait nettement l'adhésion des cellules tumorales au collagène de type I, les différences d'adhésion des B02 +/-LOX sont très peu marquées (Reynaud et al., 2017). Les mécanismes utilisés par les cellules de cancer du sein semblent donc différents.

Nous avons également montré que l'inhibition de LOXL2 augmente légèrement l'adhésion des cellules triple négatives sur les protéines matricielles, et que sa surexpression entraîne une diminution de l'adhésion des MCF-7 sur le collagène de type I à temps court (cf. fig. 45 et fig. 56). Ces données suggèrent que LOXL2 pourrait agir sur l'ancrage des cellules tumorales à la matrice. Pour compléter cette partie du travail, nous envisageons de tester d'autres protéines matricielles, mais également des matrices dé-cellularisées, dans lequel les fibres de collagènes sont réticulées et organisées de manière plus proche de ce qui peut se passer *in vivo* que lorsque nous « coatons » des plaques de culture.

L'inhibition de LOX et de LOXL2 ne module pas la formation de métastases osseuses dans le modèle de cancer du sein B02.

Au vu des résultats que nous avons obtenus avec les cellules de cancer colorectal, qui n'exprimaient pas LOX et dont l'induction conduisait à la formation de métastases osseuses, nous avons pris le parti de débiter notre étude en inhibant LOX et LOXL2 dans des cellules de cancer du sein triple négatives qui les exprimaient fortement. Nous n'avons pas obtenu de

résultats probants par cette méthode. En particulier, nous n'avons pas reproduit les résultats publiés dans la littérature montrant que l'inhibition de LOX et LOXL2 réduisait la formation de métastases ostéolytiques (Cox et al. 2015; Barker et al. 2011). Cependant, ces études ont été réalisées avec des cellules différentes, les cellules ER- murines 4T1 injectées dans un modèle syngénique, et pour lesquelles une forte expression de LOX était observée. Nous avons voulu reproduire ces expériences afin de s'assurer que nous n'avions pas un problème technique, mais toutes les cellules 4T1 que nous avons testé se sont avérées ne pas exprimer LOX et LOXL2. Il est donc à ce jour nécessaire, de cribler les différentes lignées de cancer du sein murin, dans le but de trouver notre modèle syngénique.

La surexpression de LOX semble favoriser la formation de métastases osseuses ostéolytiques dans notre lignée B02, ce qui n'est pas le cas de LOXL2.

Nous avons confirmé le rôle promoteur de LOX dans la formation des métastases osseuses dans les cancers du sein hormono-indépendants. En effet, la surexpression de LOX dans ces cellules conduit à une augmentation de la masse tumorale dans les os des animaux (représenté par une augmentation de la bioluminescence), et à une augmentation de l'ostéolyse (fig. 59). Ceci est parfaitement en accord avec la littérature.

Une de nos hypothèses est que si l'inhibition de LOX n'a pas eu les résultats escomptés, c'est sans doute dû au niveau d'expression pas assez élevé de LOX dans les B02. En effet, nos études sur les métastases de cancer du côlon ont montré une très légère diminution de la lyse osseuse lors de l'utilisation d'une lignée inhibée en LOX comparé à la lignée contrôle, effet vraiment négligeable comparé aux différences obtenues avec une lignée surexprimant LOX (Reynaud et al., 2017). La surexpression de LOXL2 quant à elle ne semble pas favoriser la formation des métastases osseuses dans notre modèle, indiquant que les deux enzymes agissent différemment sur le comportement des cellules tumorales dans l'os.

Une fois dans l'os, LOX et LOXL2 ont-elle un effet sur l'ostéoclastogénèse et l'ostéoblastogénèse ?

Une question primordiale, à laquelle nous n'avons pas réussi à répondre est l'effet de LOX et LOXL2 produites par les cellules tumorales mammaires sur la différenciation ostéoclastique et ostéoblastique pouvant moduler l'homéostasie osseuse.

En ce qui concerne l'ostéoclastogénèse, nos conditions expérimentales, notamment la forte concentration de RANKL, ne sont sans doute pas optimales pour tester l'effet des milieux conditionnés de nos cellules. Nous allons tester des concentrations plus faibles de RANKL, mais également déterminer si la modulation de LOX et LOXL2 modifie la sécrétion de cytokines activatrices des ostéoclastes par nos cellules tumorales. Dans nos études sur le côlon, nous avons par exemple montré que LOX induit la sécrétion d'IL-6 (Reynaud et al., 2017). Si LOXL2 n'induit pas une telle expression cela pourrait expliquer le plus faible taux d'ostéolyse observé dans les animaux injectés avec les B02 LOXL2+. Un cytokine array pour tester d'autres molécules connues pour réguler les ostéoclastes et les ostéoblastes, comme TNF- α , l'IL-1 β ou PtHRP serait pertinent à réaliser.

LOXL2, une protéine qui n'a pas de fonction sur la formation des métastases osseuses ?

Différentes études cliniques sur des cohortes de patients atteints de cancer du sein hormono-indépendants révèlent des corrélations entre l'expression de LOX ou LOXL2 est un mauvais pronostic (Erlor et al. 2006; Ahn et al. 2013). Nous avons confirmé le rôle pro-métastatique de LOX sur les métastases osseuses, mais dans notre modèle, LOXL2 semble avoir un rôle différent. Une analyse de la littérature montre que la plupart des conclusions sur le rôle pro-tumoral de LOXL2 sont déduites de ce qui est connu sur LOX. Ces deux enzymes ont effectivement des points communs, comme le fait d'avoir un site enzymatique conservé, d'être des facteurs de réponse à l'hypoxie ou d'induire l'EMT (Schietke et al. 2010). Cependant leurs séquences N-terminales divergent, ce qui laisse supposer que leurs structures ne sont pas identiques et qu'elles peuvent avoir des fonctions spécifiques. Les KO montrent d'ailleurs qu'il n'y a pas de redondance entre les deux protéines au cours du développement (Hornstra et al. 2003 ; Martin et al. 2015). De plus, le gène *Lox/2* est localisé dans une région chromosomique fréquemment délétée dans une variété de cancers humains. Des études sur l'expression de *Lox/2* indique que le produit du gène pourrait être impliqué dans la suppression tumorale sans pour autant que l'on en connaisse les mécanismes sous-jacents.

Une étude génomique, a en effet montré une diminution de l'expression de l'ARNm d'environ 60 fois dans des fibroblastes de rat transformés par RAS (Zuber et al. 2000). Une régulation à la baisse de l'expression de l'ARNm de LOXL2 a été aussi observée dans plusieurs lignées cellulaires et échantillons de tissus de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Rost et al. 2003). De plus, une étude sur des échantillons de patients a montré que l'expression de l'ARNm de LOXL2 était significativement plus faible dans les tissus de cancer du poumon à petites cellules que dans les tissus normaux environnants (Zhan et al. 2012). Même si majoritairement la littérature prône pour un rôle pro-tumoral de LOXL2, ceci est peut-être dépendant du contexte. De plus, aucun mécanisme n'a été décrit *in vivo*.

Si pour l'instant les mécanismes pouvant expliquer les rôles différents de LOX et LOXL2 sont inconnus, il semblerait que cela ne relève pas de modifications de la capacité des cellules tumorales à former des tumeurs. En effet, nos tests de tumorigénèse par injection en sous-cutanée n'ont montré aucune différence significative (fig. 61). Il semblerait que ce soit plutôt l'action des enzymes secrétées sur le microenvironnement osseux qui soit mise en jeu comme le révèle notre expérience de colonisation de niche humanisée (fig. 62). Des expériences complémentaires sont donc nécessaires dans le but de comprendre ce phénomène et les mécanismes impliqués, par l'utilisation de nos lignées MDA-MB-231 et Hs578t *in vivo*, et également en complétant nos études à temps précoces avec les B02 qui surexpriment LOX et LOXL2. Il faudrait également déterminer si l'injection de milieux conditionnés +/-LOX et +/-LOXL2 rend l'environnement plus permissif à l'implantation précoce des cellules tumorales. Pour cela nous allons traiter des animaux avec ces milieux conditionnés quotidiennement en IP, injecter des cellules CTL et analyser le nombre de clones tumoraux présents dès 7 jours dans la moelle et les poumons. Comme le suggèrent nos expériences préliminaires (fig.62), LOX pourrait préparer l'environnement osseux à recevoir des cellules tumorales, ce qui ne serait pas le cas de LOXL2.

En ce qui concerne l'ancrage des cellules tumorales dans l'os et les poumons, nous avons obtenu des résultats préliminaires inattendus. En effet, l'inhibition de LOXL2 a tendance à augmenter l'ancrage des cellules tumorales à des stades précoces (fig. 49). Ces résultats sont à prendre avec précautions car non statistiquement significatifs du fait du faible nombre d'animaux dans l'échantillonnage, mais sont à mettre en regard avec le fait qu'*in vitro*, l'inhibition de LOXL2 rend les cellules plus susceptibles d'adhérer sur le collagène de type I

(Fig. 45). Lors du premier protocole d'ancrage précoce réalisé (Fig., 50 ; quantification des clones tumoraux dans la moelle et les poumons des animaux 7 jours après l'injection des cellules tumorales), nous avons obtenu des clones dans les cultures de poumons, indiquant la présence de micrométastases dans cet organe, notamment avec les B02 shLOXL2. Ceci est surprenant car les cellules de la lignée B02, qui ne possèdent pas le récepteur à la laminine, très abondante dans les poumons, métastasent très préférentiellement à l'os. Lors du second protocole, les cultures pulmonaires se sont toutes avérées négatives, de même pour les fibroblastes que l'on observe toujours lors de la dilascération de cet organe. Ceci suggère un problème technique, ce qui confirme la nécessité de refaire cette expérience. Néanmoins, la grande quantité de clones tumoraux dans les poumons des souris injectées avec des B02 shLOXL2 reste intrigante. Il est également à noter, que lors de la surexpression de LOXL2 dans notre modèle nous avons observé une tendance à la formation de métastases osseuses moins grosses qu'avec les cellules shLOXL2 (Fig. 60). Encore une fois, ces résultats n'ont pas de valeur statistique car l'échantillonnage est trop petit, mais vont dans le sens d'un rôle non promoteur de métastases osseuses de LOXL2. Toutes ces données sur LOXL2 nécessitent confirmation et approfondissement. Si nos travaux s'avèrent reproductibles dans d'autres lignées et lors d'utilisation d'échantillons plus importants, cela pourrait remettre en cause la qualité de facteur de mauvais pronostic de LOXL2, notamment en terme de rechute métastatique à l'os.

Les différents résultats des expériences réalisées durant cette thèse nous laissent devant plusieurs hypothèses pour expliquer les rôles différents de LOX et LOXL2 sur la formation des métastases osseuses.

LOXL2 masque t-elle les effets de LOX ?

En comparant le comportement de cellules avec ou sans LOXL2 *in vivo*, nous avons observé que l'inhibition de LOXL2 donne des résultats qui se rapprochent de la surexpression de LOX (fig. 60, 62 et résultats préliminaires sur la rigidité tumorale non montrés). Il se pourrait que LOXL2, lorsqu'elle est exprimée, exerce un effet de titration sur les substrats des lysyl oxydase, limitant ainsi l'accès de LOX, donc son activité. Son inhibition aurait donc pour effet de lever cette « compétition » et d'accentuer les effets délétères de LOX sur la formation des métastases osseuses. Il serait donc intéressant d'analyser s'il existe une corrélation en clinique entre l'expression conjointe de LOX et de LOXL2, et la survie avec ou sans rechute métastatique des patients atteints de cancer du sein hormono-indépendants. *In vitro*, il pourrait également être pertinent de regarder si la réticulation des substrats de LOX, comme le collagène I et l'élastine, est perturbée lorsque les deux protéines sont utilisées conjointement.

LOXL2 a-t-elle un effet sur l'ancrage précoce des métastases osseuses par le biais de son action sur l'EMT ?

Dans les tumeurs mammaires, LOXL2 a été décrite pour sa capacité à induire l'EMT, ce qui est moins le cas de LOX (Salvador et al., 2017). Dans l'environnement osseux spécifiquement, l'inhibition de LOXL2 pourrait peut-être favoriser un retour vers une transition mésenchymateux-épithéliale (MET) ou une EMT partielle, favorable à l'ancrage dans la matrice et à la prolifération, alors que la surexpression de LOXL2 rendrait les cellules trop mésenchymateuses pour pouvoir former des tumeurs osseuses secondaires (D. Yao, Dai, et Peng 2011). Des westerns blots contre différentes protéines impliquées dans l'EMT, comme TWIST, SNAI, et l'E-cadhérine permettrait de vérifier cette hypothèse. En complément, le marquage de l'E-cadhérine sur nos coupes d'os contenant des tumeurs +/- LOX ou LOXL2

pourrait aussi nous donner des informations sur le statut épithélio-mésenchymateux des cellules.

LOX favorise t'elle l'ancrage des cellules tumorales par le biais des intégrines ?

Un autre aspect qui pourrait apporter des informations intéressantes, concerne le lien des lysyl oxydases avec les intégrines. En effet, la rigidité matricielle a été démontrée comme agissant sur l'expression de LOX qui en retour augmente d'autant plus la rigidité matricielle. Cette boucle de régulation stabilise les complexes intégrines et favorise la prolifération des cellules tumorales et l'invasion (S. Wu et al. 2018; Amendola, Reuten, et Erler 2019) (fig. 65)

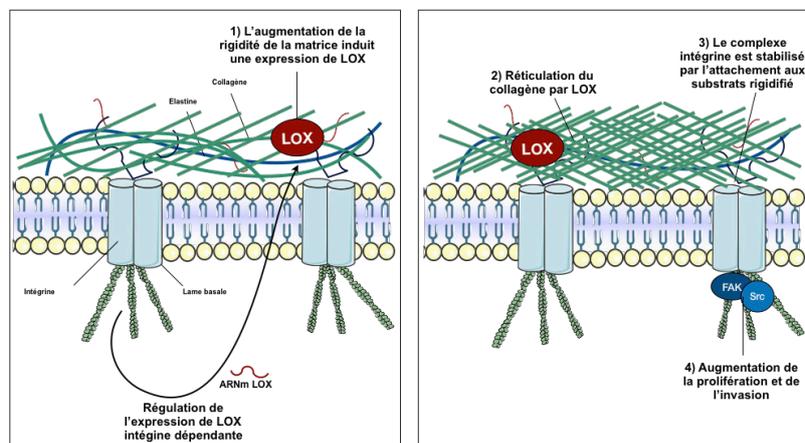


Figure 65: Les intégrines : liens entre la matrice extracellulaire, les cellules et LOX

La rigidité de la MEC, via des intégrines, induit l'expression de LOX qui en retour va favoriser l'augmentation de la rigidité matricielle et l'activation de voies de signalisations pro-prolifératives dépendantes des intégrines (D'après Amendola et al., 2019).

Des récepteurs ou des interactions différentes pourraient expliquer les actions opposées des deux enzymes. En collaboration avec l'équipe de Sylvie Ricard-Blum, nous nous sommes donc intéressés à l'existence potentielle de récepteurs membranaires de ces enzymes. Des expériences préliminaires ont montré que LOX interagit avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ alors que LOXL2 interagit principalement avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$.

Un récepteur potentiel de LOX de type intégrine contenant la sous-unité $\beta 3$, qui à priori ne se lie pas aux collagènes pourrait conduire à l'activation des voies de signalisation MAPK ou Pi3K dépendantes (pour revue Sung et al., 2010). Il est également à noter que la liaison entre

$\alpha v\beta 3$ et le récepteur c-Met est impliquée dans la formation des métastases osseuses des cancers du sein (White and Muller 2007). Il pourrait donc être intéressant de tester un anticorps bloquant de cette intégrine, LM609 ou la forme humanisée etaracizumab dans nos modèles de métastases osseuses LOX-dépendantes. Il a été de plus montré que LOX sous sa forme mature, forme un complexe tri-moléculaire avec BMP-1 et la périostine, ce qui active la réticulation des collagènes fibrillaires (Maruhashi et al., 2010). La périostine est très abondante dans l'os et sert de pont entre les collagènes fibrillaires et les intégrines, notamment $\alpha v\beta 3$ (Gillan et al., 2002). Cette interaction spécifique pourrait donc conférer à LOX une plus grande affinité pour le site osseux, et permettre aux cellules qui l'expriment de s'y ancrer plus facilement.

Nos données préliminaires indiquent également que LOX et LOXL2 interagissent toutes les 2 potentiellement avec $\alpha 5\beta 1$. $\alpha 5\beta 1$ est le récepteur de la fibronectine, qui, comme la périostine et $\alpha v\beta 3$, fait le lien avec les collagènes fibrillaires. Cependant, la conformation différente des deux enzymes LOXs confère peut-être à ces interactions des rôles distincts. On peut imaginer que LOX, via ses interactions avec $\alpha v\beta 3$ /périostine et $\alpha 5\beta 1$ /fibronectine, permet aux cellules tumorales de s'ancrer fortement dans la matrice osseuse. LOXL2, dont il n'existe pas de preuves formelles du clivage *in vivo*, est une protéine beaucoup plus grosse et encombrante que LOX. On pourrait donc imaginer que l'interaction de LOXL2 avec $\alpha 5\beta 1$ limite la possibilité de cette dernière à lier la fibronectine, par empêchement allostérique par exemple, donc à adhérer à la matrice osseuse riche en collagène I. Il a ainsi été montré que des protéines comme SPARC ou les thrombospondines 1 et 2 (TSP-1, -2), qui interagissent à la fois avec les collagènes fibrillaires et les intégrines, se comportent comme des molécules de « de-adhésion » (Murphy-Ullrich et al., 2001).

Le rôle de LOX et LOXL2 dans la progression tumorale est-il corrélé avec la rigidité matricielle ?

Les rôles différents des deux enzymes pourraient aussi s'expliquer par la rigidité des tumeurs et leur capacité à accumuler des forces mécaniques. En effet, les tumeurs solides se rigidifient au même titre que les tissus environnants (Stylianopoulos et al., 2017). Il a ainsi été montré dans un modèle de cancer du sein orthotopique, que l'accumulation de forces au sein des

tumeurs était associée à leur contenu en acide hyaluronique, composant matriciel très abondant par ailleurs. Plus le module élastique de ces tumeurs était élevé, plus elles étaient rigides (Voutouri et al., 2018). En collaboration avec le Dr Hélène Follet, spécialiste en biomécanique au laboratoire, nous mettons au point un modèle permettant de quantifier la résistance des tumeurs à la compression et leur module élastique. Les résultats préliminaires indiquent que les tumeurs LOX+ ont un module élastique, donc une rigidité supérieure aux tumeurs shLOX. A l'inverse les tumeurs shLOXL2 sont plus raides que les tumeurs LOXL2+. Ces résultats qui sont à reproduire et à confirmer pourraient être particulièrement intéressants pour expliquer les rôles opposés de LOX et LOXL2, une rigidité moindre conduisant à moins d'envahissement.

Peut-on envisager LOX et LOXL2 en tant que cibles thérapeutiques ?

Nos données préliminaires semblent confirmer le rôle de marqueur de mauvais pronostic de LOX dans le cancer du sein et nous pousse à envisager LOX comme cible thérapeutique potentielle en complément des thérapies actuellement proposées. Un traitement dirigé contre cette protéine pourrait potentiellement diminuer l'ancrage des cellules tumorales dans l'os, diminuant ainsi la formation de tumeur.

Par contre, les résultats sont plus discutables concernant LOXL2. Bien que nos travaux ne permettent pas de conclure formellement, la tendance observée suggère néanmoins que l'inhiber pourrait être sans effet voire ne pas être bénéfique pour les patients, en terme de rechute métastatique à l'os.

Le BAPN ou le tétrathiomolybdate, un chélateur du cuivre, sont des inhibiteurs efficaces de l'activité lysyl oxydase, mais inutilisables en cliniques. Outre le fait qu'ils sont susceptibles de provoquer une toxicité ou des effets indésirables significatifs en raison de l'importance du cuivre dans la respiration mitochondriale et la production d'énergie dans une physiologie normale (Ovet et Oztay 2014), ils sont de plus non spécifiques de LOX et peuvent aussi inhiber LOXL2.

Au cours des dernières années, un anticorps thérapeutique contre LOXL2 (AB0023) a été développé et utilisé avec succès dans des études précliniques (Ahn et al. 2013; Hornstra et al.

2003). Un essai clinique a ensuite été entrepris avec une forme humanisée de cet anticorps dans le cancer du pancréas, mais son incapacité à apporter un bénéfice pour les patients a conduit à l'arrêt de cet essai en phase II.

La recherche se tourne maintenant vers la création de nouvelles petites molécules inhibitrices spécifiques de LOXL2. Ces inhibiteurs pourraient représenter un potentiel élevé pour la compréhension des mécanismes de LOX et LOXL2, mais également en clinique. Les premières molécules inhibitrices bien caractérisées, ciblent essentiellement LOXL2. Les premières données précliniques indiquent qu'elles conduisent à une diminution de la progression des tumeurs mammaires primaires et de la formation de métastases pulmonaires chez la souris (Chang et al. 2017). Cependant les auteurs n'ont pas regardé ce qu'il en était des métastases osseuses, et il se peut que LOXL2 agisse différemment selon le type de métastase envisagé.

Il me semble cependant que développer des inhibiteurs spécifiques de LOX pourrait être plus prometteur, surtout en terme de rechute métastatique. En effet, toutes les données obtenues au laboratoire et par d'autres groupes vont dans la même direction. De telles petites molécules pourraient nous aider à définir si et comment LOX participe à l'ancrage des cellules tumorales dans le réservoir de DTC qu'est la moelle osseuse. D'autre part, une inhibition locale ou systémique de LOX pourrait prévenir ce type de métastases invalidantes et non guérissables actuellement.

Mes études, même si beaucoup sont préliminaires, indiquent que LOXL2 ne serait pas pro-métastatique pour le site osseux, contrairement à LOX. Ce résultat était innattendu et j'ai multiplié les expériences, les modèles et les contrôles pour tenter de les confirmer ce qui m'a pris beaucoup de temps. Je n'ai donc pas pu aborder la question majeure à l'origine du projet, à savoir si et comment les lysyl oxydases peuvent d'une part intervenir dans la formation d'un microenvironnement osseux permissif aux métastases, et d'autre part participer à une compétition entre cellules tumorales et cellules souches hématopoïétiques.

Bibliographies

Ahn, Sung Gwe, Seung Myung Dong, Akira Oshima, Woo Ho Kim, Hak Min Lee, Seung Ah Lee, Seung-Hyun Kwon, et al. 2013. « LOXL2 Expression Is Associated with Invasiveness and Negatively Influences Survival in Breast Cancer Patients ». *Breast Cancer Research and Treatment* 141 (1): 89-99. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2662-3>.

Akiri, Gal, Edmond Sabo, Hagit Dafni, Zehava Vadasz, Yelena Kartvelishvily, Noga Gan, Ofra Kessler, et al. 2003. « Lysyl Oxidase-Related Protein-1 Promotes Tumor Fibrosis and Tumor Progression in Vivo ». *Cancer Research* 63 (7): 1657-66.

Alexander, Nelson R., Kevin M. Branch, Aron Parekh, Emily S. Clark, Izuchukwu C. Iwueke, Scott A. Guelcher, et Alissa M. Weaver. 2008. « Extracellular Matrix Rigidity Promotes Invadopodia Activity ». *Current Biology* 18 (17): 1295-99. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.090>.

Ali, Simak, et R. Charles Coombes. 2002. « Endocrine-Responsive Breast Cancer and Strategies for Combating Resistance ». *Nature Reviews Cancer* 2 (2): 101. <https://doi.org/10.1038/nrc721>.

Alix-Panabières, Catherine, et Klaus Pantel. 2014. « Challenges in Circulating Tumour Cell Research ». *Nature Reviews Cancer* 14 (9): 623-31. <https://doi.org/10.1038/nrc3820>.

Amendola, Pier Giorgio, Raphael Reuten, et Janine Terra Erler. 2019. « Interplay Between LOX Enzymes and Integrins in the Tumor Microenvironment ». *Cancers* 11 (5). <https://doi.org/10.3390/cancers11050729>.

Arai, Fumio, Atsushi Hirao, Masako Ohmura, Hidetaka Sato, Sahoko Matsuoka, Keiyo Takubo, Keisuke Ito, Gou Young Koh, et Toshio Suda. 2004. « Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche ». *Cell* 118 (2): 149-61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.004>.

Arboleya, Luis, et Santos Castañeda. 2013. « Osteoimmunology: The Study of the Relationship Between the Immune System and Bone Tissue ». *Reumatología Clínica (English Edition)* 9 (5): 303-15. <https://doi.org/10.1016/j.reumae.2013.02.004>.

Asagiri, Masataka, et Hiroshi Takayanagi. 2007. « The molecular understanding of osteoclast differentiation ». *Bone* 40 (2): 251-64. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.023>.

Asuncion, L., B. Fogelgren, K. S. K. Fong, S. F. T. Fong, Y. Kim, et K. Csiszar. 2001. « A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain ». *Matrix Biology* 20 (7): 487-91.

[https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00161-5](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00161-5).

Atkins, G. J., et D. M. Findlay. 2012. « Osteocyte Regulation of Bone Mineral: A Little Give and Take ». *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 23 (8): 2067-79. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-1915-z>.

Atsawasuwan, Phimon, Yoshiyuki Mochida, Michitsuna Katafuchi, Masaru Kaku, Keith S. K. Fong, Katalin Csiszar, et Mitsuo Yamauchi. 2008. « Lysyl Oxidase Binds Transforming Growth Factor-Beta and Regulates Its Signaling via Amine Oxidase Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (49): 34229-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803142200>.

Aumiller, Verena, Benjamin Strobel, Merrit Romeike, Michael Schuler, Birgit E. Stierstorfer, et Sebastian Kreuz. 2017. « Comparative Analysis of Lysyl Oxidase (like) Family Members in Pulmonary Fibrosis ». *Scientific Reports* 7 (1): 149. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00270-0>.

Awolaran, Olugbenga, Susan A. Brooks, et Verna Lavender. 2016. « Breast Cancer Osteomimicry and Its Role in Bone Specific Metastasis; an Integrative, Systematic Review of Preclinical Evidence ». *Breast (Edinburgh, Scotland)* 30 (décembre): 156-71. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2016.09.017>.

Bais, Manish V., Matthew A. Nugent, Danielle N. Stephens, S. Selva Sume, Kathrin H. Kirsch, Gail E. Sonenshein, et Philip C. Trackman. 2012. « Recombinant Lysyl Oxidase Propeptide Protein Inhibits Growth and Promotes Apoptosis of Pre-Existing Murine Breast Cancer Xenografts ». *PLOS ONE* 7 (2): e31188.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031188>.

Baker, A.-M., D. Bird, G. Lang, T. R. Cox, et J. T. Erler. 2013. « Lysyl Oxidase Enzymatic Function Increases Stiffness to Drive Colorectal Cancer Progression through FAK ». *Oncogene* 32 (14): 1863-68. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.202>.

Baker, Ann-Marie, Demelza Bird, Jonathan C. Welti, Morgane Gourlaouen, Georgina Lang, Graeme I. Murray, Andrew R. Reynolds, Thomas R. Cox, et Janine T. Erler. 2013. « Lysyl

Oxidase Plays a Critical Role in Endothelial Cell Stimulation to Drive Tumor Angiogenesis ». *Cancer Research* 73 (2): 583-94. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2447>.

Baker, Ann-Marie, Thomas R. Cox, Demelza Bird, Georgina Lang, Graeme I. Murray, Xiao-Feng Sun, Stacey M. Southall, Jon R. Wilson, et Janine T. Erler. 2011. « The Role of Lysyl Oxidase in SRC-Dependent Proliferation and Metastasis of Colorectal Cancer ». *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 103 (5): 407-24. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq569>.

Barker, Holly E., Demelza Bird, Georgina Lang, et Janine T. Erler. 2013. « Tumor-secreted LOXL2 Activates Fibroblasts Through FAK Signaling ». *Molecular cancer research : MCR* 11 (11). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0033-T>.

Barker, Holly E., Joan Chang, Thomas R. Cox, Georgina Lang, Demelza Bird, Monica Nicolau, Holly R. Evans, Alison Gartland, et Janine T. Erler. 2011. « LOXL2-Mediated Matrix Remodeling in Metastasis and Mammary Gland Involution ». *Cancer Research* 71 (5): 1561-72. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2868>.

Barker, Holly E., Thomas R. Cox, et Janine T. Erler. 2012. « The Rationale for Targeting the LOX Family in Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 12 (8): 540-52. <https://doi.org/10.1038/nrc3319>.

Barrow, Mark V., Charles F. Simpson, et Edward J. Miller. 1974. « Lathyrism: A Review ». *The Quarterly Review of Biology* 49 (2): 101-28. <https://doi.org/10.1086/408017>.

Barry-Hamilton, Vivian, Rhyannon Spangler, Derek Marshall, Scott McCauley, Hector M. Rodriguez, Miho Oyasu, Amanda Mikels, et al. 2010. « Allosteric Inhibition of Lysyl Oxidase-like-2 Impedes the Development of a Pathologic Microenvironment ». *Nature Medicine* 16 (9): 1009-17. <https://doi.org/10.1038/nm.2208>.

Bartl, Reiner, et Christoph Bartl. 2019. « Bone Metastases: Incidence and Development ». In *The Osteoporosis Manual: Prevention, Diagnosis and Management*, édité par Reiner Bartl et Christoph Bartl, 471-77. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00731-7_80.

Batard, P., M. N. Monier, N. Fortunel, K. Ducos, P. Sansilvestri-Morel, T. Phan, A. Hatzfeld, et J. A. Hatzfeld. 2000. « TGF-(Beta)1 Maintains Hematopoietic Immaturity by a Reversible Negative Control of Cell Cycle and Induces CD34 Antigen up-Modulation ». *Journal of Cell Science* 113 (Pt 3) (février): 383-90.

Batra, Nidhi, Rekha Kar, et Jean X. Jiang. 2012. « Gap Junctions and Hemichannels in Signal Transmission, Function and Development of Bone ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1818 (8): 1909-18. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.09.018>.

Behmoaras, Jacques, Séverin Slove, Sophie Seve, Roger Vranckx, Pascal Sommer, et Marie-Paule Jacob. 2008. « Differential Expression of Lysyl Oxidases LOXL1 and LOX During Growth and Aging Suggests Specific Roles in Elastin and Collagen Fiber Remodeling in Rat Aorta ». *Rejuvenation Research* 11 (5): 883-89. <https://doi.org/10.1089/rej.2008.0760>.

Benson, Al B., Zev A. Wainberg, J. Randolph Hecht, Dmitry Vyushkov, Hua Dong, Johanna Bendell, et Fred Kudrik. 2017. « A Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Simtuzumab or Placebo in Combination with Gemcitabine for the First-Line Treatment of Pancreatic Adenocarcinoma ». *The Oncologist* 22 (3): 241-e15. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0024>.

Bernard, Margaux, Paola Di Mauro, Caroline Reynaud, Chantal Diaz-Latoud, et Philippe Clézardin. 2019. « Bone Metastases; Basic Aspects ». In *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)*, édité par Ilpo Huhtaniemi et Luciano Martini, 304-9. Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65819-1>.

Bhatia, M., D. Bonnet, D. Wu, B. Murdoch, J. Wrana, L. Gallacher, et J. E. Dick. 1999. « Bone Morphogenetic Proteins Regulate the Developmental Program of Human Hematopoietic Stem Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 189 (7): 1139-48. <https://doi.org/10.1084/jem.189.7.1139>.

Bhattacharjee, Promita, Banani Kundu, Deboki Naskar, Hae-Won Kim, Tapas K. Maiti, Debasis Bhattacharya, et Subhas C. Kundu. 2017. « Silk Scaffolds in Bone Tissue Engineering: An Overview ». *Acta Biomaterialia* 63 (novembre): 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.027>.

Bidard, F.-C., A.-E. Saliba, L. Saias, A. Degeorges, P. de Cremoux, J.-L. Viovy, A. Vincent-Salomon, C. Mathiot, J.-Y. Pierga, et A. de Gramont. 2009. « Cellules tumorales circulantes et cancer du sein : méthodes de détection et résultats cliniques ». *Bulletin du Cancer* 96 (1): 73-86. <https://doi.org/10.1684/bdc.2008.0797>.

Bignon, Marine, Cathy Pichol-Thievend, Julie Hardouin, Marilyne Malbouyres, Nicolas Bréchet, Luiz Nasciutti, Alain Barret, et al. 2011. « Lysyl Oxidase-like Protein-2 Regulates

Sprouting Angiogenesis and Type IV Collagen Assembly in the Endothelial Basement Membrane ». *Blood* 118 (14): 3979-89. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-313296>.

Blair, Harry C., Quitterie C. Larrouture, Yanan Li, Hang Lin, Donna Beer-Stoltz, Li Liu, Rocky S. Tuan, Lisa J. Robinson, Paul H. Schlesinger, et Deborah J. Nelson. 2016. « Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro ». *Tissue Engineering Part B: Reviews* 23 (3): 268-80. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2016.0454>.

Blows, Fiona M., Kristy E. Driver, Marjanka K. Schmidt, Annegien Broeks, Flora E. van Leeuwen, Jelle Wesseling, Maggie C. Cheang, et al. 2010. « Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival: A Collaborative Analysis of Data for 10,159 Cases from 12 Studies ». *PLOS Medicine* 7 (5): e1000279. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000279>.

Bollinger, John A., Doreen E. Brown, et David M. Dooley. 2005. « The Formation of Lysine Tyrosylquinone (LTQ) Is a Self-Processing Reaction. Expression and Characterization of a Drosophila Lysyl Oxidase ». *Biochemistry* 44 (35): 11708-14. <https://doi.org/10.1021/bi0504310>.

Bonewald, Lynda F. 2011. « The Amazing Osteocyte ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26 (2): 229-38. <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>.

Borel, A., D. Eichenberger, J. Farjanel, E. Kessler, C. Gleyzal, D. J. Hulmes, P. Sommer, et B. Font. 2001. « Lysyl Oxidase-like Protein from Bovine Aorta. Isolation and Maturation to an Active Form by Bone Morphogenetic Protein-1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (52): 48944-49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109499200>.

Boufraqueh, Myriem, Lisa Zhang, Naris Nilubol, Samira M. Sadowski, Shweta Kotian, Martha Quezado, et Electron Kebebew. 2016. « Lysyl Oxidase (LOX) Transcriptionally Regulates SNAI2 Expression and TIMP4 Secretion in Human Cancers ». *Clinical Cancer Research* 22 (17): 4491-4504. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2461>.

Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, et Ahmedin Jemal. 2018. « Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

Caetano-Lopes, Joana, Helena Canhão, et João Eurico Fonseca. 2007. « Osteoblasts and Bone Formation ». *Acta Reumatologica Portuguesa* 32 (2): 103-10.

Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, et al. 2003. « Osteoblastic Cells Regulate the Haematopoietic Stem Cell Niche ». *Nature* 425 (6960): 841-46. <https://doi.org/10.1038/nature02040>.

Canesin, G., E. P. Cuevas, V. Santos, C. López-Menéndez, G. Moreno-Bueno, Y. Huang, K. Csiszar, et al. 2015. « Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) and E47 EMT Factor: Novel Partners in E-Cadherin Repression and Early Metastasis Colonization ». *Oncogene* 34 (8): 951-64. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.23>.

Cenizo, Valérie, Valérie André, Corinne Reymermier, Pascal Sommer, Odile Damour, et Eric Perrier. 2006. « LOXL as a Target to Increase the Elastin Content in Adult Skin: A Dill Extract Induces the LOXL Gene Expression ». *Experimental Dermatology* 15 (8): 574-81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00442.x>.

Chang, Joan, Morghan C. Lucas, Lidia E. Leonte, Marc Garcia-Montolio, Lukram Babloo Singh, Alison D. Findlay, Mandar Deodhar, et al. 2017. « Pre-clinical evaluation of small molecule LOXL2 inhibitors in breast cancer ». *Oncotarget* 8 (16): 26066-78. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15257>.

Chiechi, Antonella, et Theresa A. Guise. 2016. « Pathobiology of Osteolytic and Osteoblastic Bone Metastases ». In *Metastatic Bone Disease: An Integrated Approach to Patient Care*, édité par R. Lor Randall, 15-35. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5662-9_2.

Chow, J. W., A. J. Wilson, T. J. Chambers, et S. W. Fox. 1998. « Mechanical Loading Stimulates Bone Formation by Reactivation of Bone Lining Cells in 13-Week-Old Rats ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13 (11): 1760-67. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.11.1760>.

Clézardin, Philippe. 2011. « Therapeutic Targets for Bone Metastases in Breast Cancer ». *Breast Cancer Research: BCR* 13 (2): 207. <https://doi.org/10.1186/bcr2835>.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2001. « Familial Breast Cancer: Collaborative Reanalysis of Individual Data from 52 Epidemiological Studies Including 58,209 Women with Breast Cancer and 101,986 Women without the Disease ». *Lancet*

(London, England) 358 (9291): 1389-99. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06524-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06524-2).

Collins, Fraser L, Naiomy D. Rios-Arce, Jonathan D. Schepper, Narayanan Parameswaran, et Laura R McCabe. 2017. « The Potential of Probiotics as a Therapy for Osteoporosis ». *Microbiology spectrum* 5 (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0015-2016>.

Contente, S., K. Kenyon, D. Rimoldi, et R. M. Friedman. 1990. « Expression of Gene Rrg Is Associated with Reversion of NIH 3T3 Transformed by LTR-c-H-Ras ». *Science (New York, N.Y.)* 249 (4970): 796-98. <https://doi.org/10.1126/science.1697103>.

Cox, Thomas R., Alison Gartland, et Janine T. Erler. 2016. « Lysyl Oxidase, a Targetable Secreted Molecule Involved in Cancer Metastasis ». *Cancer Research* 76 (2): 188-92. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2306>.

Cox, Thomas R., Robin M. H. Rumney, Erwin M. Schoof, Lara Perryman, Anette M. Høye, Ankita Agrawal, Demelza Bird, et al. 2015. « The Hypoxic Cancer Secretome Induces Pre-Metastatic Bone Lesions through Lysyl Oxidase ». *Nature* 522 (7554): 106-10. <https://doi.org/10.1038/nature14492>.

Cronshaw, A D, L A Fothergill-Gilmore, et D J Hulmes. 1995. « The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase. » *Biochemical Journal* 306 (Pt 1): 279-84.

Croset, Martine, Francesco Pantano, Casina W. S. Kan, Edith Bonnelye, Françoise Descotes, Catherine Alix-Panabières, Charles-Henri Lecellier, 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 (18): 5259-73. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3058>.

Croucher, Peter I., Michelle M. McDonald, et T. John Martin. 2016. « Bone Metastasis: The Importance of the Neighbourhood ». *Nature Reviews. Cancer* 16 (6): 373-86. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.44>.

Csiszar, Katalin. 2001. « Lysyl oxidases: A novel multifunctional amine oxidase family ». In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 70:1-32. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(01\)70012-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(01)70012-8).

Dagenais, Susan L., Ayla N. Adam, Jeffrey W. Innis, et Thomas W. Glover. 2001. « A Novel Frameshift Mutation in Exon 23 of ATP7A (MNK) Results in Occipital Horn Syndrome and

Not in Menkes Disease ». *The American Journal of Human Genetics* 69 (2): 420-27.
<https://doi.org/10.1086/321290>.

Dai, Xiaofeng, Liangjian Xiang, Ting Li, et Zhonghu Bai. 2016. « Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes ». *Journal of Cancer* 7 (10): 1281-94.
<https://doi.org/10.7150/jca.13141>.

De Donato, Marta, Marco Petrillo, Enrica Martinelli, Flavia Filippetti, Gian Franco Zannoni, Giovanni Scambia, et Daniela Gallo. 2017. « Uncovering the role of nuclear Lysyl oxidase (LOX) in advanced high grade serous ovarian cancer ». *Gynecologic Oncology* 146 (1): 170-78. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.05.001>.

Diana, Anna, Elisena Franzese, Sara Centonze, Francesca Carlino, Carminia Maria Della Corte, Jole Ventriglia, Angelica Petrillo, et al. 2018. « Triple-Negative Breast Cancers: Systematic Review of the Literature on Molecular and Clinical Features with a Focus on Treatment with Innovative Drugs ». *Current Oncology Reports* 20 (10): 76.
<https://doi.org/10.1007/s11912-018-0726-6>.

Dongre, Anushka, et Robert A. Weinberg. 2019. « New Insights into the Mechanisms of Epithelial–Mesenchymal Transition and Implications for Cancer ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (2): 69-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>.

Du, Xiao-Guang, et Mei-Jia Zhu. 2018. « Clinical Relevance of Lysyl Oxidase-like 2 and Functional Mechanisms in Glioma ». *OncoTargets and Therapy* 11: 2699-2708.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S164056>.

Durbeej, Madeleine. 2010. « Laminins ». *Cell and Tissue Research* 339 (1): 259-68.
<https://doi.org/10.1007/s00441-009-0838-2>.

El-Haibi, Christelle P., George W. Bell, Jiangwen Zhang, Anthony Y. Collmann, David Wood, Cally M. Scherber, Eva Csizmadia, et al. 2012. « Critical Role for Lysyl Oxidase in Mesenchymal Stem Cell-Driven Breast Cancer Malignancy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (43): 17460-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206653109>.

Elston, C. W., et I. O. Ellis. 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 (5): 403-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>.

Erler, Janine T., Kevin L. Bennewith, Thomas R. Cox, Georgina Lang, Demelza Bird, Albert Koong, Quynh-Thu Le, et Amato J. Giaccia. 2009. « Hypoxia-Induced Lysyl Oxidase Is a Critical Mediator of Bone Marrow Cell Recruitment to Form the Premetastatic Niche ». *Cancer Cell* 15 (1): 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.11.012>.

Erler, Janine T., Kevin L. Bennewith, Monica Nicolau, Nadja Dornhöfer, Christina Kong, Quynh-Thu Le, Jen-Tsan Ashley Chi, Stefanie S. Jeffrey, et Amato J. Giaccia. 2006. « Lysyl Oxidase Is Essential for Hypoxia-Induced Metastasis ». *Nature* 440 (7088): 1222-26. <https://doi.org/10.1038/nature04695>.

Eyre, D R, M A Paz, et P M Gallop. 1984. « Cross-Linking in Collagen and Elastin ». *Annual Review of Biochemistry* 53 (1): 717-48. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.53.070184.003441>.

Feher, Joseph. 2012. « 9.8 - Calcium and Phosphorus Homeostasis II: Target Tissues and Integrated Control ». In *Quantitative Human Physiology*, édité par Joseph Feher, 836-45. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382163-8.00091-8>.

Franz-Odenaal, Tamara A., Brian K. Hall, et P. Eckhard Witten. 2006. « Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes ». *Developmental Dynamics* 235 (1): 176-90. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20603>.

Fu, Qiang, Stavros C. Manolagas, et Charles A. O'Brien. 2006. « Parathyroid Hormone Controls Receptor Activator of NF-KappaB Ligand Gene Expression via a Distant Transcriptional Enhancer ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (17): 6453-68. <https://doi.org/10.1128/MCB.00356-06>.

Fuchs, Robyn K., William R. Thompson, et Stuart J. Warden. 2019. « Bone biology ». In *Bone Repair Biomaterials*, 15-52. Elsevier.

Fujimoto, Eita, et Shingo Tajima. 2009. « Reciprocal regulation of LOX and LOXL2 expression during cell adhesion and terminal differentiation in epidermal keratinocytes ». *Journal of Dermatological Science* 55 (2): 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.03.010>.

Fukumoto, Ichiro, Naoko Kikkawa, Ryosuke Matsushita, Mayuko Kato, Akira Kurozumi, Rika Nishikawa, Yusuke Goto, et al. 2016. « Tumor-Suppressive MicroRNAs (*MiR-26a/b*, *MiR-29a/b/c* and *MiR-218*) Concertedly Suppressed Metastasis-Promoting *LOXL2* in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma ». *Journal of Human Genetics* 61 (2): 109-18.

<https://doi.org/10.1038/jhg.2015.120>.

Gao, Jennifer J., et Sandra M. Swain. 2018. « Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review ». *The Oncologist* 23 (5): 556-65.

<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0535>.

Garg, Priyanka, Matthew M. Mazur, Amy C. Buck, Meghan E. Wandtke, Jiayong Liu, et Nabil A. Ebraheim. 2017. « Prospective Review of Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Osteoblasts ». *Orthopaedic Surgery* 9 (1): 13-19. <https://doi.org/10.1111/os.12304>.

Gasser, Jürg, et Michaela Kneissel. 2017. « Bone Physiology and Biology ». In , 27-94. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56192-9_2.

Gattazzo, Francesca, Anna Urciuolo, et Paolo Bonaldo. 2014. « Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Matrix-mediated cell behaviour and properties, 1840 (8): 2506-19. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.010>.

Geiger, Benjamin, et Kenneth M. Yamada. 2011. « Molecular Architecture and Function of Matrix Adhesions ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (5).

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005033>.

Giampuzzi, Monia, Roberta Oleggini, et Armando Di Donato. 2003. « Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 3rd International Symposium on Vitamin B6, PQQ, Carbonyl Catalysis and Quinoproteins, 1647 (1): 245-51. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00059-1](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00059-1).

Gilad, Gad M., Herbert M. Kagan, et Varda H. Gilad. 2005. « Evidence for increased lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in Alzheimer's disease brain ».

Neuroscience Letters 376 (3): 210-14. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.11.054>.

Glentis, Alexandros, Vasily Gurchenkov, et Danijela Matic Vignjevic. 2014. « Assembly, heterogeneity, and breaching of the basement membranes ». *Cell Adhesion & Migration* 8 (3): 236-45. <https://doi.org/10.4161/cam.28733>.

Gosman, James H. 2012. « The Molecular Biological Approach in Paleopathology ». In *A Companion to Paleopathology*, 76-96. John Wiley & Sons, Ltd.

<https://doi.org/10.1002/9781444345940.ch5>.

Griner, John D., Carl J. Rogers, Mei-Jun Zhu, et Min Du. 2016. « Lysyl oxidase propeptide promotes adipogenesis through inhibition of FGF-2 signaling ». *Adipocyte* 6 (1): 12-19. <https://doi.org/10.1080/21623945.2016.1271511>.

Guerra Liberal, Francisco D. C., Adriana Alexandre S. Tavares, et João Manuel R. S. Tavares. 2016. « Palliative Treatment of Metastatic Bone Pain with Radiopharmaceuticals: A Perspective beyond Strontium-89 and Samarium-153 ». *Applied Radiation and Isotopes* 110 (avril): 87-99. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2016.01.003>.

Gunasinghe, N. P. A. Devika, Alan Wells, Erik W. Thompson, et Honor J. Hugo. 2012. « Mesenchymal–Epithelial Transition (MET) as a Mechanism for Metastatic Colonisation in Breast Cancer ». *Cancer and Metastasis Reviews* 31 (3): 469-78. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9377-5>.

Guo, Ying, Nicole Pischon, Amitha H. Palamakumbura, et Philip C. Trackman. 2007. « Intracellular distribution of the lysyl oxidase propeptide in osteoblastic cells ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 292 (6): C2095-2102. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00613.2006>.

Han, Song, Sizhe Feng, Guanqian Yuan, Tao Dong, Dandan Gao, Guobiao Liang, et Xuezhong Wei. 2014. « Lysyl Oxidase Genetic Variants and the Prognosis of Glioma ». *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 122 (3): 200-205. <https://doi.org/10.1111/apm.12133>.

Han, Ya-Lin, Li Chen, Rui Qin, Guan-Qing Wang, Xiao-Hua Lin, et Guang-Hai Dai. 2019. « Lysyl Oxidase and Hypoxia-Inducible Factor 1 α : Biomarkers of Gastric Cancer ». *World Journal of Gastroenterology* 25 (15): 1828-39. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i15.1828>.

Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. « The Hallmarks of Cancer ». *Cell* 100 (1): 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).

Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The Next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Harel, Louise. 2008. « Différences entre cellules normales et malignes ». *Que sais-je?* 2e éd. (3610): 67-77.

Harney, Allison S., Esther N. Arwert, David Entenberg, Yarong Wang, Peng Guo, Bin-Zhi Qian, Maja H. Oktay, Jeffrey W. Pollard, Joan G. Jones, et John S. Condeelis. 2015. « Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2hi Macrophage-Derived VEGFA ». *Cancer Discovery* 5 (9): 932-43. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0012>.

Harrison, Stephen A., Manal F. Abdelmalek, Stephen Caldwell, Mitchell L. Shiffman, Anna Mae Diehl, Reem Ghalib, Eric J. Lawitz, et al. 2018. « Simtuzumab Is Ineffective for Patients With Bridging Fibrosis or Compensated Cirrhosis Caused by Nonalcoholic Steatohepatitis ». *Gastroenterology* 155 (4): 1140-53. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.006>.

Hartmann, Lynn C., Amy C. Degnim, Richard J. Santen, William D. Dupont, et Karthik Ghosh. 2015. « Atypical Hyperplasia of the Breast — Risk Assessment and Management Options ». *The New England journal of medicine* 372 (1): 78-89. <https://doi.org/10.1056/NEJMs1407164>.

Heissig, Beate, Koichi Hattori, Sergio Dias, Matthias Friedrich, Barbara Ferris, Neil R. Hackett, Ronald G. Crystal, et al. 2002. « Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand ». *Cell* 109 (5): 625-37. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00754-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00754-7).

Hernández-Blanquissett, Abraham, Diego Touya, Kathrin Strasser-Weippl, Rossana Ruiz, Jessica St. Louis, et Paul Goss. 2016. « Current and emerging therapies of HER2-positive metastatic breast cancer ». *The Breast* 29 (octobre): 170-77. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2016.07.026>.

Herranz, Nicolás, Natàlia Dave, Alba Millanes-Romero, Laura Pascual-Reguant, Lluís Morey, Víctor M. Díaz, Víctor Lórenz-Fonfría, et al. 2016. « Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Oxidizes Trimethylated Lysine 4 in Histone H3 ». *The FEBS Journal* 283 (23): 4263-73. <https://doi.org/10.1111/febs.13922>.

Hirai, Maretoshi, Tetsuya Ohbayashi, Masahito Horiguchi, Katsuya Okawa, Akari Hagiwara, Kenneth R. Chien, Toru Kita, et Tomoyuki Nakamura. 2007. « Fibulin-5/DANCE Has an Elastogenic Organizer Activity That Is Abrogated by Proteolytic Cleavage in Vivo ». *The Journal of Cell Biology* 176 (7): 1061-71. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611026>.

Hollosi, Peter, Jana K. Yakushiji, Keith S. K. Fong, Katalin Csiszar, et Sheri F. T. Fong.

2009. « Lysyl Oxidase-like 2 Promotes Migration in Noninvasive Breast Cancer Cells but Not in Normal Breast Epithelial Cells ». *International Journal of Cancer* 125 (2): 318-27.
<https://doi.org/10.1002/ijc.24308>.

Hornstra, Ian K., Shonyale Birge, Barry Starcher, Allen J. Bailey, Robert P. Mecham, et Steven D. Shapiro. 2003. « Lysyl Oxidase Is Required for Vascular and Diaphragmatic Development in Mice ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (16): 14387-93.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M210144200>.

Hua, Yi-Jun, Hai-Yun Wang, Ling-Quan Tang, Qiu-Yan Chen, Jian-Yong Shao, et Hai-Qiang Mai. 2016. « LOX Expression in Primary Nasopharyngeal Carcinoma: Correlation with Prognostic Parameters and Outcome ». *Oncotarget* 7 (7): 8200-8207.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.6996>.

Huang, Shang-Pen, Jean Chiou, Yi-Hua Jan, Tsung-Ching Lai, Yung-Luen Yu, Michael Hsiao, et Yuan-Feng Lin. 2018. « Over-Expression of Lysyl Oxidase Is Associated with Poor Prognosis and Response to Therapy of Patients with Lower Grade Gliomas ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 501 (3): 619-27.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.228>.

Hynes, Richard O., et Alexandra Naba. 2012. « Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>.

Iftikhar, Mussadiq, Paola Hurtado, Manish V. Bais, Nate Wigner, Danielle N. Stephens, Louis C. Gerstenfeld, et Philip C. Trackman. 2011. « Lysyl Oxidase-like-2 (LOXL2) Is a Major Isoform in Chondrocytes and Is Critically Required for Differentiation ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (2): 909-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155622>.

Ikenaga, Naoki, Zhen-Wei Peng, Kahini A. Vaid, Susan B. Liu, Shuhei Yoshida, Deanna Y. Sverdlov, Amanda Mikels-Vigdal, Victoria Smith, Detlef Schuppan, et Yury V. Popov. 2017. « Selective Targeting of Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Suppresses Hepatic Fibrosis Progression and Accelerates Its Reversal ». *Gut* 66 (9): 1697-1708.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312473>.

Ito, Hiromu, Haruhiko Akiyama, Hiroshi Iguchi, Ken-ichi Iyama, Masatomo Miyamoto, Kunitaka Ohsawa, et Takashi Nakamura. 2001. « Molecular Cloning and Biological Activity

of a Novel Lysyl Oxidase-Related Gene Expressed in Cartilage ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (26): 24023-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100861200>.

Iturbide, Ane, Laura Pascual-Reguant, Laura Fargas, Joan Pau Cebrià, Berta Alsina, Antonio García de Herreros, et Sandra Peiró. 2015. « LOXL2 Oxidizes Methylated TAF10 and Controls TFIID-Dependent Genes during Neural Progenitor Differentiation ». *Molecular Cell* 58 (5): 755-66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.012>.

James, J J, A J Evans, S E Pinder, E Gutteridge, K L Cheung, S Chan, et J F R Robertson. 2003. « Bone metastases from breast carcinoma: histopathological – radiological correlations and prognostic features ». *British Journal of Cancer* 89 (4): 660-65. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601198>.

Jansen, Matthias K., et Katalin Csiszar. 2007. « Intracellular localization of the matrix enzyme lysyl oxidase in polarized epithelial cells ». *Matrix Biology* 26 (2): 136-39. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.09.004>.

Janyasupab, Metini, Ying-Hui Lee, Yuan Zhang, Chen W. Liu, Jieyi Cai, Adriana Popa, Anna C. Samia, et al. 2015. « Detection of Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL2), a Biomarker of Metastasis from Breast Cancers Using Human Blood Samples ». *Recent Patents on Biomarkers* 5 (2): 93-100. <https://doi.org/10.2174/2210309005666150804195033>.

Jiang, W. G., A. J. Sanders, M. Katoh, H. Ungefroren, F. Gieseler, M. Prince, S. K. Thompson, et al. 2015. « Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives ». *Seminars in Cancer Biology, A broad-spectrum integrative design for cancer prevention and therapy*, 35 (décembre): S244-75. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.008>.

Joeng, Kyu Sang, Yi-Chien Lee, Joohyun Lim, Yuqing Chen, Ming-Ming Jiang, Elda Munivez, Catherine Ambrose, et Brendan H. Lee. 2017. « Osteocyte-Specific WNT1 Regulates Osteoblast Function during Bone Homeostasis ». *The Journal of Clinical Investigation* 127 (7): 2678-88. <https://doi.org/10.1172/JCI92617>.

Jones, D. Holstead, Tomoki Nakashima, Otto H. Sanchez, Ivona Kozieradzki, Svetlana V. Komarova, Ildiko Sarosi, Sean Morony, et al. 2006. « Regulation of Cancer Cell Migration and Bone Metastasis by RANKL ». *Nature* 440 (7084): 692-96. <https://doi.org/10.1038/nature04524>.

Jourdan-Le Saux, Claude, Arianne Tomsche, Aniko Ujfalusi, Libin Jia, et Katalin Csiszar. 2001. « Central Nervous System, Uterus, Heart, and Leukocyte Expression of the LOXL3 Gene, Encoding a Novel Lysyl Oxidase-Like Protein ». *Genomics* 74 (2): 211-18.
<https://doi.org/10.1006/geno.2001.6545>.

Kagan, H. M., M. A. Williams, P. R. Williamson, et J. M. Anderson. 1984. « Influence of Sequence and Charge on the Specificity of Lysyl Oxidase toward Protein and Synthetic Peptide Substrates ». *The Journal of Biological Chemistry* 259 (18): 11203-7.

Kanapathipillai, Mathumai, Akiko Mammoto, Tadanori Mammoto, Joo H. Kang, Elisabeth Jiang, Kaustabh Ghosh, Netanel Korin, Ashley Gibbs, Robert Mannix, et Donald E. Ingber. 2012. « Inhibition of Mammary Tumor Growth Using Lysyl Oxidase-Targeting Nanoparticles to Modify Extracellular Matrix ». *Nano Letters* 12 (6): 3213-17.
<https://doi.org/10.1021/nl301206p>.

Kaneda, Atsushi, Kuniko Wakazono, Tetsuya Tsukamoto, Naoko Watanabe, Yukiko Yagi, Masae Tatematsu, Michio Kaminishi, Takashi Sugimura, et Toshikazu Ushijima. 2004. « Lysyl Oxidase Is a Tumor Suppressor Gene Inactivated by Methylation and Loss of Heterozygosity in Human Gastric Cancers ». *Cancer Research* 64 (18): 6410-15.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1543>.

Kaplan, Rosandra N., Bethan Psaila, et David Lyden. 2006. « Bone Marrow Cells in the “Pre-Metastatic Niche”: Within Bone and Beyond ». *Cancer Metastasis Reviews* 25 (4): 521-29.
<https://doi.org/10.1007/s10555-006-9036-9>.

Kaplan, Rosandra N., Rebecca D. Riba, Stergios Zacharoulis, Anna H. Bramley, Loïc Vincent, Carla Costa, Daniel D. MacDonald, et al. 2005. « VEGFR1-Positive Haematopoietic Bone Marrow Progenitors Initiate the Pre-Metastatic Niche ». *Nature* 438 (7069): 820-27.
<https://doi.org/10.1038/nature04186>.

Karamanos, Nikos K. 2017. « Matrix pathobiology—central roles for proteoglycans and heparanase in health and disease ». *The FEBS Journal*, janvier, 7-9.
[https://doi.org/10.1111/febs.13945@10.1111/\(ISSN\)1742-4658.MatrixPath](https://doi.org/10.1111/febs.13945@10.1111/(ISSN)1742-4658.MatrixPath).

Kasashima, Hiroaki, Masakazu Yashiro, Haruhito Kinoshita, Tatsunari Fukuoka, Tamami Morisaki, Go Masuda, Katsunobu Sakurai, Naoshi Kubo, Masaichi Ohira, et Kosei Hirakawa. 2014. « Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) from Stromal Fibroblasts Stimulates the Progression

of Gastric Cancer ». *Cancer Letters* 354 (2): 438-46.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.014>.

———. 2016. « Lysyl Oxidase Is Associated with the Epithelial-Mesenchymal Transition of Gastric Cancer Cells in Hypoxia ». *Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 19 (2): 431-42. <https://doi.org/10.1007/s10120-015-0510-3>.

Kenyon, K., S. Contente, P. C. Trackman, J. Tang, H. M. Kagan, et R. M. Friedman. 1991. « Lysyl Oxidase and Rrg Messenger RNA ». *Science* 253 (5021): 802-802. <https://doi.org/10.1126/science.1678898>.

Kim, Boh-Ram, Seung Myung Dong, Seung Hee Seo, Ji-Hae Lee, Jae Myun Lee, Seung-Hoon Lee, et Seung Bae Rho. 2014. « Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) controls tumor-associated cell proliferation through the interaction with MARCKSL1 ». *Cellular Signalling* 26 (9): 1765-73. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.05.010>.

Kim, Hye Young, Timothy R. Jackson, et Lance A. Davidson. 2017. « On the Role of Mechanics in Driving Mesenchymal-to-Epithelial Transitions ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Extracellular Vesicles, 67 (juillet): 113-22. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.05.011>.

Kim, Moon Suk, Sung-Su Kim, Sang Taek Jung, Jung-Young Park, Han-Wook Yoo, Jesang Ko, Katalin Csiszar, Sang-Yun Choi, et Youngho Kim. 2003. « Expression and Purification of Enzymatically Active Forms of the Human Lysyl Oxidase-like Protein 4 ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (52): 52071-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308856200>.

Kim, Y., C. D. Boyd, et K. Csiszar. 1995. « A New Gene with Sequence and Structural Similarity to the Gene Encoding Human Lysyl Oxidase ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (13): 7176-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7176>.

Kirschmann, Dawn A., Elisabeth A. Seftor, Sheri F. T. Fong, Daniel R. C. Nieva, Colleen M. Sullivan, Elijah M. Edwards, Pascal Sommer, Katalin Csiszar, et Mary J. C. Hendrix. 2002. « A Molecular Role for Lysyl Oxidase in Breast Cancer Invasion ». *Cancer Research* 62 (15): 4478-83.

Kolb, Alexis D., et Karen M. Bussard. 2019. « The Bone Extracellular Matrix as an Ideal Milieu for Cancer Cell Metastases ». *Cancers* 11 (7).

<https://doi.org/10.3390/cancers11071020>.

Lamouille, Samy, Jian Xu, et Rik Derynck. 2014. « Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (3): 178-96.
<https://doi.org/10.1038/nrm3758>.

Laurentino, Talita de S., Roseli da S. Soares, Suely K. N. Marie, et Sueli M. Oba-Shinjo. 2019. « LOXL3 Function Beyond Amino Oxidase and Role in Pathologies, Including Cancer ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (14).
<https://doi.org/10.3390/ijms20143587>.

Le Provost, Gabrielle S., Romain Debret, Valérie Cenizo, Géraldine Aimond, Floriane Pez, Bastien Kaniewski, Valérie André, et Pascal Sommer. 2010. « Lysyl Oxidase Silencing Impairs Keratinocyte Differentiation in a Reconstructed-Epidermis Model ». *Experimental Dermatology* 19 (12): 1080-87. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01135.x>.

Le, Quynh-Thu, Jonathan Harris, Anthony M. Magliocco, Christina S. Kong, Roman Diaz, Brian Shin, Hongbin Cao, et al. 2009. « Validation of Lysyl Oxidase as a Prognostic Marker for Metastasis and Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Radiation Therapy Oncology Group Trial 90-03 ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (26): 4281-86.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6003>.

Lee, Jae-Eun, et Youngho Kim. 2006. « A Tissue-Specific Variant of the Human Lysyl Oxidase-like Protein 3 (LOXL3) Functions as an Amine Oxidase with Substrate Specificity ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (49): 37282-90.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M600977200>.

Lee, Vivian S., Carmen M. Halabi, Erin P. Hoffman, Nikkola Carmichael, Ignaty Leshchiner, Christine G. Lian, Andrew J. Bierhals, et al. 2016. « Loss of Function Mutation in LOX Causes Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection in Humans ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (31): 8759-64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601442113>.

Lee, Yoon Se, Yangsoon Park, Minsu Kwon, Jong-Lyel Roh, Seung-Ho Choi, Soon Yuhl Nam, et Sang Yoon Kim. 2017. « Expression of Lysyl Oxidase Predictive of Distant Metastasis of Laryngeal Cancer ». *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 156 (3): 489-97.

<https://doi.org/10.1177/0194599816685698>.

Leo, Cornelia, Christine Cotic, Victoria Pomp, Daniel Fink, et Zsuzsanna Varga. 2018. « Overexpression of Lox in Triple-Negative Breast Cancer ». *Annals of Diagnostic Pathology* 34 (juin): 98-102. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.03.009>.

Levental, Kandice R., Hongmei Yu, Laura Kass, Johnathon N. Lakins, Mikala Egeblad, Janine T. Erler, Sheri F.T. Fong, et al. 2009. « Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin signaling ». *Cell* 139 (5): 891-906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>.

Li, Rong-kun, Wen-yi Zhao, Fang Fang, Chun Zhuang, Xiao-xin Zhang, Xiao-mei Yang, Shu-heng Jiang, et al. 2015. « Lysyl Oxidase-like 4 (LOXL4) Promotes Proliferation and Metastasis of Gastric Cancer via FAK/Src Pathway ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 141 (2): 269-81. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1823-z>.

Li, Wande, Kaliappanadar Nellaiappan, Timothy Strassmaier, Lila Graham, Kathleen M. Thomas, et Herbert M. Kagan. 1997. « Localization and Activity of Lysyl Oxidase within Nuclei of Fibrogenic Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (24): 12817-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.12817>.

Li, Wande, Matthew A. Nugent, Yinzhi Zhao, Anne N. Chau, Sandy J. Li, Iih-Nan Chou, Guanmei Liu, et Herbert M. Kagan. 2003. « Lysyl Oxidase Oxidizes Basic Fibroblast Growth Factor and Inactivates Its Mitogenic Potential ». *Journal of Cellular Biochemistry* 88 (1): 152-64. <https://doi.org/10.1002/jcb.10304>.

Li, Weiming, Scott A. Johnson, William C. Shelley, et Mervin C. Yoder. 2004. « Hematopoietic Stem Cell Repopulating Ability Can Be Maintained in Vitro by Some Primary Endothelial Cells ». *Experimental Hematology* 32 (12): 1226-37. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.09.001>.

Li, Xin, Robert Loberg, Jinhui Liao, Chi Ying, Linda A. Snyder, Kenneth J. Pienta, et Laurie K. McCauley. 2009. « A Destructive Cascade Mediated by CCL2 Facilitates Prostate Cancer Growth in Bone ». *Cancer Research* 69 (4): 1685-92. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2164>.

Link, Daniel C. 2015. « Regulation of Hematopoiesis by CXCL12/CXCR4 Signaling ». In *Targeted Therapy of Acute Myeloid Leukemia*, édité par Michael Andreeff, 593-605. Current

Cancer Research. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1393-0_30.

Liu, Na, Thomas R. Cox, Weiyinqi Cui, Gunnar Adell, Birgitta Holmlund, Jie Ping, Ingvar Jarlsfelt, Janine T. Erler, et Xiao-Feng Sun. 2016. « Nuclear expression of lysyl oxidase enzyme is an independent prognostic factor in rectal cancer patients ». *Oncotarget* 8 (36): 60015-24. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9623>.

Liu, Xiaoqing, Yun Zhao, Jiangang Gao, Basil Pawlyk, Barry Starcher, Jeffrey A. Spencer, Hiromi Yanagisawa, Jian Zuo, et Tiansen Li. 2004. « Elastic Fiber Homeostasis Requires Lysyl Oxidase-like 1 Protein ». *Nature Genetics* 36 (2): 178-82. <https://doi.org/10.1038/ng1297>.

Lodillinsky, C., E. Infante, A. Guichard, R. Chaligné, L. Fuhrmann, J. Cyrta, M. Irondelle, et al. 2016. « P63/MT1-MMP Axis Is Required for in Situ to Invasive Transition in Basal-like Breast Cancer ». *Oncogene* 35 (3): 344-57. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.87>.

López-Jiménez, Alberto J., Trayambak Basak, et Roberto M. Vanacore. 2017. « Proteolytic Processing of Lysyl Oxidase-like-2 in the Extracellular Matrix Is Required for Crosslinking of Basement Membrane Collagen IV ». *Journal of Biological Chemistry* 292 (41): 16970-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.798603>.

Lu, Pengfei, Ken Takai, Valerie M. Weaver, et Zena Werb. 2011. « Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>.

Lucero, H. A., et H. M. Kagan. 2006. « Lysyl Oxidase: An Oxidative Enzyme and Effector of Cell Function ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63 (19-20): 2304-16. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6149-9>.

Ma, Li, Chao Huang, Xiong-Jun Wang, Dazhuan Eric Xin, Li-shun Wang, Quanli C. Zou, Ya-nan S. Zhang, et al. 2017. « Lysyl Oxidase 3 Is a Dual-Specificity Enzyme Involved in STAT3 Deacetylation and Deacetylimination Modulation ». *Molecular Cell* 65 (2): 296-309. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.002>.

Macias, Hector, et Lindsay Hinck. 2012. « Mammary gland development ». *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 1 (4): 533-57. <https://doi.org/10.1002/wdev.35>.

Magalhães, Ana, et Sergio Dias. 2019. « Angiogenesis – Vessels Recruitment by Tumor Cells ». In *Molecular and Cell Biology of Cancer: When Cells Break the Rules and Hijack Their Own Planet*, édité par Rita Fior et Rita Zilhão, 141-57. Learning Materials in Biosciences. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11812-9_8.

Magbanua, M. J. M., C. Yau, D. Wolf, J. S. Lee, A. Chattopadhyay, J. H. Scott, E. Yoder, et al. 2019. « Abstract P3-01-02: Detection of Circulating Tumor Cells (CTC) in Blood and Disseminated Tumor Cells (DTC) in Bone Marrow at Surgery Identifies Breast Cancer Patients (Pts) with Long-Term Risk of Distant Recurrence and Breast Cancer-Specific Death ». *Cancer Research* 79 (4 Supplement): P3-01-02-P3-01-02. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS18-P3-01-02>.

Mäki, Joni M., Raija Sormunen, Sari Lippo, Riitta Kaarteenaho-Wiik, Raija Soininen, et Johanna Myllyharju. 2005. « Lysyl Oxidase Is Essential for Normal Development and Function of the Respiratory System and for the Integrity of Elastic and Collagen Fibers in Various Tissues ». *The American Journal of Pathology* 167 (4): 927-36.

Mäki, Joni M., Hilikka Tikkanen, et Kari I. Kivirikko. 2001. « Cloning and Characterization of a Fifth Human Lysyl Oxidase Isoenzyme: The Third Member of the Lysyl Oxidase-Related Subfamily with Four Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domains ». *Matrix Biology* 20 (7): 493-96. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00157-3).

Martin, Alberto, Fernando Salvador, Gema Moreno-Bueno, Alfredo Floristán, Cristina Ruiz-Herguido, Eva P. Cuevas, Saleta Morales, et al. 2015. « Lysyl Oxidase-like 2 Represses Notch1 Expression in the Skin to Promote Squamous Cell Carcinoma Progression ». *The EMBO Journal* 34 (8): 1090-1109. <https://doi.org/10.15252/embj.201489975>.

McAllister, Sandra S., Ann M. Gifford, Ashley L. Greiner, Stephen P. Kelleher, Matthew P. Saelzler, Tan A. Ince, Ferenc Reinhardt, et al. 2008. « Systemic Endocrine Instigation of Indolent Tumor Growth Requires Osteopontin ». *Cell* 133 (6): 994-1005. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.045>.

McGuire, Andrew, James A. L. Brown, et Michael J. Kerin. 2015. « Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring ». *Cancer Metastasis Reviews* 34: 145-55. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9551-7>.

- McPherson, K, C M Steel, et J M Dixon. 2000. « Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics ». *BMJ : British Medical Journal* 321 (7261): 624-28.
- Mecham, Robert. 2011. *The Extracellular Matrix: An Overview*. Springer Science & Business Media.
- Mello, M. L., S. Contente, B. C. Vidal, W. Planding, et U. Schenck. 1995. « Modulation of Ras Transformation Affecting Chromatin Supraorganization as Assessed by Image Analysis ». *Experimental Cell Research* 220 (2): 374-82.
<https://doi.org/10.1006/excr.1995.1328>.
- Mello, Maria Luiza S., Elenice M. Alvarenga, Benedicto de Campos Vidal, et Armando Di Donato. 2011. « Chromatin Supraorganization, Mitotic Abnormalities and Proliferation in Cells with Increased or down-Regulated Lox Expression: Indirect Evidence of a LOX-Histone H1 Interaction in Vivo ». *Micron (Oxford, England: 1993)* 42 (1): 8-16.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.09.001>.
- Menkes, John H. 1988. « Kinky hair disease: Twenty five years later ». *Brain and Development* 10 (2): 77-79. [https://doi.org/10.1016/S0387-7604\(88\)80074-3](https://doi.org/10.1016/S0387-7604(88)80074-3).
- Min, Chengyin, Ziyang Yu, Kathrin H. Kirsch, Yingshe Zhao, Siddharth R. Vora, Philip C. Trackman, Douglas B. Spicer, Lynn Rosenberg, Julie R. Palmer, et Gail E. Sonenshein. 2009. « A Loss-of-Function Polymorphism in the Propeptide Domain of the LOX Gene and Breast Cancer ». *Cancer Research* 69 (16): 6685-93. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4818>.
- Molnar, J., K. S. K. Fong, Q. P. He, K. Hayashi, Y. Kim, S. F. T. Fong, B. Fogelgren, K. Molnarne Szauter, M. Mink, et K. Csiszar. 2003. « Structural and Functional Diversity of Lysyl Oxidase and the LOX-like Proteins ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1647 (1-2): 220-24. [https://doi.org/10.1016/s1570-9639\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/s1570-9639(03)00053-0).
- Moon, Hee-Jung, Joel Finney, Li Xu, David Moore, Danny R. Welch, et Minae Mure. 2013. « MCF-7 Cells Expressing Nuclear Associated Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Exhibit an Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Phenotype and Are Highly Invasive in Vitro ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (42): 30000-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.C113.502310>.
- Moreno-Bueno, Gema, Fernando Salvador, Alberto Martín, Alfredo Floristán, Eva P. Cuevas, Vanesa Santos, Amalia Montes, et al. 2011. « Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator

of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas ». *EMBO Molecular Medicine* 3 (9): 528-44. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100156>.

Nellaiappan, Kaliappanadar, Antonina Risitano, Guanmei Liu, Gerald Nicklas, et Herbert M. Kagan. 2000. « Fully Processed Lysyl Oxidase Catalyst Translocates from the Extracellular Space into Nuclei of Aortic Smooth-Muscle Cells ». *Journal of Cellular Biochemistry* 79 (4): 576-82. [https://doi.org/10.1002/1097-4644\(20001215\)79:4<576::AID-JCB60>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-4644(20001215)79:4<576::AID-JCB60>3.0.CO;2-A).

Nguyen, Don X., Paula D. Bos, et Joan Massagué. 2009. « Metastasis: From Dissemination to Organ-Specific Colonization ». *Nature Reviews Cancer* 9 (4): 274-84. <https://doi.org/10.1038/nrc2622>.

Nilsson, Maria, Christina Hägglöf, Peter Hammarsten, Elin Thysell, Pär Stattin, Lars Egevad, Torvald Granfors, et al. 2015. « High Lysyl Oxidase (LOX) in the Non-Malignant Prostate Epithelium Predicts a Poor Outcome in Prostate Cancer Patient Managed by Watchful Waiting ». *PloS One* 10 (10): e0140985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140985>.

Ninomiya, Go, Suguru Yamada, Masamichi Hayashi, Shigeomi Takeda, Masaya Suenaga, Hideki Takami, Mitsuro Kanda, et al. 2018. « Significance of Lysyl Oxidase-like 2 Gene Expression on the Epithelial-mesenchymal Status of Hepatocellular Carcinoma ». *Oncology Reports* 39 (6): 2664-72. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6349>.

Nishikawa, Rika, Takeshi Chiyomaru, Hideki Enokida, Satoru Inoguchi, Tomoaki Ishihara, Ryosuke Matsushita, Yusuke Goto, Ichiro Fukumoto, Masayuki Nakagawa, et Naohiko Seki. 2015. « Tumour-Suppressive *MicroRNA-29s* Directly Regulate *LOXL2* Expression and Inhibit Cancer Cell Migration and Invasion in Renal Cell Carcinoma ». *FEBS Letters* 589 (16): 2136-45. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.005>.

O’Carrigan, Brent, Matthew Hf Wong, Melina L. Willson, Martin R. Stockler, Nick Pavlakis, et Annabel Goodwin. 2017. « Bisphosphonates and Other Bone Agents for Breast Cancer ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 10: CD003474. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003474.pub4>.

O’Flaherty, E. J. 2000. « Modeling Normal Aging Bone Loss, with Consideration of Bone Loss in Osteoporosis ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 55 (1): 171-88. <https://doi.org/10.1093/toxsci/55.1.171>.

Okada, Kazushi, Hee-Jung Moon, Joel Finney, Frédéric Couture, Robert Day, et Minae Mure.

2017. « PACE4 Proteolytically Processes LOXL2 with Little Impact on Its Catalytic Activity ». *Journal of Biological Chemistry*, novembre, jbc.C117.810978.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C117.810978>.

Oldfield, Rachel N., Kathryn A. Johnston, Jeanette Limones, Caitlin Ghilarducci, et Karlo M. Lopez. 2018. « Identification of Histidine 303 as the Catalytic Base of Lysyl Oxidase via Site-Directed Mutagenesis ». *The Protein Journal* 37 (1): 47-57. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9749-3>.

Omatsu, Yoshiki, Tatsuki Sugiyama, Hiroshi Kohara, Gen Kondoh, Nobutaka Fujii, Kenji Kohno, et Takashi Nagasawa. 2010. « The Essential Functions of Adipo-Osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche ». *Immunity* 33 (3): 387-99. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.017>.

Ono, K., T. Tanaka, T. Tsunoda, O. Kitahara, C. Kihara, A. Okamoto, K. Ochiai, T. Takagi, et Y. Nakamura. 2000. « Identification by CDNA Microarray of Genes Involved in Ovarian Carcinogenesis ». *Cancer Research* 60 (18): 5007-11.

Ortner, DONALD J., et GORDON Turner-walker. 2003. « CHAPTER 2 - The Biology of Skeletal Tissues ». In *Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains (Second Edition)*, édité par DONALD J. Ortner, 11-35. San Diego: Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-012528628-2/50039-9>.

Osawa, T., N. Ohga, K. Akiyama, Y. Hida, K. Kitayama, T. Kawamoto, K. Yamamoto, et al. 2013. « Lysyl Oxidase Secreted by Tumour Endothelial Cells Promotes Angiogenesis and Metastasis ». *British Journal of Cancer* 109 (8): 2237-47.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2013.535>.

Ovet, Hale, et Fusun Oztay. 2014. « The Copper Chelator Tetrathiomolybdate Regressed Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice, by Reducing Lysyl Oxidase Expressions ». *Biological Trace Element Research* 162 (1-3): 189-99. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0142-1>.

Paget, Stephen. 1889. « THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. » *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 3421, 133 (3421): 571-73. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49915-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49915-0).

Palamakumbura, A H, S R Vora, M A Nugent, K H Kirsch, G E Sonenshein, et P C

Trackman. 2009. « Lysyl Oxidase Propeptide Inhibits Prostate Cancer Cell Growth by Mechanisms That Target FGF-2-Cell Binding and Signaling ». *Oncogene* 28 (38): 3390-3400. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.203>.

Palumbo, Joseph S., Kathryn E. Talmage, Jessica V. Massari, Christine M. La Jeunesse, Matthew J. Flick, Keith W. Kombrinck, Zhiwei Hu, Kelley A. Barney, et Jay L. Degen. 2007. « Tumor Cell-Associated Tissue Factor and Circulating Hemostatic Factors Cooperate to Increase Metastatic Potential through Natural Killer Cell-Dependent and-Independent Mechanisms ». *Blood* 110 (1): 133-41. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-065995>.

Panchenko, Maria V., William G. Stetler-Stevenson, Olga V. Trubetskoy, Stephen N. Gacheru, et Herbert M. Kagan. 1996. « Metalloproteinase Activity Secreted by Fibrogenic Cells in the Processing of Prolysyl Oxidase POTENTIAL ROLE OF PROCOLLAGEN C-PROTEINASE ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (12): 7113-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.12.7113>.

Park, Joon Seong, Ji-Hae Lee, Yun Sun Lee, Jae Keun Kim, Seung Myung Dong, et Dong Sup Yoon. 2016. « Emerging Role of LOXL2 in the Promotion of Pancreas Cancer Metastasis ». *Oncotarget* 7 (27): 42539-52. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9918>.

Park, Pil-Gu, Su Ji Jo, Min Jung Kim, Hyun Jeong Kim, Ji Hae Lee, Cheol Keun Park, Hyunki Kim, et al. 2017. « Role of LOXL2 in the epithelial-mesenchymal transition and colorectal cancer metastasis ». *Oncotarget* 8 (46): 80325-35. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18170>.

Patel, Lalit R., Daniel F. Camacho, Yusuke Shiozawa, Kenneth J. Pienta, et Russell S. Taichman. 2011. « Mechanisms of Cancer Cell Metastasis to the Bone: A Multistep Process ». *Future Oncology (London, England)* 7 (11): 1285-97. <https://doi.org/10.2217/fon.11.112>.

Payne, Stacey L., Ben Fogelgren, Angela R. Hess, Elisabeth A. Seftor, Elizabeth L. Wiley, Sheri F.T. Fong, Katalin Csiszar, Mary J.C. Hendrix, et Dawn A. Kirschmann. 2005. « Lysyl Oxidase Regulates Breast Cancer Cell Migration and Adhesion through a Hydrogen Peroxide-Mediated Mechanism ». *Cancer Research* 65 (24): 11429-36. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1274>.

Payne, Stacey L., Mary J. C. Hendrix, et Dawn A. Kirschmann. 2006. « Lysyl Oxidase

Regulates Actin Filament Formation through the P130(Cas)/Crk/DOCK180 Signaling Complex ». *Journal of Cellular Biochemistry* 98 (4): 827-37.

<https://doi.org/10.1002/jcb.20792>.

———. 2007. « Paradoxical Roles for Lysyl Oxidases in Cancer—A Prospect ». *Journal of Cellular Biochemistry* 101 (6): 1338-54. <https://doi.org/10.1002/jcb.21371>.

Peinado, Héctor, Maria Del Carmen Iglesias-de la Cruz, David Olmeda, Katalin Csiszar, Keith S. K. Fong, Sonia Vega, Maria Angela Nieto, Amparo Cano, et Francisco Portillo. 2005. « A Molecular Role for Lysyl Oxidase-like 2 Enzyme in Snail Regulation and Tumor Progression ». *The EMBO Journal* 24 (19): 3446-58.

<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600781>.

Peinado, Héctor, Gema Moreno-Bueno, David Hardisson, Eduardo Pérez-Gómez, Vanesa Santos, Marta Mendiola, Juan Ignacio de Diego, et al. 2008. « Lysyl Oxidase-like 2 as a New Poor Prognosis Marker of Squamous Cell Carcinomas ». *Cancer Research* 68 (12): 4541-50.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6345>.

Peng, Liang, Yu-Liang Ran, Hai Hu, Long Yu, Qian Liu, Zhuan Zhou, Yue-Min Sun, et al. 2009. « Secreted LOXL2 Is a Novel Therapeutic Target That Promotes Gastric Cancer Metastasis via the Src/FAK Pathway ». *Carcinogenesis* 30 (10): 1660-69.

<https://doi.org/10.1093/carcin/bgp178>.

Perou, Charles M., Therese Sørlie, Michael B. Eisen, Matt van de Rijn, Stefanie S. Jeffrey, Christian A. Rees, Jonathan R. Pollack, et al. 2000. « Molecular Portraits of Human Breast Tumours ». *Nature* 406 (6797): 747. <https://doi.org/10.1038/35021093>.

Peters, S., P. Clézardin, I. Márquez-Rodas, D. Niepel, et C. Gedye. 2019. « The RANK–RANKL Axis: An Opportunity for Drug Repurposing in Cancer? » *Clinical and Translational Oncology* 21 (8): 977-91. <https://doi.org/10.1007/s12094-018-02023-5>.

Pez, Floriane, Frédéric Dayan, Jérôme Durivault, Bastien Kaniewski, Géraldine Aimond, Gabrielle S. Le Provost, Blandine Deux, et al. 2011. « The HIF-1–Inducible Lysyl Oxidase Activates HIF-1 via the Akt Pathway in a Positive Regulation Loop and Synergizes with HIF-1 in Promoting Tumor Cell Growth ». *Cancer Research* 71 (5): 1647-57.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1516>.

Pickup, Michael W, Janna K Mouw, et Valerie M Weaver. 2014. « The extracellular matrix

modulates the hallmarks of cancer ». *EMBO reports* 15 (12): 1243-53.

<https://doi.org/10.15252/embr.201439246>.

Pinnell, S R, et G R Martin. 1968. « The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to alpha-amino adipic-delta-semialdehyde (allysine) by an extract from bone. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61 (2): 708-16.

Pires Martins, R., R. E. Leach, et S. A. Krawetz. 2001. « Whole-Body Gene Expression by Data Mining ». *Genomics* 72 (1): 34-42. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6437>.

Pischon, N., J. M. Mäki, P. Weisshaupt, N. Heng, A. H. Palamakumbura, P. N'Guessan, A. Ding, et al. 2009. « Lysyl Oxidase (Lox) Gene Deficiency Affects Osteoblastic Phenotype ». *Calcified tissue international* 85 (2): 119-26. <https://doi.org/10.1007/s00223-009-9252-8>.

Polgar, Noemi, Ben Fogelgren, J. Michael Shipley, et Katalin Csiszar. 2007. « Lysyl Oxidase Interacts with Hormone Placental Lactogen and Synergistically Promotes Breast Epithelial Cell Proliferation and Migration ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (5): 3262-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609407200>.

Qian, Hong, Natalija Buza-Vidas, Craig D. Hyland, Christina T. Jensen, Jennifer Antonchuk, Robert Månsson, Lina A. Thoren, Marja Ekblom, Warren S. Alexander, et Sten Eirik W. Jacobsen. 2007. « Critical Role of Thrombopoietin in Maintaining Adult Quiescent Hematopoietic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 1 (6): 671-84. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.008>.

Raymaekers, Koen, Steve Stegen, Nick van Gastel, et Geert Carmeliet. 2015. « The vasculature: a vessel for bone metastasis ». *BoneKEY Reports* 4 (septembre). <https://doi.org/10.1038/bonekey.2015.111>.

Reiser, K., R. J. McCormick, et R. B. Rucker. 1992. « Enzymatic and Nonenzymatic Cross-Linking of Collagen and Elastin ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6 (7): 2439-49. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.7.1348714>.

Reynaud, Caroline, Laura Ferreras, Paola Di Mauro, Casina Kan, Martine Croset, Edith Bonnelye, Floriane Pez, et al. 2017. « Lysyl Oxidase Is a Strong Determinant of Tumor Cell Colonization in Bone ». *Cancer Research* 77 (2): 268-78. <https://doi.org/10.1158/0008->

5472.CAN-15-2621.

Riihimäki, Matias, Akseli Hemminki, Jan Sundquist, et Kari Hemminki. 2016. « Patterns of Metastasis in Colon and Rectal Cancer ». *Scientific Reports* 6 (1): 1-9.

<https://doi.org/10.1038/srep29765>.

Rivenbark, Ashley G., Siobhan M. O'Connor, et William B. Coleman. 2013. « Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer: Challenges for Personalized Medicine ». *The American Journal of Pathology* 183 (4): 1113-24.

<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.002>.

Rodriguez, Hector M., Maria Vaysberg, Amanda Mikels, Scott McCauley, Arleene C. Velayo, Carlos Garcia, et Victoria Smith. 2010. « Modulation of Lysyl Oxidase-like 2 Enzymatic Activity by an Allosteric Antibody Inhibitor ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (27): 20964-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094136>.

Roh-Johnson, M., J. J. Bravo-Cordero, A. Patsialou, V. P. Sharma, P. Guo, H. Liu, L. Hodgson, et J. Condeelis. 2014. « Macrophage Contact Induces RhoA GTPase Signaling to Trigger Tumor Cell Intravasation ». *Oncogene* 33 (33): 4203-12.

<https://doi.org/10.1038/onc.2013.377>.

Rose, April A. N., et Peter M. Siegel. 2010. « Emerging Therapeutic Targets in Breast Cancer Bone Metastasis ». *Future Oncology (London, England)* 6 (1): 55-74.

<https://doi.org/10.2217/fon.09.138>.

Ross, F. Patrick. 2013. « Osteoclast Biology and Bone Resorption ». In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 25-33. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118453926.ch3>.

Rost, T., V. Pyritz, I. O. Rathcke, T. Görögh, A. A. Dünne, et J. A. Werner. 2003. « Reduction of LOX- and LOXL2-MRNA Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas ». *Anticancer Research* 23 (2B): 1565-73.

Rucker, R B, T Kosonen, M S Clegg, A E Mitchell, B R Rucker, J Y Uriu-Hare, et C L Keen. 1998. « Copper, Lysyl Oxidase, and Extracellular Matrix Protein Cross-Linking ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 67 (5): 996S-1002S.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/67.5.996S>.

Ruddy, K. J., et E. P. Winer. 2013. « Male Breast Cancer: Risk Factors, Biology, Diagnosis, Treatment, and Survivorship ». *Annals of Oncology* 24 (6): 1434-43.

<https://doi.org/10.1093/annonc/mdt025>.

Saito, Hiroshi, John Papaconstantinou, Hiroyuki Sato, et Samuel Goldstein. 1997. « Regulation of a Novel Gene Encoding a Lysyl Oxidase-Related Protein in Cellular Adhesion and Senescence ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (13): 8157-60.

<https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8157>.

Sakai, Makoto, Hiroyuki Kato, Akihiko Sano, Naritaka Tanaka, Takanori Inose, Hitoshi Kimura, Makoto Sohda, Masanobu Nakajima, et Hiroyuki Kuwano. 2009. « Expression of Lysyl Oxidase Is Correlated with Lymph Node Metastasis and Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma ». *Annals of Surgical Oncology* 16 (9): 2494-2501.

<https://doi.org/10.1245/s10434-009-0559-5>.

Salvador, Fernando, Alberto Martin, Celia López-Menéndez, Gema Moreno-Bueno, Vanesa Santos, Alberto Vázquez-Naharro, Patricia G. Santamaria, et al. 2017. « Lysyl Oxidase-like Protein LOXL2 Promotes Lung Metastasis of Breast Cancer ». *Cancer Research* 77 (21): 5846-59.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3152>.

Santamaría, Patricia G., Alfredo Floristán, Bárbara Fontanals-Cirera, Alberto Vázquez-Naharro, Vanesa Santos, Saleta Morales, Lourdes Yuste, et al. 2018. « Lysyl Oxidase-like 3 Is Required for Melanoma Cell Survival by Maintaining Genomic Stability ». *Cell Death & Differentiation* 25 (5): 935. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0030-2>.

Satelli, Arun, Abhisek Mitra, Zachary Brownlee, Xueqing Xia, Seth Bellister, Michael J. Overman, Scott Kopetz, Lee M. Ellis, Qing H. Meng, et Shulin Li. 2015. « Epithelial-Mesenchymal Transitioned Circulating Tumor Cells Capture for Detecting Tumor Progression ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (4): 899-906. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0894>.

Sato, Seiichi, Philip C. Trackman, Joni M. Mäki, Johanna Myllyharju, Kathrin H. Kirsch, et Gail E. Sonenshein. 2011. « The Ras Signaling Inhibitor LOX-PP Interacts with Hsp70 and c-Raf To Reduce Erk Activation and Transformed Phenotype of Breast Cancer Cells ▽ ». *Molecular and Cellular Biology* 31 (13): 2683-95. <https://doi.org/10.1128/MCB.01148-10>.

Saux, Claude Jourdan-Le, Heike Tronecker, Ljubica Bogic, Gillian D. Bryant-Greenwood,

Charles D. Boyd, et Katalin Csiszar. 1999. « The LOXL2 Gene Encodes a New Lysyl Oxidase-like Protein and Is Expressed at High Levels in Reproductive Tissues ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (18): 12939-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12939>.

Schietke, Ruth, Christina Warnecke, Ingrid Wacker, Johannes Schödel, David R. Mole, Valentina Campean, Kerstin Amann, et al. 2010. « The Lysyl Oxidases LOX and LOXL2 Are Necessary and Sufficient to Repress E-Cadherin in Hypoxia INSIGHTS INTO CELLULAR TRANSFORMATION PROCESSES MEDIATED BY HIF-1 ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (9): 6658-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.042424>.

Schofield, R. 1978. « The Relationship between the Spleen Colony-Forming Cell and the Haemopoietic Stem Cell ». *Blood Cells* 4 (1-2): 7-25.

Schwarzbauer, Jean E., et Douglas W. DeSimone. 2011. « Fibronectins, Their Fibrillogenesis, and In Vivo Functions ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005041>.

Seeman, Ego, et Pierre D. Delmas. 2006. « Bone Quality — The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility ». *New England Journal of Medicine* 354 (21): 2250-61. <https://doi.org/10.1056/NEJMra053077>.

Semenza, Gregg L. 2016. « The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Tumor Microenvironment Regulation of Cancer Cell Survival, Metastasis, Inflammation and Immune Surveillance*, 1863 (3): 382-91. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.036>.

Shao, Jialiang, Jiongjiang Lu, Wencheng Zhu, Hua Yu, Xiaoqian Jing, Yi-Lin Wang, Xiang Wang, et Xiong-Jun Wang. 2019. « Derepression of LOXL4 Inhibits Liver Cancer Growth by Reactivating Compromised P53 ». *Cell Death & Differentiation*, février, 1. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0293-x>.

Sharma-Bhandari, Anjali, Sun-Hyang Park, Ju-Young Kim, Jaemin Oh, et Youngho Kim. 2015. « Lysyl oxidase modulates the osteoblast differentiation of primary mouse calvaria cells ». *International Journal of Molecular Medicine* 36 (6): 1664-70. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2384>.

Shih, Yin-Hua, Kuo-Wei Chang, Michael Yuanchien Chen, Cheng-Chia Yu, Dan-Jae Lin, Shih-Min Hsia, Heng-Li Huang, et Tzong-Ming Shieh. 2013. « Lysyl oxidase and

enhancement of cell proliferation and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma ». *Head & Neck* 35 (2): 250-56. <https://doi.org/10.1002/hed.22959>.

Shiozawa, Yusuke, Elisabeth A. Pedersen, Aaron M. Havens, Younghun Jung, Anjali Mishra, Jeena Joseph, Jin Koo Kim, et al. 2011. « Human Prostate Cancer Metastases Target the Hematopoietic Stem Cell Niche to Establish Footholds in Mouse Bone Marrow ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (4): 1298-1312. <https://doi.org/10.1172/JCI43414>.

Simonet, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Lüthy, H. Q. Nguyen, et al. 1997. « Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density ». *Cell* 89 (2): 309-19. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80209-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80209-3).

Sims, Natalie A, et T John Martin. 2014. « Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit ». *BoneKEY Reports* 3 (janvier). <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.215>.

Skibinski, Adam, et Charlotte Kuperwasser. 2015. « The origin of breast tumor heterogeneity ». *Oncogene* 34 (42): 5309-16. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.475>.

Smith-Mungo, Lynda I., et Herbert M. Kagan. 1998. « Lysyl oxidase: Properties, regulation and multiple functions in biology ». *Matrix Biology* 16 (7): 387-98. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(98\)90012-9](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(98)90012-9).

Sousa, Sofia, et Philippe Clézardin. 2018. « Bone-Targeted Therapies in Cancer-Induced Bone Disease ». *Calcified Tissue International* 102 (2): 227-50. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0353-5>.

Spicer, Graham L. C., Samira M. Azarin, Ji Yi, Scott T. Young, Ronald Ellis, Greta M. Bauer, Lonnie D. Shea, et Vadim Backman. 2016. « Detection of Extracellular Matrix Modification in Cancer Models with Inverse Spectroscopic Optical Coherence Tomography ». *Physics in Medicine and Biology* 61 (19): 6892–6904. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/61/19/6892>.

Stamenkovic, Ivan. 2003. « Extracellular Matrix Remodelling: The Role of Matrix Metalloproteinases ». *The Journal of Pathology* 200 (4): 448-64. <https://doi.org/10.1002/path.1400>.

Suresh. s. d. « Colorectal cancer presenting as bone metastasis ». Consulté le 7 septembre 2019. <http://www.cancerjournal.net/article.asp?issn=0973->

1482;year=2017;volume=13;issue=1;spage=80;epage=83;aulast=Suresh.

Szauter, Kornelia Molnarne, Tongyu Cao, Charles D. Boyd, et Katalin Csiszar. 2005. « Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin ». *Pathologie Biologie* 53 (7): 448-56. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.033>.

Tahara, Rie K., Takae M. Brewer, Richard L. Theriault, et Naoto T. Ueno. 2019. « Bone Metastasis of Breast Cancer ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1152: 105-29. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_7.

Taichman, Russell S., Marcelle J. Reilly, et Stephen G. Emerson. 2000. « The Hematopoietic Microenvironment: Osteoblasts and The Hematopoietic Microenvironment ». *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 4 (5): 421-26.

Tan, Cong-Cong, Gui-Xi Li, Li-Duan Tan, Xin Du, Xiao-Qing Li, Rui He, Qing-Shan Wang, et Yu-Mei Feng. 2016. « Breast cancer cells obtain an osteomimetic feature via epithelial-mesenchymal transition that have undergone BMP2/RUNX2 signaling pathway induction ». *Oncotarget* 7 (48): 79688-705. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12939>.

Tang, Chunlin, et Judith P. Klinman. 2001. « The Catalytic Function of Bovine Lysyl Oxidase in the Absence of Copper ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (33): 30575-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100138200>.

Tang, HaoRan, Leo Leung, Grazia Saturno, Amaya Viros, Duncan Smith, Gianpiero Di Leva, Eamonn Morrison, et al. 2017. « Lysyl Oxidase Drives Tumour Progression by Trapping EGF Receptors at the Cell Surface ». *Nature Communications* 8 (avril): 14909. <https://doi.org/10.1038/ncomms14909>.

Teng, Li-song, Yi Zheng, et Hao-hao Wang. 2008. « BRCA1/2 associated hereditary breast cancer ». *Journal of Zhejiang University. Science. B* 9 (2): 85-89. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0710617>.

Thomassin, Laetitia, Claudio C. Werneck, Thomas J. Broekelmann, Claudine Gleyzal, Ian K. Hornstra, Robert P. Mecham, et Pascal Sommer. 2005. « The Pro-Regions of Lysyl Oxidase and Lysyl Oxidase-like 1 Are Required for Deposition onto Elastic Fibers ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (52): 42848-55. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506832200>.

Tian, Erming, Fenghuang Zhan, Ronald Walker, Erik Rasmussen, Yupo Ma, Bart Barlogie, et

John D. Shaughnessy. 2003. « The Role of the Wnt-Signaling Antagonist DKK1 in the Development of Osteolytic Lesions in Multiple Myeloma ». *The New England Journal of Medicine* 349 (26): 2483-94. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030847>.

Tjin, Gavin, Eric S. White, Alen Faiz, Delphine Sicard, Daniel J. Tschumperlin, Annabelle Mahar, Eleanor P. W. Kable, et Janette K. Burgess. 2017. « Lysyl Oxidases Regulate Fibrillar Collagen Remodelling in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Disease Models & Mechanisms* 10 (11): 1301-12. <https://doi.org/10.1242/dmm.030114>.

Toss, Angela, et Massimo Cristofanilli. 2015. « Molecular Characterization and Targeted Therapeutic Approaches in Breast Cancer ». *Breast Cancer Research* 17 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0560-9>.

Trackman, P. C., D. Bedell-Hogan, J. Tang, et H. M. Kagan. 1992. « Post-Translational Glycosylation and Proteolytic Processing of a Lysyl Oxidase Precursor. » *Journal of Biological Chemistry* 267 (12): 8666-71.

Trackman, Philip C. 2016. « Lysyl Oxidase Isoforms and Potential Therapeutic Opportunities for Fibrosis and Cancer ». *Expert opinion on therapeutic targets* 20 (8): 935-45. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1151003>.

———. 2018. « Functional importance of lysyl oxidase family propeptide regions ». *Journal of Cell Communication and Signaling* 12 (1): 45-53. <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0424-4>.

Turecek, C., N. Fratzl-Zelman, M. Rumpler, B. Buchinger, S. Spitzer, R. Zoehrer, E. Durchschlag, K. Klaushofer, E. P. Paschalis, et F. Varga. 2008. « Collagen Cross-Linking Influences Osteoblastic Differentiation ». *Calcified Tissue International* 82 (5): 392-400. <https://doi.org/10.1007/s00223-008-9136-3>.

Umezaki, Naoki, Shigeki Nakagawa, Yo-Ichi Yamashita, Yuki Kitano, Kota Arima, Tatsunori Miyata, Yukiharu Hiyoshi, et al. 2019. « Lysyl Oxidase Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Predicts Intrahepatic Metastasis of Hepatocellular Carcinoma ». *Cancer Science* 110 (6): 2033-43. <https://doi.org/10.1111/cas.14010>.

Uzel, Mehmet Ilhan, Ian C. Scott, Hermik Babakhanlou-Chase, Amitha H. Palamakumbura, William N. Pappano, Hsiang-Hsi Hong, Daniel S. Greenspan, et Philip C. Trackman. 2001. « Multiple Bone Morphogenetic Protein 1-Related Mammalian Metalloproteinases Process

Pro-Lysyl Oxidase at the Correct Physiological Site and Control Lysyl Oxidase Activation in Mouse Embryo Fibroblast Cultures ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (25): 22537-43.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M102352200>.

Väänänen, Kalervo. 2005. « Mechanism of Osteoclast Mediated Bone Resorption--Rationale for the Design of New Therapeutics ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (7): 959-71.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.12.018>.

Vadasz, Zehava, Ofra Kessler, Gal Akiri, Stela Gengrinovitch, Herbert M. Kagan, Yaacov Baruch, Ofer Ben Izhak, et Gera Neufeld. 2005. « Abnormal Deposition of Collagen around Hepatocytes in Wilson's Disease Is Associated with Hepatocyte Specific Expression of Lysyl Oxidase and Lysyl Oxidase like Protein-2 ». *Journal of Hepatology* 43 (3): 499-507.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.02.052>.

Vallée, Alexandre, Yves Lecarpentier, Rémy Guillevin, et Jean-Noël Vallée. 2017. « Interactions between TGF-B1, Canonical WNT/ β -Catenin Pathway and PPAR γ in Radiation-Induced Fibrosis ». *Oncotarget* 8 (52): 90579-604.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.21234>.

Vallet, Sylvain D., et Sylvie Ricard-Blum. 2019. « Lysyl Oxidases: From Enzyme Activity to Extracellular Matrix Cross-Links ». *Essays in Biochemistry* 63 (3): 349-64.
<https://doi.org/10.1042/EBC20180050>.

Varnum-Finney, Barbara, Lia M. Halasz, Mingyi Sun, Thomas Gridley, Freddy Radtke, et Irwin D. Bernstein. 2011. « Notch2 governs the rate of generation of mouse long- and short-term repopulating stem cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (3): 1207-16.
<https://doi.org/10.1172/JCI43868>.

Wakasaki, H., et A. Ooshima. 1990. « Immunohistochemical Localization of Lysyl Oxidase with Monoclonal Antibodies ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 63 (3): 377-84.

Wang, Meili, Xiulan Zhao, Dongwang Zhu, Tiejun Liu, Xiaohui Liang, Fang Liu, Yanhui Zhang, Xueyi Dong, et Baocun Sun. 2017. « HIF-1 α Promoted Vasculogenic Mimicry Formation in Hepatocellular Carcinoma through LOXL2 up-Regulation in Hypoxic Tumor Microenvironment ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 36 (1): 60.
<https://doi.org/10.1186/s13046-017-0533-1>.

Wang, S. X., M. Mure, K. F. Medzihradzky, A. L. Burlingame, D. E. Brown, D. M. Dooley, A. J. Smith, H. M. Kagan, et J. P. Klinman. 1996. « A Crosslinked Cofactor in Lysyl Oxidase: Redox Function for Amino Acid Side Chains ». *Science* 273 (5278): 1078-84.
<https://doi.org/10.1126/science.273.5278.1078>.

Wang, Xin, Ke Hu Yang, Pingping Wanyan, et Jin Hui Tian. 2014. « Comparison of the Efficacy and Safety of Denosumab versus Bisphosphonates in Breast Cancer and Bone Metastases Treatment: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials ». *Oncology Letters* 7 (6): 1997-2002. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.1982>.

Wei, Jianwen, Junko Shimazu, Munevver P. Makinistoglu, Antonio Maurizi, Daisuke Kajimura, Haihong Zong, Takeshi Takarada, et al. 2015. « Glucose Uptake and Runx2 Synergize to Orchestrate Osteoblast Differentiation and Bone Formation ». *Cell* 161 (7): 1576-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.029>.

Weise, Jan Bernd, Pierre Rudolph, Axel Heiser, Marie-Luise Kruse, Jürgen Hedderich, Christian Cordes, Markus Hoffmann, et al. 2008. « LOXL4 Is a Selectively Expressed Candidate Diagnostic Antigen in Head and Neck Cancer ». *European Journal of Cancer* 44 (9): 1323-31. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.03.026>.

Whigham, Benjamin T., et R. Rand Allingham. 2011. « Review: The role of LOXL1 in exfoliation syndrome/glaucoma ». *Saudi Journal of Ophthalmology* 25 (4): 347-52.
<https://doi.org/10.1016/j.sjopt.2011.07.001>.

Wiel, C., A. Augert, D. F. Vincent, D. Gitenay, D. Vindrieux, B. Le Calvé, V. Arfi, et al. 2013. « Lysyl Oxidase Activity Regulates Oncogenic Stress Response and Tumorigenesis ». *Cell Death & Disease* 4 (10): e855. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.382>.

Wilgus, May-Lin, Alain C. Borczuk, Mark Stoopler, Mark Ginsburg, Lyall Gorenstein, Joshua R. Sonett, et Charles A. Powell. 2011. « Lysyl Oxidase: A Lung Adenocarcinoma Biomarker of Invasion and Survival ». *Cancer* 117 (10): 2186-91.
<https://doi.org/10.1002/cncr.25768>.

Winkler, Ingrid G., Natalie A. Sims, Allison R. Pettit, Valérie Barbier, Bianca Nowlan, Falak Helwani, Ingrid J. Poulton, et al. 2010. « Bone Marrow Macrophages Maintain Hematopoietic Stem Cell (HSC) Niches and Their Depletion Mobilizes HSCs ». *Blood* 116 (23): 4815-28.
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-253534>.

Wolfenson, Haguy, Irena Lavelin, et Benjamin Geiger. 2013. « Dynamic Regulation of the Structure and Functions of Integrin Adhesions ». *Developmental Cell* 24 (5): 447-58.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.02.012>.

Wong, Carmen Chak-Lui, Daniele M. Gilkes, Huafeng Zhang, Jasper Chen, Hong Wei, Pallavi Chaturvedi, Stephanie I. Fraley, et al. 2011. « Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (39): 16369-74.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1113483108>.

Wong, Carmen Chak-Lui, Aki Pui-Wah Tse, Yan-Ping Huang, Yan-Ting Zhu, David Kung-Chun Chiu, Robin Kit-Ho Lai, Sandy Leung-Kuen Au, et al. 2014. « Lysyl Oxidase-like 2 Is Critical to Tumor Microenvironment and Metastatic Niche Formation in Hepatocellular Carcinoma ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 60 (5): 1645-58.
<https://doi.org/10.1002/hep.27320>.

Wu, Linghong, et Ying Zhu. 2015. « The function and mechanisms of action of LOXL2 in cancer (Review) ». *International Journal of Molecular Medicine* 36 (5): 1200-1204.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2337>.

Wu, Min, Chengyin Min, Xiaobo Wang, Ziyang Yu, Kathrin H. Kirsch, Philip C. Trackman, et Gail E. Sonenshein. 2007. « Repression of BCL2 by the Tumor Suppressor Activity of the Lysyl Oxidase Propeptide Inhibits Transformed Phenotype of Lung and Pancreatic Cancer Cells ». *Cancer Research* 67 (13): 6278-85. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0776>.

Wu, Sifan, Qiongdan Zheng, Xiaoxia Xing, Yinying Dong, Yaohui Wang, Yang You, Rongxin Chen, et al. 2018. « Matrix stiffness-upregulated LOXL2 promotes fibronectin production, MMP9 and CXCL12 expression and BMDCs recruitment to assist pre-metastatic niche formation ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 37 (mai).
<https://doi.org/10.1186/s13046-018-0761-z>.

Wu, YaQiu, Zhili Li, Yi Shi, Longyi Chen, Haibin Tan, Zhenyu Wang, Cheng Yin, Ling Liu, et Juntong Hu. 2018. « Exome Sequencing Identifies LOXL2 Mutation as a Cause of Familial Intracranial Aneurysm ». *World Neurosurgery* 109 (janvier): e812-18.
<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.10.094>.

Wu, Ziping, et Jinsong Lu. 2018. « Advances in Treatment of Metastatic Breast Cancer with Bone Metastasis ». *Chinese Clinical Oncology* 7 (3). <https://doi.org/10.21037/cco.v0i0.19947>.

Xiang, Jingyu, Michelle A. Hurchla, Francesca Fontana, Xinming Su, Sarah R. Amend, Alison K. Esser, Garry J. Douglas, et al. 2015. « CXCR4 Protein Epitope Mimetic Antagonist POL5551 Disrupts Metastasis and Enhances Chemotherapy Effect in Triple-Negative Breast Cancer ». *Molecular Cancer Therapeutics* 14 (11): 2473-85. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0252>.

Xiao, Qian, et Gaoxiang Ge. 2012. « Lysyl Oxidase, Extracellular Matrix Remodeling and Cancer Metastasis ». *Cancer Microenvironment* 5 (3): 261-73. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0105-z>.

Xiong, Jinhua, et Charles A. O'Brien. 2012. « Osteocyte RANKL: New Insights into the Control of Bone Remodeling ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27 (3): 499-505. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1547>.

Yang, Yan-Meng, et Wan-Xi Yang. 2017. « Epithelial-to-mesenchymal transition in the development of endometriosis ». *Oncotarget* 8 (25): 41679-89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16472>.

Yao, Dianbo, Chaoliu Dai, et Songlin Peng. 2011. « Mechanism of the Mesenchymal–Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation ». *Molecular Cancer Research* 9 (12): 1608-20. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0568>.

Yao, Longbiao, Takafumi Yokota, Lijun Xia, Paul W. Kincade, et Rodger P. McEver. 2005. « Bone Marrow Dysfunction in Mice Lacking the Cytokine Receptor Gp130 in Endothelial Cells ». *Blood* 106 (13): 4093-4101. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0671>.

Yates, Lucy R., Stian Knappskog, David Wedge, James H. R. Farmery, Santiago Gonzalez, Inigo Martincorena, Ludmil B. Alexandrov, et al. 2017. « Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse ». *Cancer Cell* 32 (2): 169-184.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.005>.

Yue, Beatrice. 2014. « Biology of the Extracellular Matrix: An Overview ». *Journal of glaucoma*, S20-23. <https://doi.org/10.1097/IJG.000000000000108>.

- Zaffryar-Eilot, Shelly, Derek Marshall, Tali Voloshin, Avinoam Bar-Zion, Rhyannon Spangler, Ofra Kessler, Haben Ghermazien, et al. 2013. « Lysyl oxidase-like-2 promotes tumour angiogenesis and is a potential therapeutic target in angiogenic tumours ». *Carcinogenesis* 34 (10): 2370-79. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt241>.
- Zeltz, Cédric, Elena Pasko, Thomas R. Cox, Roya Navab, et Ming-Sound Tsao. 2019. « LOXL1 Is Regulated by Integrin A11 and Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Tumorigenicity ». *Cancers* 11 (5): 705. <https://doi.org/10.3390/cancers11050705>.
- Zhan, Ping, Xiao-kun Shen, Qian Qian, Ji-ping Zhu, Yu Zhang, Hai-Yan Xie, Chuen-Hua Xu, et al. 2012. « Down-Regulation of Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Is Associated with Disease Progression in Lung Adenocarcinomas ». *Medical Oncology* 29 (2): 648-55. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-9959-z>.
- Zhan, Xiu-Hui, Ji-Wei Jiao, Hai-Feng Zhang, Chun-Quan Li, Jian-Mei Zhao, Lian-di Liao, Jian-Yi Wu, et al. 2017. « A Three-Gene Signature from Protein-Protein Interaction Network of LOXL2- and Actin-Related Proteins for Esophageal Squamous Cell Carcinoma Prognosis ». *Cancer Medicine* 6 (7): 1707-19. <https://doi.org/10.1002/cam4.1096>.
- Zhang, Jian, Rui Yang, Ziyi Liu, Congzhe Hou, Wen Zong, Aizhen Zhang, Xiaoyang Sun, et Jiangang Gao. 2015. « Loss of Lysyl Oxidase-like 3 Causes Cleft Palate and Spinal Deformity in Mice ». *Human Molecular Genetics* 24 (21): 6174-85. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv333>.
- Zhang, Jiwang, Chao Niu, Ling Ye, Haiyang Huang, Xi He, Wei-Gang Tong, Jason Ross, et al. 2003. « Identification of the Haematopoietic Stem Cell Niche and Control of the Niche Size ». *Nature* 425 (6960): 836-41. <https://doi.org/10.1038/nature02041>.
- Zhang, Xiang H.-F., Xin Jin, Srinivas Malladi, Yilong Zou, Yong H. Wen, Edi Brogi, Marcel Smid, John A. Foekens, et Joan Massagué. 2013. « Selection of Bone Metastasis Seeds by Mesenchymal Signals in the Primary Tumor Stroma ». *Cell* 154 (5): 1060-73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.036>.
- Zhao, Meng, John M. Perry, Heather Marshall, Aparna Venkatraman, Pengxu Qian, Xi C. He, Jasimuddin Ahamed, et Linheng Li. 2014. « Megakaryocytes Maintain Homeostatic Quiescence and Promote Post-Injury Regeneration of Hematopoietic Stem Cells ». *Nature Medicine* 20 (11): 1321-26. <https://doi.org/10.1038/nm.3706>.
- Zhao, Yujie, et Alex A. Adjei. 2015. « Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving

Beyond Vascular Endothelial Growth Factor ». *The Oncologist* 20 (6): 660-73.

<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0465>.

Zlatic, Stephanie, Heather Skye Comstra, Avanti Gokhale, Michael J. Petris, et Victor Faundez. 2015. « Molecular basis of neurodegeneration and neurodevelopmental defects in Menkes disease ». *Neurobiology of Disease, Metals and Neurodegeneration*, 81 (septembre): 154-61. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.12.024>.

Zuber, J., O. I. Tchernitsa, B. Hinzmann, A. C. Schmitz, M. Grips, M. Hellriegel, C. Sers, A. Rosenthal, et R. Schäfer. 2000. « A Genome-Wide Survey of RAS Transformation Targets ». *Nature Genetics* 24 (2): 144-52. <https://doi.org/10.1038/72799>.

Annexes 1 & 2

Bone Metastases; Basic Aspects

Margaux Bernard, Paola Di Mauro, Caroline Reynaud, Chantal Diaz-Latoud, and Philippe Clézardin, INSERM, Faculty of Medicine Lyon East, Lyon, France

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Nomenclature

BMP-7	Bone morphogenetic protein 7	MAPK	Mitogen-activated protein kinase
CaSR	Calcium-sensing receptor	MSK1	Mitogen- and stress-activated kinase 1
CDH11	Cadherin 11	OPG	Osteoprotegerin
CTGF	Connective tissue growth factor	PDGF	Platelet-derived growth factor
CTSK	Cathepsin K	PTH-rP	Parathyroid hormone-related peptide
CX43	Connexin 43	RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12	RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
CXCR4	Couple chemokine (C-X-C) receptor type 4	RUNX2	Runt-related transcription factor 2
DKK1	Dickkopf-1	SIBLINGs	Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins
DTC	Disseminated tumor cell	SNO	Spindle-shaped N-cadherin + osteoblast
ET-1	Endothelin-1	SOST	Sclerostin
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2	TGF β -2	Transforming growth factor- β 2
FGF9	Fibroblast growth factor 9	TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
GAS6	Growth arrest-specific 6	TSP-1	Thrombospondin-1
HIF	Hypoxia-inducible factor	VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
HSC	Hematopoietic stem cell	Wnt	Wingless/int
IHH	Indian Hedgehog		
LIF	Leukemia inhibitory factor		
LOX	Lysyl oxidase		

Introduction

Bone metastases, the spread of cancer to the bones, occur in more than 1.5 million patients with cancer world-wide and are most commonly associated with cancers of the prostate, lung, and breast, with incidence rates as high as 75% of patients with metastatic disease (Weilbaecher *et al.*, 2011). Metastatic cancer cells residing in the bone marrow alter the functions of bone-resorbing (osteoclasts) and bone-forming (osteoblasts) cells (Weilbaecher *et al.*, 2011). By disrupting the physiological balance between bone resorption and bone formation, metastatic cells promote skeletal destruction (Weilbaecher *et al.*, 2011). Weakened bones due to skeletal metastases can then lead to occurrence of skeletal-related events, such as fractures and compression of the spinal cord, bone pain and disability, contributing substantially to morbidity and mortality in patients with advanced cancer (Weilbaecher *et al.*, 2011). Here we provide an overview of the mechanisms of bone metastasis formation.

Bone metastasis is a stepwise sequence of events that include tumor cell colonization of the bone marrow, construction of a cancer niche, tumor cell interactions with bone cells (osteoclasts, osteoblasts) and release of signals from the resorbed bone matrix that promote skeletal tumor growth. Molecular mechanisms that mediate each of these events are described below.

Bone Colonization by Tumor Cells

Pre-metastatic Niche

Experimental studies suggest that, even before becoming clinically detectable, primary tumors release soluble factors into the bloodstream that induce the formation of a tumor growth-favoring microenvironment (called “pre-metastatic niche”) in distant organs in order to attract tumor cells to these sites (Peinado *et al.*, 2017). Among these soluble factors, exosomes may play a prominent role. Exosomes are small vesicles (30–120 nm) containing DNA, RNA [messenger RNA (mRNA), microRNA (miRNA) and other noncoding RNAs], lipids and proteins that are secreted by all types of cells in culture, including tumor cells. Exosomes are also found in body fluids (blood, urine, saliva, and breast milk) (Vlassov *et al.*, 2012). In cancer, tumor-derived exosomes express distinct cell surface receptors (integrins) that are addressing them to specific organs (Hoshino *et al.*, 2015). Specifically, tumor-derived exosomal integrins $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 6\beta 1$ are associated with lung metastasis, while exosomal integrin $\alpha v\beta 5$ is linked to liver metastasis in animals (Hoshino *et al.*, 2015). These tumor-derived exosomes are up-taken by organ-specific cells (S100A4-positive fibroblasts and Kupffer cells in lungs and liver, respectively), which then produce promigratory and proinflammatory

molecules within pulmonary and hepatic tissues, thereby preparing the soil to facilitate the arrival of tumor cells at these sites (Hoshino *et al.*, 2015). We, and others, showed that tumor cell integrins ITGBL1, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 6$ are associated with breast or prostate cancer bone metastasis (Zhao *et al.*, 2007; Sottnik *et al.*, 2013; Dutta *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015), suggesting that they could address exosomes to bone. Integrin-independent exosomal mechanisms are also involved. In melanoma, the transfer of the MET oncoprotein from tumor-derived exosomes to bone marrow progenitor cells promotes the metastatic process in lungs and bone (Peinado *et al.*, 2012). Tumor-derived exosomal miRNAs can also reprogram or educate target cells that take up exosomes toward a pro-metastatic and proinflammatory phenotype, thereby creating a pre-metastatic niche (Peinado *et al.*, 2017). The main action of miRNAs is the negative regulation of gene expression by base-pairing to the 3'-UTR of target mRNAs, resulting in translational repression or mRNA degradation (Beer mann *et al.*, 2016). In cancer, miRNAs function either as tumor suppressors or as oncogenes, and their dysregulation contributes to metastasis in specific organs, including the skeleton (Beer mann *et al.*, 2016). With regards to bone metastasis, there are evidence that exosomal miR-141 and miR-940 produced by prostate cancer cells promote the osteogenic differentiation of mesenchymal cells in the bone marrow microenvironment, which then facilitates the formation of bone metastases with an osteoblastic phenotype (Hashimoto *et al.*, 2018; Ye *et al.*, 2017).

Another important class of molecules involved in the formation of the pre-metastatic niche is the lysyl oxidase (LOX) family whose primary function is to drive collagen crosslinking and extracellular matrix stiffness (Peinado *et al.*, 2017). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) induces the expression of LOX in breast tumors and secreted LOX catalyzes collagen crosslinking in the lungs, facilitating the recruitment of bone marrow-derived cells and the subsequent colonization of the pulmonary tissue by breast cancer cells (Erler *et al.*, 2009). In bone, we and others have shown that tumor-derived LOX from breast and colon cancer cells generates pre-metastatic osteolytic lesions in animals by impairing bone homeostasis through the stimulation of osteoclast formation induced by RANKL and the inhibition of osteoblast formation (Cox *et al.*, 2015; Reynaud *et al.*, 2017). Thus, by acting systemically, LOX contributes to the formation of a pre-metastatic niche in the bone marrow.

Factors Promoting the Homing of Tumor Cells to the Bone Marrow

Chemokines, which are small proteins (8–14 kDa) belonging to the cytokine family, play a crucial role in promoting the migration of tumor cells to the bone marrow and, more specifically, to the pre-metastatic niche (Weilbaecher *et al.*, 2011). They are produced by stromal cells, which are associated with the pre-metastatic niche, and released in the bloodstream. For instance, the chemokine C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL-12) is produced in large amounts in the bone marrow, lungs, and liver. Metastatic cells from breast or prostate cancers that express CXCR-4, the CXCL-12 receptor, migrate preferentially to these three organs due to the chemotactic properties of CXCL-12 (Weilbaecher *et al.*, 2011). Several other chemokines (CXCL-10, CXCL-13, CXCL-16, CX3CL-1, CCL22) are also produced by the bone microenvironment and have been implicated in the homing of tumor cells to bone (Weilbaecher *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012).

Construction of a Cancer Niche in the Bone Marrow

The fate of tumor cells after they enter the bone marrow remains the most elusive aspect of metastasis formation. Disseminated tumor cells (DTCs) in the bone marrow may be nonproliferative and remain dormant for several years, therefore never develop into overt bone metastases (Weilbaecher *et al.*, 2011). What enables DTCs in the bone marrow to remain dormant and how do they acquire the competence to form overt metastases? These questions come under intense scrutiny. Current hypotheses gaining ground are that DTCs must build a cancer niche by producing their own niche components to anchor and survive in the bone microenvironment, or bind to extracellular matrix components of the pre-metastatic niche that are produced by recruited stromal cells and/or occupy native bone marrow niches in which hematopoietic stem cells reside (Oskarsson *et al.*, 2014). By building this cancer niche, DTCs can enter dormancy and thus survive treatment with chemotherapeutics, which only target proliferating tumor cells.

Extracellular Matrix Niche and Tumor Survival

The extracellular matrix components tenascin C and periostin have been shown to play important roles in the construction of cancer niche in mouse models of cancer. Tenascin C is a hexameric protein produced by tumor cells that acts in an autocrine manner to support tumor cell survival. Periostin is a protein produced by stromal cells from the pre-metastatic niche that supports in a paracrine manner tumor cell survival. Tenascin C and periostin bind tightly to each other and to tumor cell surface integrins $\alpha 9\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$, respectively, which leads to the activation of Wnt- and Notch-dependent intracellular signaling pathways (Oskarsson *et al.*, 2014; San Martin *et al.*, 2017). Other extracellular matrix components, including SIBLINGs (osteopontin, bone sialoprotein, dentin matrix protein 1), osteonectin, connective tissue growth factor (CTGF, CCN2), and nephroblastoma over-expressed (Nov, CCN3), have also been associated with bone metastasis formation (Trotter and Yang, 2016). Osteopontin has been involved in early bone colonization through binding to tumor cell surface integrin $\alpha v\beta 3$ (Trotter and Yang, 2016). Other SIBLINGs, osteonectin, CTGF and Nov are involved at a late stage in the bone metastatic disease, promoting tumor cell invasion and growth (Trotter and Yang, 2016; Croucher *et al.*, 2016).

Bone Niches and Tumor Dormancy

Osteogenic and vascular niches are crucial regulators of hematopoietic stem cell (HSC) behavior in the bone marrow. During homeostasis, signals coming from the osteogenic niche keep HSCs dormant, which preserves their long-term self-renewal potential, whereas the vascular niche is oxygenated and stimulates proliferation and differentiation of HSCs to maintain hematopoiesis (Winkler *et al.*, 2012). A current hypothesis gaining ground is that common mechanisms are likely to be involved in maintaining HSC and DTC dormancy in the osteogenic niche. "Dormancy is a stage in cancer progression where the cells cease dividing but survive in a quiescent state while waiting for appropriate environmental conditions to begin proliferation again. Quiescence is the state where cells are not dividing but at arrest in the cell cycle in G0-G1" (https://en.wikipedia.org/wiki/Cancer_dormancy). Quiescent DTCs are therefore protected against chemotherapy-induced apoptosis.

The osteogenic niche is home to a particular spindle-shaped N-cadherin + osteoblast (SNO) cell population. SNO cells regulate dormancy of HSCs through interaction with N-cadherin. It has been shown that E-cadherin-expressing breast cancer cells home to SNO cells through interactions with N-cadherin (Sosa *et al.*, 2014; Kan *et al.*, 2016). Another molecule that regulates HSC dormancy is growth arrest-specific 6 (GAS6), which is an osteoblast-derived ligand of the MER, TYRO3 and AXL (also known as UFO) tyrosine kinase receptors. When prostate cancer cells bind to osteoblasts in the niche they increase their expression level of AXL and GAS6 signaling inhibits tumor cell proliferation (Sosa *et al.*, 2014; Kan *et al.*, 2016). Osteoblasts also express the chemokine CXCL-12, which mediates adhesive interactions with HSCs by binding to CXCR4, the receptor for CXCL-12. It has been observed that prostate cancer cells, which express CXCR4, can directly compete with HSCs for osteogenic niche support (Shiozawa *et al.*, 2011).

The vascular niche is composed of endothelial cells that express specific cell adhesion molecules (E- and P-selectins), E-selectin being a crucial component that mediates HSC attachment and proliferation (Winkler *et al.*, 2012). Using real-time in vivo microscopy of breast tumor xenografts, it has been shown that dormant tumor cells were preferentially located in E-selectin-rich vascular regions in which they were anchored through SDF-1/CXCR4 interactions (Price *et al.*, 2016). These results (Price *et al.*, 2016) are in contrast with previous findings showing that dormant prostate cancer cells, which express CXCR4, compete with HSCs for osteogenic niche support (Shiozawa *et al.*, 2011). Ghajar *et al.* (2013) also reported that the bone marrow microvasculature might constitute a dormant niche for breast cancer cells. Specifically, they showed that the endothelium-derived extracellular matrix protein thrombospondin-1 (TSP-1) induces sustained dormancy of breast cancer cells in vivo. Overall, these experimental data suggest the concept of niche support for DTCs is still in the early stages of investigation, and warrants further investigation.

Other factors produced by osteoblasts or bone marrow mesenchymal stem cells, including bone morphogenetic protein 7 (BMP-7), transforming growth factor- β 2 (TGF β -2), leukemia inhibitory factor (LIF), and exosomal miR-23b, can also induce tumor dormancy in different types of cancer (Ono *et al.*, 2014; Sosa *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2016).

Osteomimicry

During the time DTCs are in the bone marrow, they are able to adapt, exiting and re-entering a dormant state, and undergoing further selection to acquire a full complement of metastasis-colonization functions that they did not express before. In this context, tumor cells in the bone marrow express bone-associated genes (*RUNX2*, *CTSK*, *OPG*, *SPARC*, *CDH11*, *CX43*, *DKK1*), which are normally expressed by osteoblasts or osteoclasts (Bellahcène *et al.*, 2007; Le Gall *et al.*, 2007; Fradet *et al.*, 2011; Weilbaecher *et al.*, 2011). This process is called osteomimicry. For instance, the disruption of *RUNX2* activity in breast cancer cells abolishes their ability to form osteolytic lesions in vivo (Pratap *et al.*, 2011). Similarly, the incidence of prostate cancer bone metastasis is reduced greatly when cadherin-11 (CDH11) expression by tumor cells is silenced (Weilbaecher *et al.*, 2011). Moreover, paired immunohistochemistry on primary breast tumor samples and associated liver, lung or bone metastases showed that only bone metastatic cancer cells express bone proteins such as cathepsin K, osteonectin, cadherin-11, connexin-43 and *RUNX2*, demonstrating the clinical relevance of this process (Bellahcène *et al.*, 2007; Le Gall *et al.*, 2007; Fradet *et al.*, 2011).

Dormant Cell Reactivation

Two mitogen-activated kinases (MAPKs), namely p38 and extracellular signal-regulated kinase (ERK), control the switch of tumor cells between dormancy and active growth, respectively (Sosa *et al.*, 2014). Some of the molecular mechanisms that regulate this switch in the bone marrow have been identified. For example, mitogen- and stress-activated kinase 1 (MSK1), a downstream effector of the p38 and ERK1/2 signaling pathways, has been involved in the regulation of tumor dormancy in estrogen receptor (ER)-positive breast cancer cells that are metastatic to bone (Gawrzak *et al.*, 2018). Specifically, p38 depletion in tumor cells decreases MSK1 expression, and MSK1 depletion increases the capacity of poorly metastatic ER-positive breast cancer cells to form overt metastasis in animals (Gawrzak *et al.*, 2018). Thus, MSK1 is a dormancy enforcer and a negative regulator of metastasis initiation.

Bone might also provide an environment that enables dormant cell reactivation. Within a mouse bone metastasis model, indolent breast cancer micrometastases were found to overexpress adhesion protein vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1), which promotes the recruitment of osteoclast precursors by binding to osteoclast integrin α 4 β 1, leading to osteoclast formation and osteoclastic bone resorption (Sosa *et al.*, 2014). The mechanisms underlying VCAM-1 silencing and re-expression in these indolent bone marrow micrometastases are unknown. However, bone resorption likely creates an environment that promotes

tumor cell reactivation (Croucher *et al.*, 2016). In this respect, TGF β 1 and TGF β 2 exhibit competing functions on behavior of tumor cells in the bone marrow (Sosa *et al.*, 2014). TGF β 2 promotes tumor cell dormancy through Smad1/5 and p38 signaling, whereas TGF β 1 switches off dormancy, leading to rapid tumor growth in vivo (Sosa *et al.*, 2014). Thus, TGF β 1 released from resorbed bone could contribute to dormant cell reactivation (Weilbaecher *et al.*, 2011).

As exemplified with VCAM-1 and TGF β 1, there is a growing body of evidence suggesting that osteoclasts may be responsible for the reactivation of dormant DTCs (Weilbaecher *et al.*, 2011; Sosa *et al.*, 2014; Croucher *et al.*, 2016). It is well known that manipulating the bone microenvironment in mice by stimulating osteoclast activity through vitamin D deficiency, or through estrogen or androgen deprivation enhances skeletal tumor burden and bone destruction (Weilbaecher *et al.*, 2011; Croucher *et al.*, 2016). In this context, TGF β 1 that is released from resorbed bone not only switches off DTC dormancy, but also plays a central role in most of the events leading to tumor expansion in bone and bone destruction (Weilbaecher *et al.*, 2011). For instance, bone-derived TGF β 1 stimulates the expression of the Notch ligand Jagged-1 in bone metastatic tumor cells, which in turn promotes bone metastasis by activating the Notch pathway in supporting bone cells. Specifically, Jagged-Notch signaling directly promotes osteoclast differentiation and bone resorption, and it stimulates the release of IL-6 from osteoblasts to promote tumor cell proliferation (Sethi *et al.*, 2011). In addition, the therapeutic targeting of Jagged-1 with a monoclonal antibody inhibits bone metastasis formation in animals (Zheng *et al.*, 2017). Thus, osteoclastic bone resorption is likely to play an important role at an early stage in the establishment of bone metastasis.

Tumor-Derived Factors Mediating Osteolytic or Osteoblastic Bone Metastases

At a late stage in the progression of skeletal lesions, the patterns of bone metastases ranged from mostly destructive or osteolytic (in breast cancer, lung cancer, or myeloma), to mostly bone-forming or osteoblastic (in prostate cancer). There is however always an imbalance between bone formation and bone resorption. Bone metastasis is therefore a spectrum between these two extremes where, at one end, predominantly osteolytic lesions are associated with high osteoclast activity and reduced osteoblast activity and, at the other end, bone metastases that are predominantly osteoblastic have a high osteoblast activity and a reduced osteoclast activity (Weilbaecher *et al.*, 2011). Different molecular mechanisms associated with these different patterns of bone metastasis have been identified and are described below.

Osteolytic Lesions

Several factors secreted by tumor cells during the course of development of malignant osteolytic lesions stimulate osteoclast activity and bone resorption. Among them, parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) was the first to be recognized as involved in malignant osteolysis. PTHrP stimulates in osteoblasts the expression of the cytokine receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), which binds to its receptor RANK on osteoclast precursors, leading to the formation of new osteoclasts and therefore to osteoclastic bone resorption (Weilbaecher *et al.*, 2011). The transcription factor RUNX2 contributes to the ability of tumor cells to activate osteoclasts by upregulating Indian Hedgehog (IHH) expression, which in turn stimulates PTHrP-induced RANKL in osteoblasts and subsequently promotes RANK/RANKL-dependent activation of osteoclasts (Pratap *et al.*, 2011). Likewise, the transcription factor MAF mediates breast cancer bone metastasis through the control of PTHrP (Pavlovic *et al.*, 2015). Subsequent studies, described below, showed that TGF β released from resorbed bone induces PTHrP production from tumor cells that results in enhanced bone resorption (Weilbaecher *et al.*, 2011). Overall, these studies (Pratap *et al.*, 2011; Weilbaecher *et al.*, 2011; Pavlovic *et al.*, 2015) demonstrate the importance of PTHrP in the pathogenesis of osteolytic lesions. Several other molecules produced by tumor cells, including interleukins (IL-6, IL-8, and IL-11) and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), stimulate osteoclast activity through the activation of the RANK/RANKL pathway (Weilbaecher *et al.*, 2011). Platelet-derived lysophosphatidic acid (LPA) also supports progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. We showed that LPA, by binding to its receptor LPA1 at the tumor cell surface, promotes tumor cell proliferation and the LPA1-dependent secretion of IL-6 and IL-8, which in turn promotes osteoclast-mediated bone resorption (Boucharaba *et al.*, 2004). Moreover, the functional blockade of LPA action on its receptor, using a LPA1 antagonist, substantially reduces progression of osteolytic bone metastases in animals (Boucharaba *et al.*, 2006).

Tumor cells not only stimulate osteoclast activity, but also inhibit osteoblast activity, thereby worsening the imbalance between bone formation and bone resorption, and promoting bone destruction (Weilbaecher *et al.*, 2011). Specifically, tumor cells secrete activin A (a member of the TGF- β superfamily of growth factors), noggin (a BMP antagonist), and dickkopf-1 (DKK-1) and sclerostin (SOST-1) [two Wnt protein antagonists], all of them suppressing osteoblast differentiation (Weilbaecher *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2017). For instance, MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells express SOST-1 and an anti-SOST antibody reduces tumor cell migration and invasion in vitro, and prevents formation of osteolytic lesions in animals (Zhu *et al.*, 2017).

Osteoblastic Lesions

One of the most well studied mediators is endothelin-1 (ET-1), which stimulates osteoblast proliferation and inhibits osteoclast activity and motility. Among patients with prostate cancer, those with bone metastases have far higher circulating levels of ET-1,

compared to those with localized cancer (Weilbaecher *et al.*, 2011). Gene expression analysis in mouse primary osteoblasts revealed that treatment with ET1 upregulates multiple osteoblast-stimulatory factors (e.g., IL-6 and RANKL) and downregulates DKK-1 (Rosano *et al.*, 2013). Stimulatory effects of ET-1 on osteoblasts are mediated by two receptors, ETAR and ETBR, which activate similar signaling pathways. Osteoblast proliferation and bone metastasis are both inhibited by ETAR antagonists atrasentan and zibotentan, as well as by the dual ETAR and ETBR antagonist bosentan, highlighting the prominent role played by ET-1 in the formation of osteoblastic lesions (Rosano *et al.*, 2013). Other osteoblast-stimulatory factors (VEGF, BMP-6) have also been shown to participate to the formation of osteoblastic lesions (Dai *et al.*, 2005; Kitagawa *et al.*, 2005). Osteoblasts express VEGF membrane receptors Flt1 and KDR and the treatment of animals with the Flt1 receptor inhibitor PTK787 blocks the formation of prostate cancer osteoblastic lesions in animals (Kitagawa *et al.*, 2005). Likewise, the treatment of animals with an antibody to BMP-6 decreases the formation of osteoblastic bone metastases induced by prostate cancer cells (Dai *et al.*, 2005). The osteoblast-stimulatory factors BMP-2, adrenomedullin, Wnt, and fibroblast growth factor 9 (FGF9) have been also involved in the formation of osteoblastic lesions (Logothetis and Lin, 2005). In addition, prostate-specific antigen (PSA), as a serine protease that cleaves PTHrP in the PTH-like domain, could also indirectly contribute to the formation of osteoblastic lesions by neutralizing osteoclast-stimulatory effect of PTHrP (Cramer *et al.*, 1996).

Osteoprotegerin (OPG) is a soluble RANKL inhibitor produced by osteoblasts that inhibits RANKL/RANK interaction. OPG levels are increased in patients with prostate cancer bone metastases. In addition, OPG can be expressed in breast and prostate cancer cells. OPG expressed by prostate cancer cells inhibits bone resorption, thereby contributing to the osteoblastic trait of most prostate cancer bone lesions (Corey *et al.*, 2005). In addition, OPG can promote tumor cell survival by binding to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (Croucher *et al.*, 2016).

Contribution of Bone to Metastasis Progression

Bone tissue is an abundant reservoir for growth factors, including TGF β , insulin-like growth factors (IGFs) and platelet-derived growth factors (PDGFs) (Weilbaecher *et al.*, 2011). When released from the resorbed bone matrix, TGF β acts on tumor cells, via SMAD- and COX2-dependent signaling pathways, which stimulates the expression of factors such as PTHrP, Jagged-1, IL-11, and prostaglandin E2 (Weilbaecher *et al.*, 2011; Sethi *et al.*, 2011; Croucher *et al.*, 2016). Bone-derived IGFs and PDGFs stimulate tumor growth (Weilbaecher *et al.*, 2011). Calcium is another factor released from bone during osteoclastic resorption. Calcium binds on tumor cells (breast, prostate) via a calcium-sensing receptor (CaSR) and promotes tumor cell proliferation and migration and secretion of PTHrP and epiregulin (Weilbaecher *et al.*, 2011; Boudot *et al.*, 2017). Epiregulin is an EGF-like ligand whose expression is increased in osteolytic lesions in vivo. It decreases OPG expression in osteoblasts, thereby contributing to the progression of osteolytic lesions (Boudot *et al.*, 2017).

Summary and Conclusion

In this review, we described early events that allow tumor cells to disseminate and colonize in the bone marrow and we highlighted the prominence of pre-metastatic and metastatic niches in mediating homing and dormancy of tumor cells, respectively. We also discussed the importance of the osteoclast activity for reactivation of dormant tumor cells. Finally, we explained how, at a later stage, tumor cells induce osteolytic or osteoblastic lesions. To date, no effective treatments for bone metastasis exist, only therapies that aim to limit the bone degradation such as denosumab (anti-RANKL monoclonal antibody) and bisphosphonates. The future challenge will lie in our ability to develop therapeutics targeting dormancy in order to address residual disease in patients.

References

- Beermann, J., Piccoli, M.T., Viereck, J., Thum, T., 2016. Non-coding RNAs in development and disease: Background, mechanisms, and therapeutic approaches. *Physiological Reviews* 96, 1297–1325.
- Bellahcène, A., Bachelier, R., Detry, C., *et al.*, 2007. Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 101, 135–148.
- Boucharaba, A., Serre, C.M., Grès, S., *et al.*, 2004. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation* 114, 1714–1725.
- Boucharaba, A., Serre, C.M., Guglielmi, J., *et al.*, 2006. The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9643–9648.
- Boudot, C., Hénaut, L., Thiem, U., *et al.*, 2017. Overexpression of a functional calcium-sensing receptor dramatically increases osteolytic potential of MDA-MB-231 cells in a mouse model of bone metastasis through epiregulin-mediated osteoprotegerin downregulation. *Oncotarget* 8, 56460–56472.
- Corey, E., Brown, L.G., Kiefer, J.A., *et al.*, 2005. Osteoprotegerin in prostate cancer bone metastasis. *Cancer Research* 65, 1710–1718.
- Cox, T.R., Rumney, R.M., Schoof, E.M., *et al.*, 2015. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature* 522, 106–110.
- Cramer, S.D., Chen, Z., Peehl, D.M., 1996. Prostate specific antigen cleaves parathyroid hormone-related protein in the PTH-like domain: Inactivation of PTHrP-stimulated cAMP accumulation in mouse osteoblasts. *Journal of Urology* 156, 526–531.
- Croucher, P.I., McDonald, M.M., Martin, T.J., 2016. Bone metastasis: The importance of the neighbourhood. *Nature Reviews Cancer* 16, 373–386.

- Dai, J., Keller, J., Zhang, J., *et al.*, 2005. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Research* 65, 8274–8285.
- Dutta, A., Li, J., Lu, H., *et al.*, 2014. Integrin $\alpha v \beta 6$ promotes an osteolytic program in cancer cells by upregulating MMP2. *Cancer Research* 74, 1598–1608.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Cox, T.R., *et al.*, 2009. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* 15, 35–44.
- Fradet, A., Sorel, H., Bouazza, L., *et al.*, 2011. Dual function of ERR α in breast cancer and bone metastasis formation: Implication of VEGF and osteoprotegerin. *Cancer Research* 71, 5728–5738.
- Gawrzak, S., Rinaldi, L., Gregorio, S., *et al.*, 2018. MSK1 regulates luminal cell differentiation and metastatic dormancy in ER $_{+}$ breast cancer. *Nature Cell Biology* 20, 211–221.
- Ghajar, C.M., Peinado, H., Mori, H., *et al.*, 2013. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nature Cell Biology* 15, 807–817.
- Hashimoto, K., Ochi, H., Sunamura, S., *et al.*, 2018. Cancer-secreted hsa-miR-940 induces an osteoblastic phenotype in the bone metastatic microenvironment via targeting ARHGAP1 and FAM134A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas (in press).
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., *et al.*, 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329–335.
- Johnson, R.W., Finger, E.C., Olcina, M.M., *et al.*, 2016. Induction of LIFR confers a dormancy phenotype in breast cancer cells disseminated to the bone marrow. *Nature Cell Biology* 18, 1078–1089.
- Kan, C., Vargas, G., Pape, F.L., Clézardin, P., 2016. Cancer cell colonisation in the bone microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* 17, E1674.
- Kitagawa, Y., Dai, J., Zhang, J., *et al.*, 2005. Vascular endothelial growth factor contributes to prostate cancer-mediated osteoblastic activity. *Cancer Research* 65, 10921–10929.
- Le Gall, C., Bellahcène, A., Bonnellye, E., *et al.*, 2007. A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Research* 67, 9894–9902.
- Lee, J.H., Kim, H.N., Kim, K.O., *et al.*, 2012. CXCL10 promotes osteolytic bone metastasis by enhancing cancer outgrowth and osteoclastogenesis. *Cancer Research* 72, 3175–3186.
- Li, X.Q., Du, X., Li, D.M., *et al.*, 2015. ITGBL1 Is a Runx2 Transcriptional Target and Promotes Breast Cancer Bone Metastasis by Activating the TGF β Signaling Pathway. *Cancer Research* 75, 3302–3313.
- Logothetis, C.J., Lin, S.H., 2005. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nature Reviews Cancer* 5, 21–28.
- Ono, M., Kosaka, N., Tominaga, N., *et al.*, 2014. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Science Signaling* 7, ra63.
- Oskarsson, T., Batlle, E., Massagué, J., 2014. Metastatic stem cells: Sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell* 14, 306–321.
- Pavlovic, M., Arnal-Estapé, A., Rojo, F., *et al.*, 2015. Enhanced MAF oncogene expression and breast cancer bone metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* 107, djv256.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., *et al.*, 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine* 18, 883–891.
- Peinado, H., Zhang, H., Matei, I.R., *et al.*, 2017. Pre-metastatic niches: Organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews Cancer* 17, 302–317.
- Pratap, J., Lian, J.B., Stein, G.S., 2011. Metastatic bone disease: Role of transcription factors and future targets. *Bone* 48, 30–36.
- Price, T.T., Burness, M.L., Sivan, A., *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
- Reynaud, C., Ferreras, L., Di Mauro, P., *et al.*, 2017. Lysyl oxidase is a strong determinant of tumor cell colonization in bone. *Cancer Research* 77, 268–278.
- Rosano, L., Spinella, F., Bagnato, A., 2013. Endothelin 1 in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer* 13, 637–651.
- San Martín, R., Pathak, R., Jain, A., *et al.*, 2017. Tenascin-C and Integrin $\alpha 9$ mediate interactions of prostate cancer with the bonemicroenvironment. *Cancer Research* 77, 5977–5988.
- Sethi, N., Dai, X., Winter, C.G., *et al.*, 2011. Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell* 19, 192–205.
- Shiozawa, Y., Pedersen, E.A., Havens, A.M., *et al.*, 2011. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *Journal of Clinical Investigation* 121, 1298–1312.
- Sosa, M.S., Bragado, P., Aguirre-Ghiso, J.A., 2014. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: An awakening field. *Nature Reviews Cancer* 14, 611–622.
- Sottnik, J.L., Daignault-Newton, S., Zhang, X., *et al.*, 2013. Integrin $\alpha 2 \beta 1$ promotes prostate cancer skeletal metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis* 30, 569–578.
- Trotter, T.N., Yang, Y., 2016. Matricellular proteins as regulators of cancer metastasis to bone. *Matrix Biology* 52–54, 301–314.
- Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., Conrad, R., 2012. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820, 940–948.
- Weilbaecher, K.N., Guise, T.A., McCauley, L.K., 2011. Cancer to bone: A fatal attraction. *Nature Reviews Cancer* 11, 11–25.
- Winkler, I.G., Barbier, V., Nowlan, B., *et al.*, 2012. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nature Medicine* 18, 1651–1657.
- Ye, Y., Li, S.L., Ma, Y.Y., *et al.*, 2017. Exosomal miR-141-3p regulates osteoblast activity to promote the osteoblastic metastasis of prostate cancer. *Oncotarget* 8, 94834–94849.
- Zhao, Y., Bachelier, R., Treilleux, I., *et al.*, 2007. Tumor $\alpha v \beta 3$ integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. *Cancer Research* 67, 5821–5830.
- Zheng, H., Bae, Y., Kasimir-Bauer, S., *et al.*, 2017. Therapeutic antibody targeting tumor- and osteoblastic niche-derived Jagged1 sensitizes bone metastasis to chemotherapy. *Cancer Cell* 32, 731–747.
- Zhu, M., Liu, C., Li, S., *et al.*, 2017. Sclerostin induced tumor growth, bone metastasis and osteolysis in breast cancer. *Scientific Reports* 7.11399

Lysyl Oxidase Is a Strong Determinant of Tumor Cell Colonization in Bone

Caroline Reynaud^{1,2}, Laura Ferreras^{1,2}, Paola Di Mauro^{1,2}, Casina Kan^{1,2}, Martine Croset^{1,2}, Edith Bonnelye^{1,2}, Floriane Pez³, Clémence Thomas⁴, Géraldine Aimond³, Antoine E. Karnoub⁴, Marie Brevet^{1,5}, and Philippe Clézardin^{1,2}

Abstract

Lysyl oxidase (LOX) is a secreted copper-dependent amine oxidase whose primary function is to drive collagen crosslinking and extracellular matrix stiffness. LOX in colorectal cancer synergizes with hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) to promote tumor progression. Here we investigated whether LOX/HIF1 endows colorectal cancer cells with full competence for aggressive colonization in bone. We show that a high LOX expression in primary tumors from patients with colorectal cancer was associated with poor clinical outcome, irrespective of HIF-1. In addition, LOX was expressed by tumor cells in the bone marrow from colorectal cancer patients with bone metastases. *In vivo* experimental studies show that LOX overexpression in colorectal cancer cells or systemic delivery of the conditioned medium from LOX-overexpressing colorectal cancer cells promoted tumor cell dissemination in the bone marrow and enhanced osteolytic lesion formation,

irrespective of HIF-1. Conversely, silencing or pharmacologic inhibition of LOX activity blocked dissemination of colorectal cancer cells in the bone marrow and tumor-driven osteolytic lesion formation. *In vitro*, tumor-secreted LOX supported the attachment and survival of colorectal cancer cells to and in the bone matrix, and inhibited osteoblast differentiation. LOX overexpression in colorectal cancer cells also induced a robust production of IL6. In turn, both LOX and IL6 were acting in concert to promote RANKL-dependent osteoclast differentiation, thereby creating an imbalance between bone resorption and bone formation. Collectively, our findings show that LOX supports colorectal cancer cell dissemination in the bone marrow and they reveal a novel mechanism through which LOX-driven IL6 production by colorectal cancer cells impairs bone homeostasis. *Cancer Res*; 77(2); 268–78. ©2016 AACR.

Introduction

The lysyl oxidase (LOX) family of secreted copper-dependent amine oxidases consists of five paralogs: LOX and LOX-like 1–4 (LOXL1–4). The primary function of the LOX family is to catalyze the covalent crosslinking of collagen and elastin in the extracellular matrix, thereby increasing insoluble matrix deposition and tensile strength (1). Increased expression of LOX and LOXL2 has been consistently reported in various cancer types (colorectal, breast, prostate, lung, bladder; refs. 1–5). LOX and LOXL2 are closely associated with desmoplastic areas at the invasive front of infiltrating tumors (1). They mediate collagen/elastin crosslinking that increases extracellular matrix stiffness, a process that is associated with enhanced integrin-mediated mechanotransduction coupled to increased tumor cell invasion in breast and

colorectal cancers (1, 3, 6). LOX- and LOXL2-mediated collagen crosslinking are also responsible for enhancing outgrowth in metastatic xenograft models of breast cancer (5, 7). In addition, LOX enhances the metastatic trait of breast tumor xenografts in animals by stimulating *TWIST1* transcription in tumor cells (8). In the same vein, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) induces the expression of several members of the LOX family in breast cancer cells, including LOX and LOXL2, which then catalyzes collagen crosslinking in the lungs, facilitating the recruitment of bone marrow-derived cells and the subsequent colonization of the pulmonary tissue by tumor cells (5, 9–11). Furthermore, we have shown that LOX synergizes with HIF-1 in promoting *in vivo* growth of colorectal tumors (2). These experimental results (2, 3, 5–11) probably explain why increased expression of LOX and LOXL2 in primary tumors (colorectal, breast, lung, prostate) is associated with distant relapse and poor survival (1). Indeed, targeting of LOX and LOXL2 with the LOX inhibitor β -aminopropionitrile (β APN) or function-blocking antibodies (AB0023, GS341), respectively, is efficacious at reducing metastatic tumor burden in xenograft models of cancer (7, 12, 13). Thus, there is a body of experimental evidence indicating that LOX and LOXL2 facilitate the development of metastases in distant organs, such as the lungs, liver, and brain. Surprisingly, little is known regarding the role of LOX proteins during bone metastasis formation.

In bone metastasis, metastatic cancer cells residing in the bone marrow alter the functions of bone-resorbing (osteoclasts) and bone-forming (osteoblasts) cells and hijack signals coming from the bone matrix (14). By disrupting the physiologic balance between bone resorption and bone formation, metastatic cells

¹INSERM, UMR1033, Lyon, France. ²University of Lyon, Villeurbanne, France. ³CNRS, UMR5305, IBCP, Lyon, France. ⁴Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts. ⁵Department of Pathology, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Authors: Philippe Clézardin, INSERM, UMR1033, Faculté de Médecine Lyon-Est (domaine Laennec), Rue Guillaume Paradin, Lyon 69372, France. Phone: 334-7878-5738; Fax: 334-7877-8772; E-mail: philippe.clezardin@inserm.fr; and Caroline Reynaud, caroline.reynaud@inserm.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2621

©2016 American Association for Cancer Research.

therefore promote skeletal destruction. The detection rate of disseminated tumor cells (DTC) in the bone marrow from patients with colorectal cancer receiving curatively intended surgery is 27% and their presence is associated with a poor clinical outcome (15, 16). This detection rate is relatively high and comparable with what is observed in bone-tropic cancers such as breast cancer (about 30%; ref. 15), which is in intriguing contrast to the low incidence of overt bone metastases in colorectal cancer (17). A current hypothesis gaining ground is that DTCs may be representative of dormant tumor cells with the ability to escape dormancy upon receiving appropriate stimuli from the microenvironment (18). Given the role of LOX in driving collagen crosslinking and extracellular matrix stiffness (1), we hypothesized that LOX in colorectal cancer may be one of the factors that endow DTCs with full competence for aggressive colonization in bone. Interestingly, it has been very recently shown during the course of this study that hypoxia-induced LOX in breast cancer cells generates premetastatic osteolytic lesions in animals through the stimulation of NFATc1, a master regulator of osteoclastogenesis (19). Here, we investigated the role of LOX and its regulator HIF-1 α in colorectal cancer bone metastases.

Materials and Methods

Reagents, human colorectal cancer cell lines, and animals

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, unless otherwise specified. Primer pairs used for quantitative real-time PCR analysis are listed in Supplementary Table S1. Human colorectal cancer cell lines were obtained from the ATCC [Hct116 and HT29 (in 2007); LS174Tr (in 2009)]. They were tested for authentication by DNA fingerprinting using short tandem repeat (STR) method in 2010. The mutation in the *ras* proto-oncogene was tested in 2014. Hct116 cells were maintained in RPMI1640-Glutamax (Invitrogen) with 10% (v/v) FCS (Life Technologies), 10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L sodium pyruvate, and 0.1 mmol/L nonessential amino acids (Invitrogen) at 37°C. HT29 and LS174Tr cells were grown in DMEM-Glutamax (Invitrogen), 10% (v/v) FCS, and 50 μ g/mL gentamycin. These cells were first transduced with lentiviral shRNA particles targeting *LOX* (shLOX) or a control sequence (shCTL) then cotransduced with particles containing an empty vector (EV) or a *LOX*-expressing vector (*LOX*⁺) under the control of a doxycycline-inducible promoter, as described previously (2). Transduced cell lines initially called shCTL/EV, shLOX/EV (cells silenced for endogenous *LOX*) and shCTL/*LOX*⁺ (cells overexpressing *LOX* in an inducible manner; ref. 2) were named, respectively, Ctrl, *LOX*⁻, and *LOX*⁺ for brevity. In addition, Ctrl and *LOX*⁺ Hct116 cells were cotransduced with lentiviral shRNA particles targeting *HIF-1 α* (Ctrl/*HIF1 α* ⁻ and *LOX*⁺/*HIF1 α* ⁻, respectively), as described previously (2).

Four-week-old female Balb/c immunocompromised mice were purchased from Janvier. Animals were maintained in a 12-hour light-dark cycle and given free access to food and water. All procedures involving animals, including their housing and care, the method by which they were culled, and experimental protocols were conducted in accordance with a code of practice established by the local ethical committee of the University of Lyon (Lyon, France).

Immunohistochemistry

Colorectal cancer tissue specimens (primary tumors and bone metastases) were obtained from the Department of Pathology,

Hospices Civils de Lyon (Lyon, France). Tumor sections (5 μ m) were deparaffinized, treated with pepsin for 15 minutes at 37°C (Zymed, Invitrogen), and processed for immunohistochemical staining using a LOX antibody (1:250 dilution; ab31238 Abcam).

LOX activity measurement

LOX activity was measured using a fluorescent assay, according to the manufacturer's instructions (ab112139, Abcam).

ELISA

Conditioned media from *LOX*⁻ and *LOX*⁺ #Hct116 were collected, and IL6 was measured by ELISA, according to the manufacturer's instructions (CliniSciences).

Protein extraction and Western blotting

Proteins were extracted in RIPA buffer, electrophoresed on a SDS-polyacrylamide gel (Life Technologies), then transferred onto nitrocellulose membranes (Millipore) and proteins were probed with a primary antibody against STAT3 (HP1001671, 1:300 dilution, Sigma), STAT3^{Y705} (9145, 1:1,000 dilution, Cell Signaling Technology), Src (2123, 1:1,000 dilution, Cell Signaling Technology), Src^{Y416} (6943, 1:1,000 dilution, Cell Signaling Technology), FAK (05-537, 1:1,000 dilution, Upstate Biotechnology), FAK^{Y025} (3284, 1:1,000 dilution, Cell Signaling Technology), Akt (9272, 1:1,000 dilution, Cell Signaling Technology), Akt^{T308} (4056, 1:1,000 dilution, Cell Signaling Technology), tubulin (T5168, 1:2,000 dilution, Sigma), or GAPDH (ab9485, 1:2,500 dilution, Abcam). After incubation with primary antibodies, membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary goat anti-mouse (1:2,000 dilution, Bio-Rad) or goat anti-rabbit (1:2,500 dilution, Bio-Rad) antibody. Immunostaining was performed with enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Perkin Elmer).

Functional cell-based assays

Ctrl, *LOX*⁻, and *LOX*⁺ Hct116 cells (4×10^6 /mL), treated or not treated with 350 μ mol/L β APN or 100 μ g/mL tocilizumab (Roac-temra, Roche), were cultured for 48 hours in complete RPMI medium without phenol red. Conditioned media were then collected, centrifuged, and stored as aliquots at -80°C until used. LOX production was analyzed by Western blotting, as described previously (2).

For cell adhesion assays, experiments were conducted as described previously (20). Briefly, 96-well tissue culture plates were coated with increasing concentrations of type-I collagen or fibronectin (0.01 mg/cm² to 100 mg/cm²) and incubated overnight at 4°C. Cells (4×10^4 cells/0.1 mL/well) were starved for 16 hours then plated to extracellular matrix proteins for 60 minutes at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After washing, adherent cells were fixed and stained with 0.1% (w/v) crystal violet. The dye was eluted with 2% (w/v) SDS and the optical density quantified at 595 nm. Alternatively, 96-well tissue culture plates were coated with rat tail type-I collagen (15 μ g/cm²) overnight at 4°C. After incubation with 1% BSA for 30 minutes, cells (1×10^5 cells/0.1 mL/well) were incubated for 1 hour at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After washing, adherent cells were fixed and stained with hematoxylin and fuschin.

For tumor spheroid formation assays, 1×10^4 /0.3 mL Hct116 cells (Ctrl, *LOX*⁻, and *LOX*⁺) were seeded in CytoCapture Chambers, big hexagonal cavities (diameter 250 μ m; PAA). Cells were grown in suspension in 0.3 mL of MammoCult basal

medium containing 10% (v/v) MammoCult proliferation supplement (StemCell Technologies), 0.0004% (w/v) heparin (StemCell Technologies), 1 µg/mL hydrocortisone, 1 mmol/L glutamine, 50 U/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin (Life Technologies), with or without 350 µmol/L βAPN. After 5 days in culture, tumor spheroids were imaged under a microscope (Confocal-Leica SP5 X) and quantified using Fiji software. Spheroids of at least 60 µm in diameter were counted.

Osteoclastogenesis assay

Experiments were conducted as described previously (21). Briefly, bone marrow cells from 6-week-old OF1 mice were cultured for 7 days in α-MEM medium (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) FCS, 20 ng/mL M-CSF (R&D Systems), and 200 ng/mL RANKL, alone or in combination (from day 1 to day 7) with the conditioned media from transduced Hct116 cells (Ctrl, LOX⁺, and LOX⁻; 25 µg/mL) or with recombinant LOX (150 ng/mL). After 7 days in culture, mature osteoclasts were enumerated under a microscope on the basis of the number of nuclei (more than three nuclei) and TRAP activity.

NFATc1 staining

Cultured osteoclasts on coverslips were fixed for 15 minutes in 4% PFA then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes. Saturation was performed with 5% normal goat serum in 0.1% PBS-Tween20 (NGS) for 2 hours. mAb to NFATc1 (SC-7294, Santa Cruz Biotechnology), diluted 1:100 in NGS, was incubated for 1 hour at room temperature and, after washing, coverslips were further incubated for another 1 hour with a secondary goat anti-mouse antibody coupled to Alexa Fluor 488 (1:300 dilution in PBS). Coverslips were then mounted in FluorSave Reagent (Calbiochem).

Osteoblastogenesis assay

Experiments were conducted as described previously (22). Briefly, calvaria of 3-day-old OF-1 mice were dissected and then cells were enzymatically isolated by sequential digestion with collagenase and plated into 24-well plates. After 24-hour incubation, α-MEM medium containing 10% (v/v) FCS was changed and supplemented with 50 µg/mL ascorbic acid with or without conditioned medium from transduced Hct116 cells (Ctrl, LOX⁺, and LOX⁻). Medium was changed every other day for 21 days. Sodium β-glycerophosphate (10 mmol/L) was added for the last week of the experiments. At day 21, bone-mineralized nodules were fixed and stained with von Kossa staining.

Animal studies

Colorectal cancer cell lines (5×10^5 cells in 100-µL PBS) were inoculated intra-arterially into anesthetized female Balb/c *nude* mice. When specified, 300 µL of conditioned medium from transduced Hct116 cells was intraperitoneally (i.p.) injected daily into mice. For LOX inhibition, animals were treated with 0.2% (w/v) βAPN, supplied in the drinking water. For blockade of IL6 receptor, animals were treated every other day with tocilizumab (50 mg/kg, i.p.). The progression of skeletal tumor burden was monitored by whole-body bioluminescence imaging (NightOwl, Berthold Technologies), following subcutaneous administration of luciferin (100 mg/kg in PBS; Promega) 10 minutes prior to imaging. The progression of osteolytic lesions in the skeleton of anesthetized animals was monitored by radiography, using a

cabinet X-ray system (MX-20; Faxitron X-ray Corporation). The area of osteolytic lesions was measured using Explora-Nova Morpho Expert software. Animals were sacrificed on day 7 or 35 after tumor cell inoculation, and hind limbs were collected for histology and histomorphometric analyses.

Bone histology and histomorphometry

Bone histology and histomorphometric analysis of bone tissue sections were performed on decalcified, 5-µm bone-tissue sections stained with Goldner Trichrome, as described previously (21). For histomorphometric measurements, the bone volume (BV)/tissue volume (TV) and tumor volume (TuV)/soft tissue volume (STV) ratios represent the percentages of bone and tumor tissue, respectively. In addition, osteoclasts within bone tissue sections were stained using a TRAP activity kit assay. The resorption surface (Oc.S/BS) was calculated as the ratio of TRAP-positive trabecular bone surface (Oc.S) to the total bone surface (BS) using the image analysis system MorphoExpert (Explora-Nova).

Ex vivo micrometastasis experiments

Ex vivo micrometastasis experiments were conducted as described previously (21). Animals were culled on day 7 or day 35 after tumor cell inoculation. Hind limbs were collected and tibiae and femurs were minced and then soaked in an enzyme cocktail containing 300 U/mL type-I collagenase and 100 U/mL hyaluronidase (StemCell Technologies) in DMEM for 2 hours at 37°C. After incubation, bone marrow cell suspensions were seeded in 6-well plates and cultured in complete medium. After 1 day, cultured cells were placed under puromycin selection for 2 weeks, enabling the selective outgrowth of antibiotic-resistant tumor cells. Tumor cell colonies were then fixed, stained with 0.5% (v/v) crystal violet, and counted.

Clinical correlation analyses

Gene expression data and clinical annotations were downloaded from The Cancer Genome Atlas for colorectal cancer and previously published datasets downloaded from the Gene Expression Omnibus (GSE16125, GSE33113, GSE41258, GSE17536, GSE31595, GSE12945; see Supplementary Table S2).

Statistical analysis

All experimental data are presented as mean ± SD. Statistical comparisons of values were made using the Mann-Whitney *U* test. Disease-free survival Kaplan-Meier analyses were performed using the log-rank (Mantel-Cox) test. Correlation analyses were performed by the Spearman Rank test and the Pearson correlation. All tests were two-sided, and *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

LOX expression in colorectal cancer is clinically associated with poor prognosis

As a first step toward evaluating the role of LOX and its regulator HIF-1α in colorectal cancer bone metastases, we conducted a meta-analysis in a cohort of patients with colorectal cancer (*n* = 552) and found that high *LOX* expression in primary tumors was associated with poor overall survival (*P* = 0.0109) and poor relapse-free survival (*P* = 0.02; Supplementary Fig. S1A and S1B).

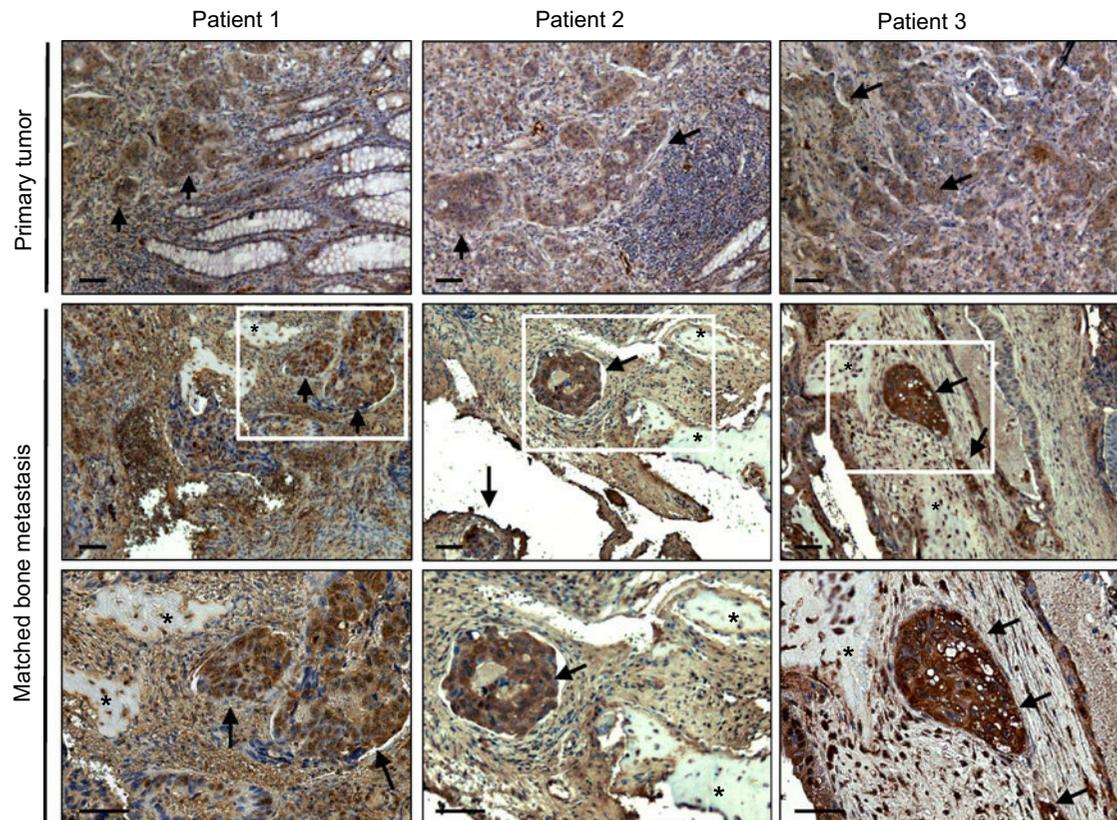


Figure 1.

LOX expression in pairs of human primary colorectal carcinoma and their matching bone metastasis. IHC was performed using three pairs of patients' tumor specimens. A strong immunostaining for LOX was observed in neoplastic cells (arrows) and, to a less extent, in the desmoplastic tumor stroma. In bone (*), LOX was observed in osteocytic lacunae. Scale bar, 1 mm.

In addition, high *LOX* expression was a negative determinant of relapse-free survival, irrespective of *HIF-1 α* levels (Supplementary Fig. S1C). Using IHC with an anti-*LOX* antibody, we examined 5 patients with colorectal cancer with bone metastases, including 3 patients for whom we had pairs of primary tumors and their matching bone metastases. Although all of the matching primary and metastatic tumors expressed *LOX*, there was a preferential moderate-to-strong staining for *LOX* associated with the carcinoma cells in bone metastases for all 5 patients (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1D).

Tumor-secreted *LOX* in colorectal cancer generates osteolytic lesions in animals

We next investigated the role for *LOX* and *HIF-1 α* in colorectal cancer bone metastasis formation, using human Hct116 cells (Ctrl) previously transduced for *HIF-1 α* silencing (Ctrl/*HIF1 α* ⁻) and/or *LOX* overexpression (*LOX*⁺; *LOX*⁺/*HIF1 α* ⁻; ref. 2). Compared with Ctrl and Ctrl/*HIF1 α* ⁻ tumor-bearing animals, bioluminescent *LOX*⁺ Hct116 cells were readily detected in the hind limbs of animals at day 31 postinjection, irrespective of *HIF-1 α* expression (Fig. 2A). In addition, there was a similar effect on osteolytic lesions in *LOX*⁺ and *LOX*⁺/*HIF1 α* ⁻ tumor-bearing animals and the extent of lytic lesions was 2.5-fold higher than that of animals bearing Ctrl- or Ctrl/*HIF1 α* ⁻ tumors (Fig. 2B). Hence, these data indicated that tumor-secreted *LOX* promotes

osteolytic lesion formation *in vivo*, irrespective of *HIF-1 α* expression.

To further address the role of *LOX* in osteolytic lesion formation, we used two additional previously published human colorectal cancer cell lines (HT29 and LS174Tr), in which *LOX* expression has been overexpressed or silenced (2). The modulation of *LOX* expression did not affect the expression of other members of the *LOX*-like family (Supplementary Table S3). We observed that *LOX*-overexpressing Hct116, HT29, and LS174Tr cells caused osteolytic lesions in animals at day 35 postinjection (Fig. 2C). The extent of osteolytic lesions in *LOX*⁺ tumor-bearing animals was 3- to 5-fold higher than that of animals bearing Ctrl or *LOX*⁻ tumors (Fig. 2C). In addition, the treatment of *LOX*⁺ Hct116 tumor-bearing animals with the *LOX* inhibitor β APN for 35 days, prolonged bone metastasis-free survival to a level similar to that observed with animals bearing *LOX*⁻ or Ctrl-Hct116 tumors (Supplementary Fig. S2). Histomorphometric analysis of hind limbs with metastases from animals bearing Hct116 tumors showed that the BV/TV ratio (a measure of the bone volume) was decreased in *LOX*⁺ tumor-bearing animals, compared with *LOX*⁻ and Ctrl tumor-bearing animals (Fig. 2D; Table 1). This difference was accompanied with a substantial increase in the TRAP staining of bone tissue sections of metastatic legs from *LOX*⁺ tumor-bearing animals (indicating a stimulation of active-osteoclast resorption surfaces; Fig. 2D; Table 1). In

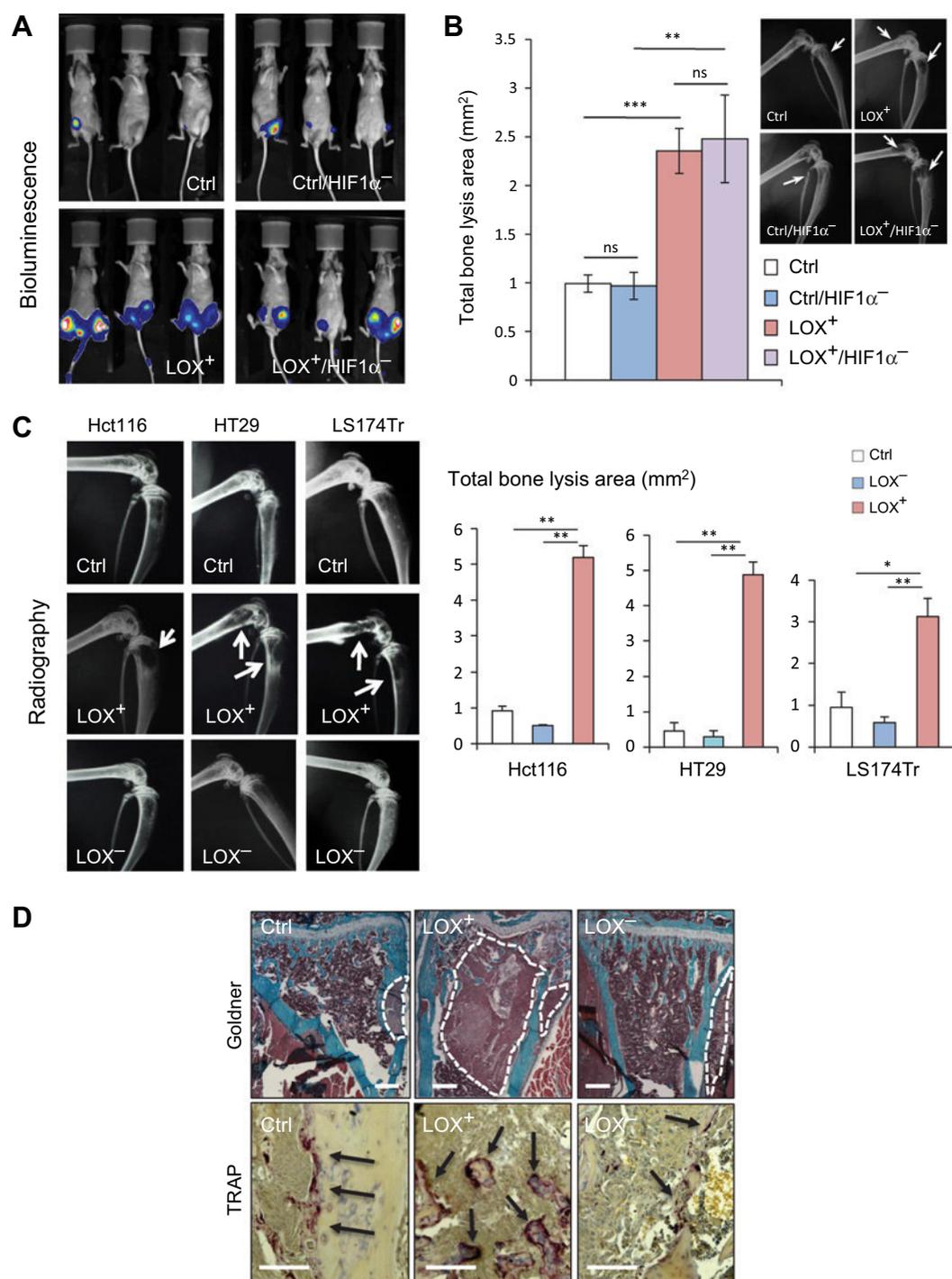


Figure 2.

High LOX expression in colorectal cancer cells promotes osteolytic lesion formation *in vivo*. **A**, Whole-body bioluminescence imaging of animals at day 31 after intra-arterial inoculation of luciferase-expressing Hct116 cells. Ctrl, parental Hct116 cells; LOX $^{+}$, LOX-overexpressing Hct116 cells; Ctrl/HIF1 α^{-} , shRNA-HIF1 α -expressing Hct116 cells; LOX $^{+}$ /HIF1 α^{-} , LOX-overexpressing Hct116 cells silenced for HIF1 α . The images shown are examples that best illustrate data obtained for each group. **B**, Quantification of the area of osteolytic lesions (mm 2) on radiographs on day 31 after tumor cell inoculation. Inset, representative radiographs of hind limbs with osteolytic lesions (arrows). **C**, Left, representative radiographs of hind limbs from mice bearing Hct116, HT29, or LS174Tr colorectal tumors. Ctrl, parental tumor cells; LOX $^{+}$, LOX-overexpressing tumor cells; LOX $^{-}$, shRNA-LOX-expressing tumor cells. Right, quantification of the area of osteolytic lesions (mm 2) on radiographs at day 35 after tumor cell inoculation. **D**, Top, Goldner trichrome staining of tissue sections of tibial metaphysis from tumor-bearing animals. Bone is stained green, whereas bone marrow and tumor cells are stained red. The dotted line delimits the extent of tumor burden. Bottom, TRAP-stained metastatic bone tissue sections. Osteoclasts are stained red (arrows). All images were obtained from different mice on day 35 after tumor cell inoculation. The images shown are examples that best illustrate LOX's effects on bone destruction and tumor burden. Scale bar, 0.1 mm. Data are mean \pm SD. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. ns, not significant.

Table 1. Effects of LOX overexpression or silencing in Hct116 colorectal cancer cells on bone metastasis formation in animals

Cell line	Histomorphometry				TRAP Staining	
	BV/TV (%)	P	TuV/STV (%)	P	OC.S/BS (%)	P
Ctrl	26.5 ± 2.3 (n = 8)	—	9.8 ± 6.4 (n = 8)	—	31 ± 4.1 (n = 5)	—
LOX ⁺	13.9 ± 2.2 (n = 8)	0.0006	57.6 ± 5.5 (n = 8)	0.0016	73 ± 6 (n = 7)	0.0017
LOX ⁻	28.3 ± 2.9 (n = 7)	0.53	2.6 ± 2.1 (n = 7)	0.33	19 ± 8.3 (n = 3)	0.09

NOTE: Values are mean ± SD. P values (two-sided) are for pairwise comparison with the control group (Ctrl) using the Mann-Whitney U test. Abbreviations: BV/TV, bone volume-to-tissue volume ratio; TuV/STV, tumor volume-to-total soft tissue volume ratio; OC.S/BS, active osteoclast resorption surface per trabecular bone surface; TRAP, tartrate-resistant acid phosphatase.

addition, there was a dramatic increase in the TuV/STV ratio (a measure of the skeletal tumor burden) in LOX⁺ tumor-bearing animals, compared with animals bearing Ctrl and LOX⁻ tumors (Fig. 2D and Table 1).

To further examine LOX⁻ dependency, *nude* mice were treated with the conditioned medium from LOX⁺ or LOX⁻ Hct116 cells beginning 1 day (D-1) before intra-arterial inoculation of parental Hct116 cells (D0). The daily treatment with the conditioned medium then continued until day 35 (D35), at which time anesthetized animals were analyzed by radiography (Fig. 3A). Radiographs of animals showed that mice treated with the LOX⁺ conditioned medium had a 6-fold increase in the extent of osteolytic lesions, compared to that observed with the LOX⁻ medium (Fig. 3B). The bone marrow of 3 metastatic mice per group was then collected and placed in culture under antibiotic selection, enabling the selective outgrowth of antibiotic-resistant tumor cells (Fig. 3C). The average number of colonies recovered

from the bone marrow of mice treated with the LOX⁺ conditioned medium was 2.5-fold higher than that recovered from animals treated with the LOX⁻ conditioned medium (344 ± 60 vs. 121 ± 25 colonies/well; P = 0.08; Fig. 3C). Hence, LOX plays a prominent role in supporting osteolytic lesion formation *in vivo* and tumor cell dissemination *ex vivo*.

LOX disrupts the balance between bone resorption and bone formation

By disrupting the physiologic balance between bone resorption and bone formation, tumor cells promote skeletal destruction (14). To directly test whether LOX expression in Hct116 cells could influence osteoclast differentiation, we treated primary mouse bone marrow cell cultures with RANKL and M-CSF together with the conditioned medium from Ctrl, LOX⁻, and LOX⁺ cancerous cells. Consistent with *in vivo* data (Fig. 2D), the conditioned medium from LOX⁺ Hct116 cells stimulated the

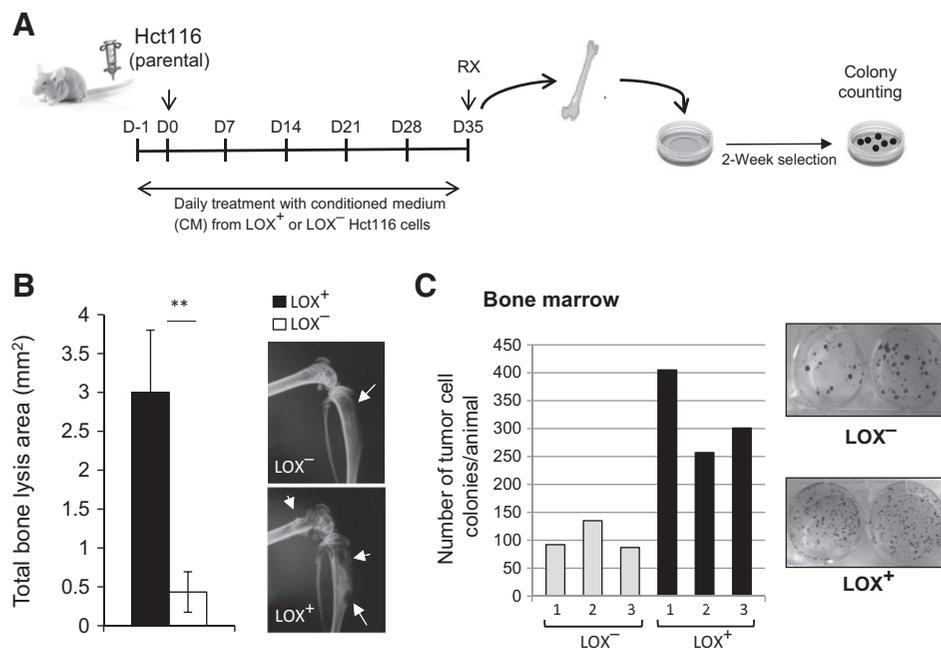


Figure 3. Systemic delivery of tumor-secreted LOX enhances osteolysis and tumor cell outgrowth in the bone marrow. **A**, Schematic representation of the experimental protocol. Parental Hct116 cells were inoculated intra-arterially to Balb/c nude mice. Animals received a 5-week daily treatment with the conditioned medium from LOX⁻ or LOX⁺ Hct116 cells, starting one day before tumor cell inoculation. Tumor-bearing mice were analyzed by radiography (RX) at day 35 after tumor cell inoculation, and then culled and the bone marrow was collected for tumor cell colony assays. **B**, Quantification of osteolytic lesions (mm²) on radiographs. Inset, representative radiographs of hind limbs with osteolytic lesions (arrows) from animals treated with the conditioned medium of LOX⁻ or LOX⁺ Hct116 cells. **, P < 0.01. **C**, Graphs showing the total number of tumor cell colonies formed in the bone marrow of each mouse treated with the LOX⁻ or LOX⁺ conditioned medium. Representative images of tumor cell colonies are shown for each group.

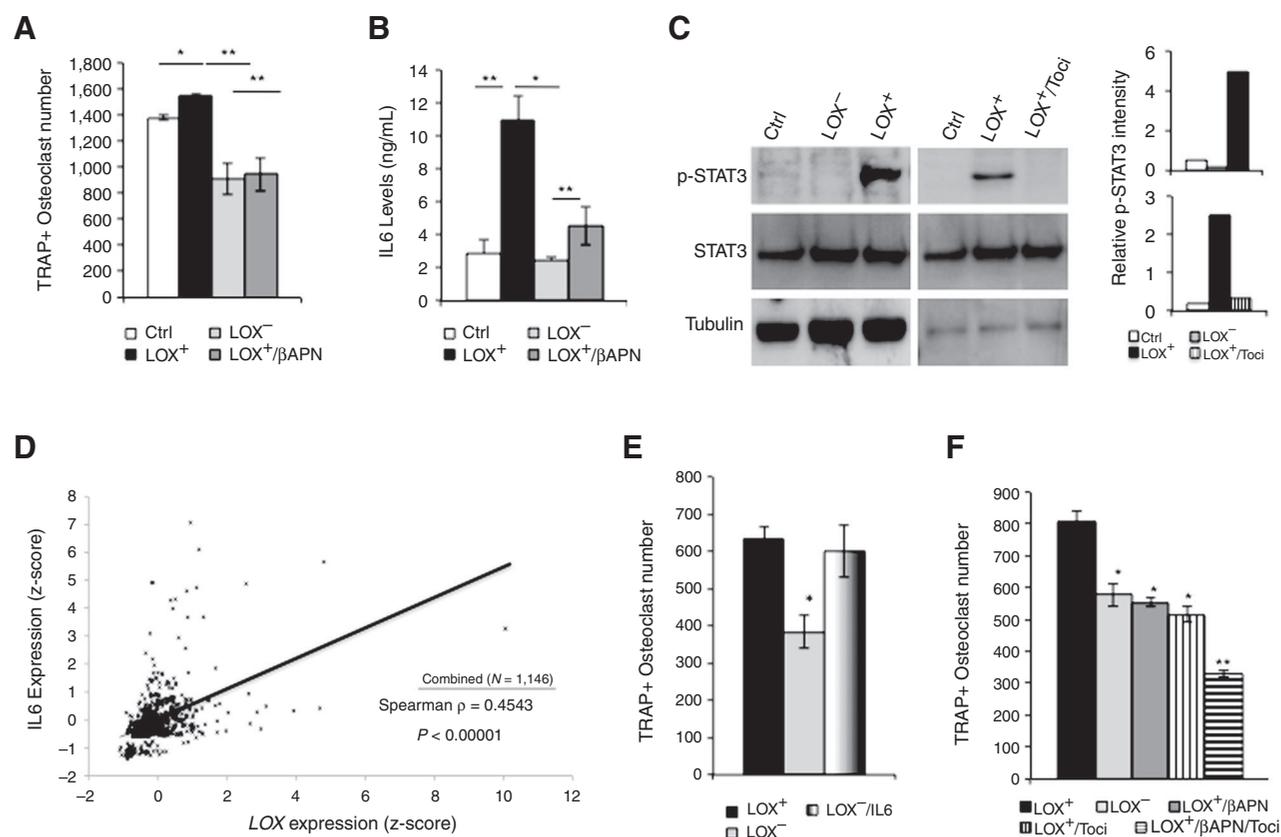


Figure 4.

LOX-driven IL6 production by colorectal cancer cells stimulates osteoclastogenesis. **A**, *In vitro* osteoclast differentiation of murine bone marrow cells treated with M-CSF + RANKL in combination with the conditioned medium from Ctrl, LOX⁻, or LOX⁺ Hct116 cells. The conditioned medium from LOX⁺ Hct116 cells treated with βAPN was also tested. Mature osteoclasts were quantified as multinucleated (more than three nuclei), TRAP-positive cells. **B**, ELISA measurement of IL6 in the conditioned medium from Ctrl, LOX⁻, LOX⁺, or LOX⁺/βAPN Hct116 cells. **C**, Immunoblot analysis of phosphorylated STAT3 in Ctrl, LOX⁻, and LOX⁺ Hct116 cells, treated or not treated with tocilizumab. Graphs show intensities of phosphorylated STAT3 relative to total STAT3. Tubulin was used as a control for equal loading. **D**, Correlation analysis of *LOX* and *IL6* expression intensities from 7 databases on colon cancer ($n = 1,146$ patients). **E**, Effect of exogenous IL6 (10 ng/mL) on osteoclastogenesis induced with M-CSF + RANKL in combination with the conditioned medium of LOX⁻ Hct116 cells, compared with that of LOX⁺ Hct116 cells. **F**, Effects of the anti-IL6 receptor antibody tocilizumab (100 ng/mL) and of βAPN (350 μmol/L) on RANKL-dependent osteoclastogenesis in the presence of the conditioned medium of LOX⁺ Hct116 cells. *, $P < 0.05$ or **, $P < 0.01$.

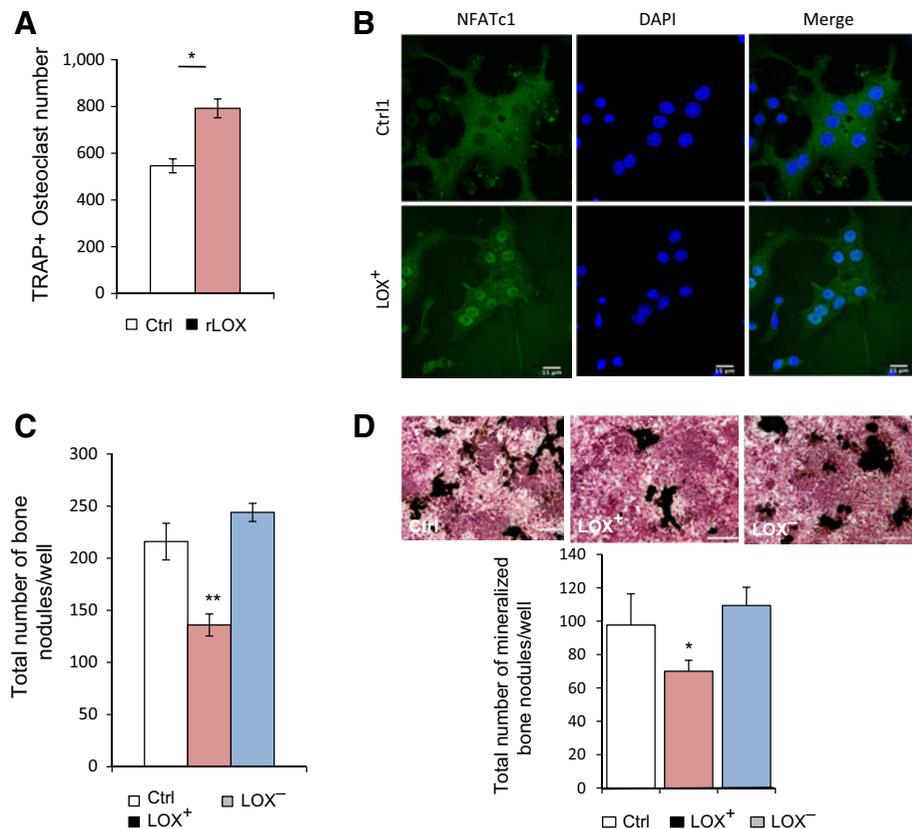
formation of TRAP-positive multinucleated osteoclasts, compared with conditioned media from Ctrl- and LOX⁻ Hct116 cells (Fig. 4A). As aforementioned, βAPN treatment of LOX⁺ tumor-bearing animals inhibited osteolysis (Supplementary Fig. S2). Similarly, βAPN almost completely inhibited LOX enzymatic activity in the conditioned medium from LOX⁺ Hct116 cells, compared with that observed with the conditioned medium from LOX⁻ Hct116 cells (Supplementary Fig. S3). In addition, βAPN blocked the stimulatory effect of LOX⁺ on osteoclastogenesis (Fig. 4A), indicating that the promoting effect of LOX on RANKL-dependent osteoclastogenesis critically depends on its enzymatic activity.

LOX overexpression induced a robust production of IL6 by Hct116 cells, whose production was almost totally inhibited by βAPN treatment (Fig. 4B). Tumor-derived IL6 can act as an autocrine agent and activate the STAT3 signaling pathway in colorectal cancer cells (23, 24). In agreement with these findings (23, 24), STAT3 phosphorylation levels were substantially increased in LOX⁺ Hct116 cells, compared to Ctrl- and LOX⁻ Hct116 cells (Fig. 4C). In addition, blockade of the IL6 receptor by

tocilizumab abrogated STAT3 phosphorylation in LOX⁺ Hct116 cells, compared with untreated cells (Fig. 4C). Thus, our data revealed a previously unreported functional link between LOX and IL6, in which LOX-driven IL6 production by colorectal cancer cells promotes IL6R/STAT3 signaling pathway. This link extended to the clinic, because *LOX* and *IL6* significantly correlated across 7 publicly available databases on colorectal cancer, when analyzed independently or in combination (Fig. 4D and Supplementary Fig. S4). The addition of IL6 to the conditioned medium of LOX⁻ Hct116 cells stimulated osteoclast formation to an extent similar to that observed with the conditioned medium from LOX⁺ Hct116 cells (Fig. 4E). Moreover, tocilizumab inhibited osteoclastogenesis induced by the LOX⁺ conditioned medium, and an additive inhibitory effect on osteoclast formation was observed when combining tocilizumab and βAPN (Fig. 4F). These results (Fig. 4E and F) suggested that both IL6 and LOX were effective stimulators of RANKL-dependent osteoclastogenesis. Indeed, in agreement with previous findings (25), we observed that recombinant LOX in combination with RANKL + M-CSF stimulated the formation of osteoclasts *in vitro*, compared with control

Figure 5.

LOX stimulates osteoclastogenesis and inhibits osteoblastogenesis. **A**, Recombinant LOX (rLOX; 150 ng/mL) enhanced RANKL-dependent osteoclast differentiation. **B**, Conditioned medium from LOX⁺ Hct116 cells promoted the nuclear translocation of NFATc1 in osteoclasts, compared with conditioned medium from parental Hct116 cells (Ctrl). Nuclei were stained blue with DAPI. **C** and **D**, *In vitro* differentiation of primary mouse calvaria cells cultured in osteogenic conditions with conditioned media from Ctrl, LOX⁻, and LOX⁺ Hct116 cells. Bone-mineralized nodules (stained black with von Kossa staining) were counted under light microscopy. Data are mean ± SD. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01.



(RANKL + M-CSF; Fig. 5A). In addition, LOX promoted a greater nuclear localization of NFATc1, the master regulator of osteoclastogenesis, than RANKL + M-CSF alone (85 vs. 30% of positive nuclear staining; *P* < 0.01; Fig. 5B). LOX alone did not stimulate osteoclastogenesis (data not shown). Hence, tumor-secreted LOX and IL6 were acting in concert to promote the generation of differentiated osteoclasts induced by RANKL.

To determine whether LOX expression in Hct116 cells could also influence osteoblast differentiation, we treated primary calvarial mouse osteoblasts with the conditioned medium from Ctrl, LOX⁺, or LOX⁻ Hct116 cells. We found that the conditioned medium from LOX⁺ Hct116 cells partially inhibited the formation of bone nodules and their mineralization, compared with conditioned media from Ctrl and LOX⁻ Hct116 cells (Fig. 5C and D).

Collectively, our findings suggested that tumor-derived LOX induces an imbalance between bone resorption and bone formation, which leads to bone destruction *in vivo*.

LOX primes tumor cells for dissemination to the bone marrow

To determine the role of LOX in the settlement of tumor cells in the bone marrow, animals injected with parental Hct116 cells were treated daily from D-1 to D7 with the conditioned medium from LOX⁻ or LOX⁺ Hct116 cells, with or without tocilizumab or βAPN treatment. The bone marrow was then collected and placed in culture under antibiotic selection, enabling growth of tumor cells that have disseminated to the bone marrow (Fig. 6A). We recovered colony-forming tumor cells in the bone marrow from 7 of 10 animals treated with the LOX⁺ conditioned medium,

whereas only 2 of 8 animals treated with the LOX⁻ conditioned medium had tumor cell colonies in the bone marrow (Fig. 6B). Moreover, the average number of colony-forming tumor cells recovered from the bone marrow of the 7 metastatic mice treated with the LOX⁺ conditioned medium was 4-fold higher than that recovered from the 2 mice treated with the LOX⁻ conditioned medium (Fig. 6B). The treatment of animals with βAPN completely blocked the stimulatory effects of LOX on incidence (1/6 animals) and the number of colony-forming tumor cells in the bone marrow (Fig. 6B). In sharp contrast, tocilizumab did not inhibit LOX-stimulatory effect on tumor cell dissemination (Fig. 6B).

Thus, these data indicate that LOX (irrespective of IL6) is crucially important in the settlement of tumor cells in the bone marrow.

LOX promotes tumor cell adhesion and survival

We have previously reported that LOX overexpression in breast cancer cells induces bone metastasis, a phenotype associated with its ability to induce the expression of a major epithelial-to-mesenchymal (EMT) transcription factor, TWIST1 (8). In addition, we have shown that TWIST1 facilitates breast cancer bone metastasis formation (21). We therefore proceeded to explore whether LOX promoted tumor cell colonization in bone via induction of EMT. Hct116 cells expressed detectable levels of genes encoding for EMT-inducing transcription factors, such as TWIST1 and SNAI1 (Supplementary Fig. S5). LOX expression in Hct116 cells did not modify the morphologic appearance of these cells and it did not modify TWIST1, SNAI1, or vimentin (VIM) expression (Supplementary Fig. S5), indicating that LOX in colon

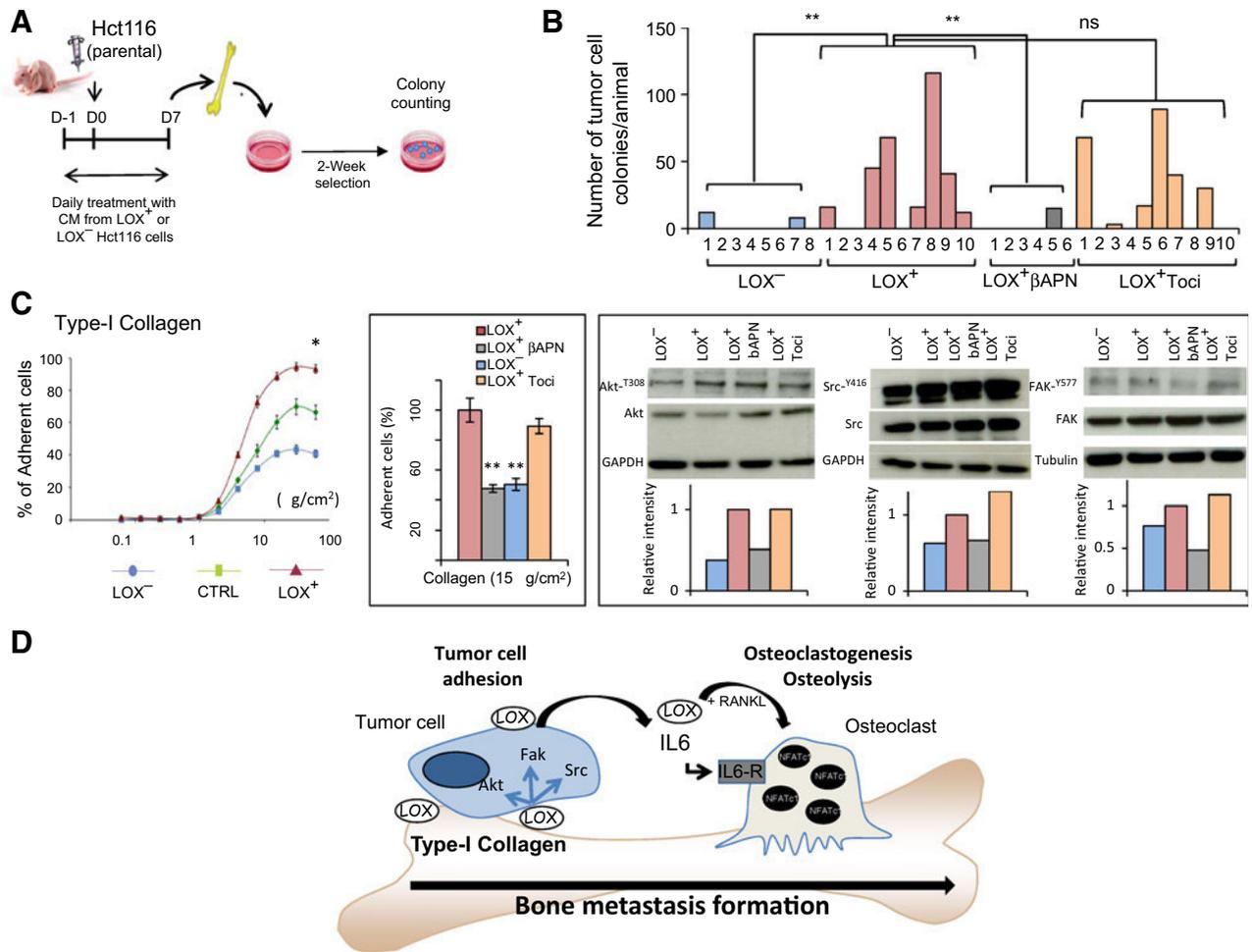


Figure 6.

Systemic delivery of tumor-secreted LOX promotes the settlement of colorectal cancer cells in the bone marrow. **A**, Schematic representation of the experimental protocol. Parental Hct116 cells were inoculated intra-arterially to nude mice, and then animals were treated with conditioned media of LOX⁻ or LOX⁺ Hct116 cells (treated or not treated with βAPN or tocilizumab). **B**, Graphs showing for each group the average number of tumor cell colonies recovered from the bone marrow. Each bar corresponds to a single mouse. Data are mean ± SD. **, *P* < 0.01. **C**, Attachment of Ctrl, LOX⁻, and LOX⁺ Hct116 cells to increasing concentrations of collagen. Inset, effect of βAPN or tocilizumab (Toci) on attachment of LOX⁺ Hct116 cells to collagen. Data are mean ± SD. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01. Right, immunoblot analysis of phosphorylated Akt, Src, and FAK in LOX⁻ and LOX⁺ Hct116 cells, treated or not treated with βAPN or tocilizumab (Toci). Graphs show intensities of phosphorylated Akt, Src, and FAK relative to total proteins. Tubulin or GAPDH was used as a control for equal loading. **D**, Schematic representation of the role of LOX during bone metastasis formation. Tumor-secreted LOX enhanced tumor cell attachment to collagen, activating integrin-associated signaling pathways (Fak, Src, Akt) and inducing IL6 production. In turn, IL6 and LOX (through the nuclear translocation of NFATc1) enhanced RANKL-mediated osteoclastogenesis, leading to osteolytic lesion formation.

cancer cells does not contribute to bone marrow colonization by promoting an EMT.

Early steps of bone metastasis involve the attachment and survival of DTCs to and in the bone matrix (14), two properties we examined using *in vitro* assays. Collagens constitute 90% of the total protein content in bone, type-I collagen being the most abundant bone extracellular matrix protein (26). Cell attachment experiments to type-I collagen were therefore performed using Ctrl, LOX⁻, and LOX⁺ Hct116 cells. As shown in Fig. 6C, there was a significant gain in the attachment of LOX⁺ Hct116 cells to collagen, compared with Ctrl Hct116 cells. The attachment of LOX-deficient tumor cells was lower than that observed with Ctrl Hct116 cells (Fig. 6C). In contrast, the extent of attachment of Hct116 tumor cell lines to fibronectin was the same, irrespective

of LOX expression levels (Supplementary Fig. S6). Using Hct116 cells silenced for LOX expression (LOX⁻) as a control to measure baseline cell attachment to collagen, we conducted cell attachment experiments with LOX⁺ Hct116 cells, in the presence or absence of βAPN or tocilizumab. As shown in Fig. 6C, βAPN abrogated the gain of attachment of LOX⁺ Hct116 cells to collagen (LOX⁺ βAPN), compared to that observed with untreated cells (LOX⁺) or LOX⁺ Hct116 cells treated with tocilizumab. LOX stimulated Akt, Src, and FAK phosphorylation in tumor cells previously attached to collagen (Fig. 6C). In addition, βAPN (but not tocilizumab) inhibited stimulatory effect of LOX on Akt, Src, and FAK phosphorylation (Fig. 6C). Hence, these observations suggested that LOX activity is important to mediate colorectal cancer cell attachment to type-I collagen.

Once tumor cells seed in the bone marrow, they need to survive in this microenvironment. A relevant *in vitro* feature of colorectal cancer cell survival is their ability to grow as colonospheres (27). We thus asked whether Ctrl, LOX⁻, and LOX⁺ Hct116 cells could form colonospheres in serum-free medium. Indeed, LOX⁺ Hct116 cells formed a higher number of colonospheres than the two other Hct116 cell lines, and growth of LOX⁺ Hct116 cells as colonospheres was significantly inhibited in the presence of β APN (Supplementary Fig. S7 and data not shown). Thus, LOX can provide colorectal cancer cells with a survival advantage in the bone marrow.

Discussion

A large body of preclinical and clinical evidence has shown that LOX expression in tumors facilitates the progression of several cancers and the development of metastases to distant organs, such as the lungs, liver, and brain (1, 2, 4, 7, 9, 10). Indeed, LOX has been identified as an important regulator of hypoxia-induced tumor progression via a HIF-1 α -dependent mechanism in numerous cancer types (1, 9–11). Surprisingly, aside from a very recent report that hypoxia-induced LOX promotes bone metastasis of breast cancer (19), there was no evidence as to whether this is a generalized function; that is, if tumor-derived LOX participates in the development of bone metastasis in other cancer models, such as colon cancer. We have previously shown that LOX synergizes with HIF-1 α in promoting *in vivo* growth of colorectal cancers (2). In the current study, we found that LOX was expressed by tumor cells in the bone marrow from patients with colorectal cancer with bone metastases and that, irrespective of HIF-1 α expression, tumor-secreted LOX promoted settlement of colorectal cancer cells in the bone marrow and induced a robust expression of IL6 by these tumor cells. In turn, both LOX and IL6 played a prominent role in enhancing RANKL-dependent differentiation of mature osteoclasts. In breast cancer, it has been shown that LOX stimulates the generation of differentiated osteoclasts through the activation of NFATc1 (19). LOX secreted from colorectal cancer cells also promoted the nuclear translocation of NFATc1 in osteoclasts. In addition, LOX inhibited osteoblast differentiation, thereby creating an imbalance between bone resorption and bone formation. On the basis of these findings, we propose a model in which LOX supports colorectal cancer cell dissemination in the bone marrow and LOX-driven IL6 production by colorectal cancer cells impairs bone homeostasis, thereby promoting osteolytic lesion formation *in vivo* (Fig. 6D).

Having shown that tumor-secreted LOX drives osteolytic lesion formation *in vivo*, we then attempted to determine the specific steps of bone colonization to which LOX functions are manifested. It has been previously reported that LOX enhances the metastatic trait of breast tumors in animals by stimulating TWIST1 expression in tumor cells (8). In addition, LOX overexpression in breast cancer has been associated with EMT of tumor cells (28). Here, LOX overexpression in Hct116 cells did not modify the morphologic appearance of these cells and it did not modify the expression of transcription factors TWIST1 and SNAIL, indicating that LOX in colorectal cancer cells did not contribute to tumor cell dissemination in bone by promoting an EMT. Instead, our results established that LOX (irrespective of IL6) is crucially important in the settlement of colorectal cancer cells in the bone marrow *in vivo*. Specifically, we showed that LOX directly plays a stimulatory role in the survival of colorectal cancer cells in the bone marrow by enhancing their attachment to collagen. This

contention was supported by the fact that (i) LOX activated the phosphorylation of Akt, FAK, and Src in colorectal cancer cells that were attached to collagen and (ii) the blockade of LOX activity with β APN inhibited both colorectal cancer cell attachment to collagen and Akt, FAK, and Src phosphorylation. Here, cell attachment experiments to solid-phase adsorbed collagen were conducted over 1 hour, at which time collagen fibers are still disorganized (13). Thus, irrespective of its ability to crosslink collagen fibers (1), LOX specifically stimulated phosphorylation of Akt, Src, and FAK in colorectal cancer cells attached to collagen. How LOX activity activates Akt, Src, and FAK remains unclear. It has been shown that LOX enhances integrin-associated signaling pathways such as FAK and Src (1, 4, 6). In addition, integrins mediate colorectal cancer survival through Akt (29) and we have previously reported that LOX activates Akt in colorectal cancer cells (2). Therefore, it is conceivable that some integrin-mediated mechanisms are involved in promoting (directly or indirectly) the effect of LOX on colorectal cancer cell adhesion to collagen. Our findings do not preclude the possibility that other members of the LOX family could contribute to the dissemination of colorectal cancer cells in the bone marrow. However, endogenous mRNA levels of LOXL1, LOXL2, LOXL3, and LOXL4 in Hct116 cells were only barely detectable (2), and LOX overexpression in these tumor cells did not modify expression levels of other LOX family members (Supplementary Table S3).

Although overt bone metastasis is rare in colon cancer and frequent in breast cancer, the detection rate of DTCs in the bone marrow from patients with colorectal cancer is comparable with what is observed in breast cancer (15). It seems therefore that colon cancer DTCs should harbor a mechanism to grow out, but this appears to be somehow blocked in colon cancer patients. Only 5 patients with colorectal cancer with bone metastases were studied here. However, all of them had LOX-positive tumor cells in the bone marrow. In addition, LOX overexpression endowed colorectal cancer cells with full competence for aggressive colonization in bone *in vivo*. Environments that are rich in type-I collagen may be critical for DTCs, promoting their transition from dormancy to metastatic growth (30). Given the role of LOX in mediating colorectal cancer cell attachment to collagen and survival in the bone marrow, it is conceivable that LOX participates to metastatic outgrowth of DTCs.

In conclusion, our findings collectively show that LOX supports colorectal cancer cell dissemination in the bone marrow and they reveal a novel mechanism through which LOX-driven IL6 production by colorectal cancer cells impairs bone homeostasis. We believe this is a crucially important observation, which supports targeting LOX for metastasis prevention.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: C. Reynaud, F. Pez, P. Clézardin

Development of methodology: C. Reynaud, P. Di Mauro, M. Croset, E. Bonnelye, F. Pez, G. Aimond

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): C. Reynaud, L. Ferreras, M. Croset, A.E. Karnoub, M. Brevet
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): C. Reynaud, C. Kan, F. Pez, A.E. Karnoub, M. Brevet, P. Clézardin

Writing, review, and/or revision of the manuscript: C. Reynaud, C. Kan, E. Bonnelye, G. Aimond, A.E. Karnoub, P. Clézardin

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): C. Reynaud
Study supervision: C. Reynaud, P. Clézardin

Acknowledgments

We acknowledge Dr. Cyril Confavreux (Lyon, France) for providing tocilizumab and Dr. Sabine Riethdorf (Hamburg, Germany) for conducting immunofluorescence experiments on colorectal cancer cells. We also thank Dr. Klaus Pantel (Hamburg, Germany) and Dr. Catherine Panabières (Montpellier, France) for valuable discussion.

Grant Support

C. Reynaud acknowledges the support of the Ligue Contre le Cancer (Comité du Rhône) and CNRS. P. Clézardin is supported by INSERM, the University of

Lyon, the Grand Prix de la Recherche Ruban Rose, the Fondation de France (grant 00016390), and INCa (grant 2014-164). C. Kan is a recipient of a Marie Curie individual fellowship from the Horizon 2020 European Programme under agreement number 655777. In addition, this work was supported by the LabEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-61) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received September 22, 2015; revised September 28, 2016; accepted September 30, 2016; published OnlineFirst October 14, 2016.

References

- Barker HE, Cox TR, Erler JT. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012;12:540–52.
- Pez F, Dayan F, Durivault J, Kaniewski B, Aimond G, Le Provost GS, et al. The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth. *Cancer Res* 2011;71:1647–57.
- Barker HE, Chang J, Cox TR, Lang G, Bird D, Nicolau M, et al. LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer Res* 2011;71:1561–72.
- Baker AM, Bird D, Lang G, Cox TR, Erler JT. Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK. *Oncogene* 2013;32:1863–8.
- Cox TR, Bird D, Baker AM, Barker HE, Ho MW, Lang G, et al. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res* 2013;73:1721–32.
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 2009;139:891–906.
- Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, McCauley S, Rodriguez HM, Oyasu M, et al. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med* 2010;16:1009–17.
- El-Haibi CP, Bell GW, Zhang J, Collmann AY, Wood D, Scherber CM, et al. Critical role for lysyl oxidase in mesenchymal stem cell-driven breast cancer malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:17460–5.
- Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006;440:1222–6.
- Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, et al. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* 2009;15:35–44.
- Wong CC, Gilkes DM, Zhang H, Chen J, Wei H, Chaturvedi P, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:16369–74.
- Bondareva A, Downey CM, Ayres F, Liu W, Boyd SK, Hallgrímsson B, et al. The lysyl oxidase inhibitor b-aminopropionitrile diminishes the metastatic colonization potential of circulating breast cancer cells. *PLoS One* 2009;4:e5620.
- Grossman M, Ben-Chetrit N, Zhuraviev A, Afik R, Bassat E, Solomonov I, et al. Tumor cell invasion can be blocked by modulators of collagen fibril alignment that control assembly of the extracellular matrix. *Cancer Res* 2016;76:4249–58.
- Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer* 2011;11:411–24.
- Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1419–24.
- Flatmark K, Borgen E, Nesland JM, Rasmussen H, Johannessen HO, Bukholm I, et al. Disseminated tumor cells as a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011;104:1434–9.
- Qiu M, Hu J, Yang D, Cosgrove DP, Xu R. Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study. *Oncotarget* 2015;6:38658–66.
- Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* 2014;14:611–22.
- Cox TR, Rumney RM, Schoof EM, Perryman L, Høye AM, Agrawal A, et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature* 2015;522:106–10.
- Noblesse E, Cenizo V, Bouez C, Borel A, Gleyzal C, Peyrol S, et al. Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J Invest Dermatol* 2004;122:621–30.
- Croset M, Goehrig D, Frackowiak A, Bonnelye E, Ansieau S, Puisieux A, et al. *Twist1* expression in breast cancer cells facilitates bone metastasis formation. *J Bone Miner Res* 2014;29:1886–99.
- Fradet A, Sorel H, Depalle B, Serre CM, Farlay D, Turtoi A, et al. A new murine model of osteoblastic/osteolytic lesions from human androgen-resistant prostate cancer. *PLoS ONE* 2013;8:e75092.
- Hsu CP, Chen YL, Huang CC, Chou CC, Liu CL, Hung CH, et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody inhibits the progression in human colon carcinoma cells. *Eur J Clin Invest* 2011;41:277–84.
- Lin L, Liu A, Peng Z, Lin HJ, Li PK, Li C, et al. STAT3 is necessary for proliferation and survival in colon cancer-initiating cells. *Cancer Res* 2011;71:7226–37.
- Tsukasaki M, Hamada K, Okamoto K, Nagashima K, Terashima A, Komatsu N, et al. LOX fails to substitute for RANKL in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*. 2016 Sep 8. [Epub ahead of print].
- Rosert J, De Crombrughe B. Type I collagen: structure, synthesis, and regulation. In: Bilezikian JP, Raisz LA, Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*, 2nd ed.. San Diego, CA: Academic Press; 2013. p. 189–210.
- Shaheen S, Ahmed M, Lorenzi F, Nateri AS. Spheroid-formation (ColonoSphere) assay for in vitro assessment and expansion of stem cells in colon cancer. *Stem Cell Rev* 2016;12:492–9.
- Han Y, Lian S, Cui X, Meng K, Györfy B, Jin T, et al. Potential options for managing LOX+ ER– breast cancer patients. *Oncotarget* 2016;7:32893–901.
- Bao S, Ouyang G, Bai X, Huang Z, Ma C, Liu M, et al. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell* 2004;5:329–39.
- Barkan D, El Touny LH, Michalowski AM, Smith JA, Chu I, Davis AS, et al. Metastatic growth from dormant cells induced by a col-1-enriched fibrotic environment. *Cancer Res* 2010;70:5706–16.