



Etude du rôle des récepteurs de guidage axonal Robo1 et Robo4 dans la formation et le développement des métastases osseuses

Bénédicte Eckel

► To cite this version:

Bénédicte Eckel. Etude du rôle des récepteurs de guidage axonal Robo1 et Robo4 dans la formation et le développement des métastases osseuses. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT: 2012LYO10311 . tel-00873485

HAL Id: tel-00873485

<https://theses.hal.science/tel-00873485>

Submitted on 15 Oct 2013

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

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

Université Claude Bernard - Lyon 1

Ecole doctorale de Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES DE LA VIE

(Arrêté du 7 août 2006)

Thèse soutenue le 12 décembre 2012 (N° d'ordre : 311-2012)

Par

BENEDICTE ECKEL

Etude du rôle des récepteurs de guidage axonal Robo1 et Robo4 dans la formation et le développement des métastases osseuses

INSERM U1033 :

« Physiopathologie, Diagnostic et Traitements des métastases osseuses »

Directeur de Thèse : Philippe CLEZARDIN

Co-directeur : Chantal DIAZ

Membres du jury :

Monsieur le Docteur Alain CHEDOTAL

Madame le Professeur Marie-Christine DE VERNEJOUL

Monsieur le Professeur Dominique HEYMANN

Madame le Docteur Chantal DIAZ

Monsieur le Docteur Philippe CLEZARDIN

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Co-directeur de thèse

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Philippe CLÉZARDIN pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir accordé sa confiance ainsi que les moyens scientifiques et matériels pour développer ce travail de thèse. Je tiens également à remercier le Dr Chantal DIAZ pour l'aide compétente qu'elle m'a apportée et son encouragement. Je remercie mes deux encadrants pour leurs conseils et soutiens qui ont largement contribué à l'aboutissement de cette thèse.

Je remercie également le Pr Marie-Christine DE VERNEJOUL et le Pr Dominique HEYMANN pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu me porter en acceptant d'être rapporteurs et en me faisant bénéficier de leurs critiques constructives. Je tiens également à exprimer mes remerciements au Dr Alain CHEDOTAL pour avoir accepté de présider mon jury.

Je souhaite aussi associer ce travail à tous les membres de l'équipe U1033 qui m'ont aidée et conseillée. Un grand merci à Martine et Ismahène (et ses enfants que j'ai vu grandir dans son petit ventre !!) pour leurs précieux conseils et écoutes. Un grand merci aussi à Delphine pour sa patience sur les protocoles *in vivo*, et qui a su faire avec mes craintes. Anaïs avec qui j'ai traversé toutes les épreuves de la thèse (rédaction, harcèlement de secrétaires) mais aussi de très bons moments. Lise qui m'a aussi bien aidée pour le travail, que nourrie pendant ma thèse. Lamia pour sa gentillesse, et dont le bruit de l'ordinateur aura bercé mes douces journées de rédaction. Agnieska, Sophie, Caliméro (Raphaël), Debashish et Francesco avec qui j'ai pu discuter de tout (et parfois en anglais !!). Johnny pour la superbe visite du musée des horreurs. Je remercie également Caroline, Edith et Olivier pour leurs conseils et bien sûr Marie-Claude et Christine pour toutes les commandes et dossiers que j'ai pu leur demander en urgence.

Enfin, je n'oublie pas ceux qui sont partis, Marion, Vincent et Richard qui m'ont aidée à faire mes premiers pas dans le laboratoire mais qui sont aussi devenus mes amis. Marion qui m'a fait découvrir la joie des interminables épisodes *Twilight* et les blagues de Vincent qui mouvementaient le laboratoire.

Je remercie également les personnes que j'ai pu croiser au fil du temps et qui sont devenues et ont su rester mes amis malgré la distance : Thomas, mon petit FDR préféré, Florine et Marine, mes amies d'enfance et confidentes, mais aussi ceux que j'ai rencontrés plus tardivement Benjamin (et ses fameuses blagues), Emmanuelle, Claudine, et Emily.

Enfin je tiens tout particulièrement à remercier Jérémy (BG) pour son soutien tout au long de cette aventure mais aussi pour la joie qu'il m'apporte chaque jour.

Et bien entendu, un grand merci à ma Maman et à mes frères qui m'ont toujours protégée et soutenue et que je vais pouvoir revenir embêter plus souvent maintenant !!

Résumé

Etude du rôle des récepteurs de guidage axonal Robo1 et Robo4 dans la formation et le développement des métastases osseuses

Les métastases osseuses sont des complications fréquentes de nombreuses tumeurs solides et sont responsables, sur le plan clinique, de fractures osseuses, d'hypercalcémie et de douleurs. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif ; la compréhension des mécanismes impliqués dans la formation et le développement des métastases osseuses est donc nécessaire afin d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques.

Une analyse transcriptomique comparative entre une lignée humaine de cancer du sein, les MDA-MB-231, et leur sous-population ostéotropique, les B02, a montré une surexpression de composants de la voie de signalisation Slit/Robo. Les récepteurs Robo et leurs ligands Slits, initialement identifiés comme facteurs clés du guidage axonal lors du développement, sont également impliqués dans la migration des cellules cancéreuses.

Afin d'étudier le rôle de ces récepteurs Robo1 et 4 dans la dissémination métastatique à l'os, nous avons inhibé l'expression de ces gènes dans les cellules B02. Des expériences *in vitro* et *in vivo* montrent alors un rôle antagoniste de Robo1/4. En effet, l'inhibition de Robo1 augmente la croissance des tumeurs primaires, tandis que celle de Robo4 la diminue. Ces récepteurs régulent également différemment la formation de lésions ostéolytiques ainsi que la croissance tumorale de ces métastases. *In vitro*, l'absence de Robo1 augmente l'invasion, tandis que celle de Robo4 la diminue. Nous avons également montré que l'inhibition de Robo4 ralentit la colonisation de la moelle osseuse par les cellules B02 à des temps précoces. Enfin, l'étude d'une cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein montre une corrélation entre l'expression de Robo4 et la rechute métastatique osseuse.

Cette étude montre l'implication de la voie Slit/Robo dans la dissémination métastatique à l'os, et semble par conséquent constituer une approche thérapeutique judicieuse pour traiter ces métastases.

Mots clés : cancer du sein, métastases osseuses, Robo1/4, Slit2, invasion.

Abstract

Study of the role of axon guidance receptors Robo1 and Robo4 in the formation and development of bone metastases

Bone metastases are a common complication of many solid tumors and are clinically responsible of bone fractures, hypercalcemia, and pain. Currently, there is no curative treatment; understanding the mechanisms involved in the formation and development of bone metastases is therefore necessary to consider new therapeutic approaches.

A comparative transcriptomic analysis between the human breast cancer cell line MDA-MB-231, and its osteotropic subpopulation, B02, has shown an up-regulation of Slit/Robo signaling pathway.

Robo receptors and their ligands Slits were initially identified as key factors in axon guidance during development. However, these proteins are also involved in the migration of cancer cells.

To investigate the role of these receptors Robo1 and 4 in breast cancer bone metastasis, the expression of these genes was inhibited in B02 cells. *In vitro* and *in vivo* experiments point out antagonistic role of Robo1/4. Indeed, inhibition of Robo1 expression increases primary tumors growth, while Robo4 invalidation reduces it. These receptors also differently regulate the formation of osteolytic lesions and extent of skeletal tumor burden. *In vitro*, Robo1 depletion induces an increased invasion, whereas Robo4 depletion decreases it. We also showed that inhibition of Robo4 reduces survival and growth of B02 cells in the bone marrow at early times of invasion. Finally, a cohort study of breast cancer patients shows a strong correlation between Robo4 expression and metastatic relapse in bone.

This study shows the involvement of the Slit/Robo pathway in bone metastasis, and therefore seems to be a judicious therapeutic approach to treat these metastases.

Keywords: breast cancer, bone metastases, Robo1/4, Slit2, invasion

Table des matières

Remerciements.....	2
Résumé	3
Abstract.....	4
Table des matières	5
Liste des illustrations	9
Liste des tableaux.....	12
Liste des abréviations	13
PARTIE I : Préambule	18
PARTIE II : Etat de l'art	22
A- Physiologie osseuse	23
1- Morphologie du tissu osseux / organisation macroscopique	23
1.1- Structure de l'os	23
1.2- Vascularisation et innervation	24
2- Composition du tissu osseux / organisation microscopique	27
2.1- La matrice extracellulaire osseuse	27
2.1.1- Matrice organique	28
2.1.2- Matrice inorganique	29
2.2- Les cellules du tissu osseux.....	30
2.2.1- Les cellules impliquées dans l'architecture osseuse	30
2.2.1.1- Ostéoclastes	30
2.2.1.2- Ostéoblastes	34
2.2.1.3- Ostéocytes	38
2.2.2- Autres types cellulaires.....	39
2.2.2.1- Cellules souches hématopoïétiques	39
2.2.2.2- Cellules nerveuses.....	44
3- Le remodelage osseux.....	45
3.1- Processus du remodelage osseux	46
3.2- Régulation du remodelage osseux.....	48

3.2.1- Régulation par des facteurs systémiques	48
3.2.1.1- Les hormones systémiques	48
3.2.1.2- Les facteurs nutritionnels	50
3.2.2- Régulation par des facteurs locaux	50
3.2.2.1- Les facteurs de croissance	50
3.2.2.2- Les cytokines	51
3.2.3- Le système RANK/RANKL/OPG	51
3.2.4- Autres régulations	52
4- Techniques d'étude de l'os	53
4.1- Techniques invasives	53
4.2- Techniques non invasives	55
B- Les métastases osseuses des tumeurs solides	62
1- Le processus métastatique	63
2- Ostéotropisme	64
2.1- Invasion et échappement du site tumoral primitif	64
2.2- Migration ciblée des cellules tumorales vers l'os	67
2.3- Attachement des cellules à l'endothélium/extravasation	68
2.4- Envahissement et nidation	70
3- Ostéomimétisme	71
4- Développement des métastases osseuses	72
4.1- Métastases ostéocondensantes	73
4.1.1- Stimulateurs de la formation osseuse	74
4.1.2- Contribution du tissu osseux dans la croissance des métastases ostéocondensante	77
4.2- Métastases ostéolytiques	77
4.2.1- Stimulateurs de la résorption osseuse	79
4.2.2- Inhibiteurs de la formation osseuse	82
4.2.3- Contribution du tissu osseux dans la croissance des métastases ostéolytiques	83
5- Les stratégies thérapeutiques médicamenteuses	86

C- Les récepteurs de guidage axonal et le tissu osseux	92
1- Sémaphorines / Plexines, Neuropilines	92
2- Nétrines / DCC	94
3- Ephrines / Eph récepteurs	95
4- Slit / Robo	98
D- Les récepteurs de guidage axonal Roundabout	102
1- Les récepteurs Robo et leurs ligands	102
1.1- Structure des récepteurs Robo et de leurs ligands Slit	102
1.2- Interaction Slit/Robo	105
1.3- Robo4 : un récepteur Robo non conventionnel	107
1.4- Régulation de l'expression des récepteurs Robo	107
1.4.1- Régulations épigénétiques	108
1.4.2- Régulations transcriptionnelles	109
1.4.3- Régulation post-transcriptionnelles	109
1.4.4- Modifications post-traductionnelles	112
2- Rôles des récepteurs Robo dans le développement	114
2.1- Evènements intracellulaires liés à l'interaction Slit/Robo	115
2.1.1- Abelson et Enabled	116
2.1.2- Rho GTPases	116
2.1.3- Interaction avec le récepteur à la nétrine : DCC	117
2.1.4- Interaction avec la protéine Commissureless (Comm)	119
2.2- Fonctions de la voie Slit/Robo	120
2.2.1- Migration cellulaire et guidance axonale	121
2.2.2- Ramifications axonales et dendritiques	125
2.2.3- Projections topographiques	126
3- Voie de signalisation Slit/Robo dans la progression tumorale	128
3.1- Altération de l'expression de la voie Slit/Robo dans les cancers	129
3.2- Slit et Robo induisent la survie et la prolifération des cellules tumorales	133
3.2.1- Survie et mort cellulaire tumorale	133
3.2.2- Prolifération cellulaire	134

3.3- Slit et Robo induisent la mobilité des cellules tumorales.....	139
3.3.1- Régulation de l'interaction cellule/cellule	139
3.3.2- Régulation du cytosquelette d'actine	140
3.3.3- Régulation du chimiotactisme cellulaire.....	144
3.4- Implication de la voie Slit/Robo dans l'angiogenèse tumorale	146
3.4.1- Expression et rôles des protéines Slit et Robo dans la vascularisation.....	147
3.4.2- Implication des protéines Slit et Robo dans la régulation de l'angiogenèse tumorale	156
PARTIE III : Travail expérimental	158
Résumé des travaux expérimentaux	159
Introduction	160
Matériels et méthodes	163
Résultats	171
Travaux supplémentaires	198
PARTIE IV : Discussion et perspectives	204
PARTIE V : Publications et communications scientifiques	216
Liste des publications	217
Liste des communications scientifiques orales	218
Bibliographie.....	219

Liste des illustrations

Figure 1. Structure d'un os long.	24
Figure 2. Architecture osseuse et vascularisation.	26
Figure 3. Représentation schématique de la vascularisation osseuse.	27
Figure 4. Etapes de l'ostéoclastogénèse.	32
Figure 5. Représentation schématique du mécanisme de résorption osseuse par un ostéoclaste.	34
Figure 6. Etapes de la différenciation ostéoblastique.	36
Figure 7. Ostéocyte humain visualisé par microscopie à électronique à transmission.	39
Figure 8. Interactions des cellules souches hématopoïétiques (HSC) favorisant leur maintien dans la niche osseuse.	41
Figure 9. Représentation schématique du remodelage osseux et des protéines impliquées.	48
Figure 10. La radiographie.	56
Figure 11. La scintigraphie osseuse.	57
Figure 12. La tomodensitométrie.	58
Figure 13. L'IRM.	59
Figure 14. Bilan d'une tomographie par émission de positons (TEP) couplée à un scanner (CT-scan).	60
Figure 15. Résumé des différentes techniques d'imagerie de métastases osseuses.	61
Figure 16. Représentation schématique des mécanismes de la formation des métastases osseuses.	64
Figure 17. Deux types de métastases osseuses après coloration des sections osseuses au trichrome de Goldner.	73
Figure 18. Représentation schématique des interactions moléculaires entre les cellules tumorales et l'environnement osseux impliquées dans des métastases ostéocondensantes.	74
Figure 19. Représentation des interactions moléculaires entre les cellules tumorales et l'environnement osseux dans le développement des métastases ostéolytiques.	78
Figure 20. Interaction ostéoclaste-ostéoblaste via la voie de signalisation éphrines/Ephs.	97
Figure 21. Structure des récepteurs Robos et de leurs ligands Slits.	104
Figure 22. Modèles proposés de l'activité du miRNA-218.	111
Figure 23. Signalisation intercellulaire de la voie Slit/Robo.	118
Figure 24. Régulation du trafic intracellulaire du récepteur Robo.	120
Figure 25. Mécanismes de régulation du guidage axonal impliquant Robo3.	123
Figure 26. Parallélisme de l'arborisation des vaisseaux et des nerfs.	125

Figure 27. Le système olfactif principal et accessoire chez des souris sauvages ou KO Slit/Robo.....	127
Figure 28. La voie de signalisation Slit/Robo régule la prolifération cellulaire ainsi que le contact cellule-cellule en contrôlant la localisation de la β -caténine.	136
Figure 29. L'axe Slit2/Robo1 régule la prolifération et l'adhésion cellulaire en contrôlant la localisation de la β -caténine.	138
Figure 30. La voie de signalisation Slit/Robo régule la migration cellulaire en contrôlant l'activation de régulateurs du cytosquelette d'actine.	143
Figure 31. L'interaction Slit2/Robo1 inhibe la migration induite par l'axe CXCL12/CXCR4.	146
Figure 32. Robo4 induit l'angiogenèse <i>via</i> l'activation de Rho GTPases.	149
Figure 33. L'interaction Slit2/Robo4 inhibe l'angiogenèse induite par la voie du VEGF.	150
Figure 34. L'interaction Robo4/UNC5b inhibe l'angiogenèse.....	152
Figure 35. Régulation différentielle de l'angiogenèse par Slit2.	153
Figure 36. L'hétérodimérisation Robo1/Robo4 favorise l'angiogenèse.....	155
Figure 37. Analyse transcriptomique comparative de l'expression des gènes de la famille Slit/Robo entre la lignée cellulaire parentale MDA-MB-231 et la sous-population ostéotropique MDA-MB-231/B02.	172
Figure 38. Association de l'expression Robo1 ou Robo4 avec la rechute clinique du cancer du sein.....	175
Figure 39. Estimations des taux de survie sans rechute, par tests de Kaplan-Meier, chez 254 patientes atteintes de cancer du sein, selon le statut Robo1 et Robo4.	176
Figure 40. Sélection des cellules MDA-MB-231/B02 inhibées pour l'expression de Robo4.....	177
Figure 41. Analyse de l'inhibition de l'expression des récepteurs Robo1 ou Robo4 sur la croissance orthotopique de tumeurs mammaires chez les animaux.....	179
Figure 42. Association entre l'angiogenèse tumorale et l'inhibition de l'expression de Robo4 dans les cellules tumorales de xénogreffes orthotopiques.....	180
Figure 43. Association entre la prolifération tumorale et l'inhibition de l'expression de Robo4 dans les cellules tumorales de xénogreffes orthotopiques.....	181
Figure 44. Effet de l'inhibition de l'expression de Robo4 dans les cellules du cancer du sein sur la formation de métastases osseuses.	183
Figure 45. Effet de l'inhibition de l'expression de Robo4 dans les cellules MDA-MB-231/B02 sur l'ostéoclastogenèse.....	185
Figure 46. Dosage ELISA de cytokines pro-ostéoclastiques <i>in vivo</i>	186
Figure 47. Dosage ELISA de cytokines pro-ostéoclastiques <i>in vitro</i>	187
Figure 48. Effets de l'inhibition de l'expression de Robo4 sur la migration et l'invasion de cellules du cancer du sein.	189
Figure 49. Effets du ciblage par des anticorps anti-Robo1 ou anti-Robo4 sur l'invasion de cellules du cancer du sein.	190

Figure 50. Analyse de l'activité des MMP2 et 9 produites par les cellules Sc/ShRobo4.....	191
Figure 51. Effet de l'inhibition de l'expression de Robo4 dans les cellules du cancer du sein sur la croissance tumorale intra-osseuse.....	193
Figure 52. Dosage ELISA de cytokines pro-ostéoclastiques <i>in vivo</i>	194
Figure 53. Colonisation de la moelle osseuse par les cellules MDA-MB-231/B02.....	196
Figure 54. Analyse du taux d'expression des transcrits de Slit2 dans l'environnement osseux et les cellules osseuses.....	197
Figure 55. Sélection, par western blot, des clones MDA-MB-231/B02 transduits.....	200
Figure 56. Sélection des clones cellulaires 4T1 transduits par western blot.....	201
Figure 57. Suivi du potentiel métastatique des clones luciférase MDA-MB-231/B02 L1.2 et L4.1.	202
Figure 58. Représentation schématique de l'implication de la voie de signalisation Slit2/Robo1/Robo4 dans la formation et le développement des métastases osseuses.....	215

Liste des tableaux

Tableau 1. Fonctions principales des protéines non collagéniques de l'os.....	29
Tableau 2. Liste non exhaustive des principaux cancers et de leurs localisations métastatiques préférentielles.	63
Tableau 3. Facteurs impliqués dans la formation des métastases ostéolytiques.	85
Tableau 4. Agents thérapeutiques émergents pour le traitement des métastases osseuses.	87
Tableau 5. Bilan fonctionnel des récepteurs de guidage axonal.....	101
Tableau 6. Altérations de la voie de signalisation Slit/Robo dans les cancers.....	130
Tableau 7. Cohorte des Hospices Civils de Lyon (n=254).	173

Liste des abréviations

Abl :	Abelson
ADRB2 :	Récepteur adrénergique $\beta 2$
ALP :	Alkaline Phosphatase
AM :	Adrénomédulline
AOB :	Bulbe Olfactif Accessoire
ArfGAP :	ADP-Ribosylation Factor-directed GAP
ATF4 :	Activating Transcription Factor 4
BIRC5/Survivin :	Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat-Containing 5
BMP :	Bone Morphogenetic Protein
BMU :	Basic Multicellular Unit
BP :	Bisphosphonate
BSP II :	Bone Sialoprotein II
CAM :	Cell Adhesion Molecule
CaR :	Récepteur au Calcium
CAR cell :	CXCL12-Abundant Reticular Cell
CC :	Cellule Cancéreuse
CC domain :	Cytoplasmic Conserved domain
CE :	Cellule Endothéliale
CFU-GM :	Granulocytes Macrophage Colony Forming Unit
Comm :	Commissureless
COX-2 :	Cyclooxygenase-2
CRLR :	Calcitonin Receptor Like Receptor
CSF1R/C-FMS :	Colony Stimulating Factor 1 Receptor
CTGF/CCN2 :	Connective Tissue Growth Factor
CXCL-12/SDF1α :	Chemokine C-X-C motif Ligand 12/Stromal cell-Derived Factor 1 α
CXCR-4 :	Chemokine C-X-C motif Receptor 4
DC :	Dendritic Cell
DCC :	Deleted Colorectal Cancer
DKK :	Dickkopf
Dlx5 :	Distal-less homeobox 5
Dock :	Dreadlocks
EGF :	Epidermal Growth Factor

EMT :	Epithelial-Mesenchymal Transition
Ena :	Enabled
ERM :	Ezrine/Radixine/Moesine
E-sélectine :	Endothelial-sélectine
ET-1 :	Endothéline-1
ETAR :	récepteur de l'endothéline 1A
EVA-1 :	Epithelial V like Antigen 1
FC :	Front de Calcification
FGF :	Fibroblast Growth Factor
Frz :	Frizzled
GAP :	GTPase-Activating Protein
G-CSF :	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GEF :	Guanine Exchange Factor
GLCE :	Heparan-sulfate modifying enzyme Glucuronyl C5-Epimerase
GM-CSF :	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GSK-3β :	Glycogen Synthase Kinase-3 β
HGF :	Hepatocyte Growth Factor
HIF-1α :	Hypoxia-Inducible Factor-1
HPC :	Hematopoïetic Progenitor Cell
HRE :	Hypoxia-Response Element
HS :	Héparane Sulfate
HSC :	Hematopoïetic Stem Cell
HSPG :	Héparane-Sulfate Protéoglycane
HUVEC :	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM :	Intercellular Adhesion Molecule-1
ICI :	Index d'Interconnectivité
Ig :	Immunoglobuline
IGF :	Insulin-like Growth Factor
IL :	Interleukine
IRM :	Imagerie par Résonance Magnétique
Kd :	constante de dissociation
Krm :	Kremen
Kuz/ADAM10 :	Kuzbanian/Matrix Metalloproteinase 10
LAP :	Latency-Associated Protein

LIF :	Leukemia Inhibitory Factor
LLC :	Large Latent Complex
LOX :	Lysyl Oxydase
LPA :	Acide Lysophosphatidique
LPC :	Lysophosphatidylcholine
LRP5/6 :	Low density lipoprotein Receptor related Protein 5/6
LRR :	Leucine-Rich Repeat
LRT :	LRR Tendon-specific protein
LTBP-1 :	Latent TGF- β Binding Protein-1
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
M-CSF :	Macrophage Colony Stimulating Factor
MCP-1 :	Monocyte Chemoattractant Protein 1
miRNA :	microRNA
MMP :	Métalloprotéinase Matricielle
MSC :	Mesenchymal Stem Cell
MSX2 :	Msh homeobox 2
Nfact1 :	Nuclear Factor of Activated T-cells Cytoplasmic 1
NF-κB :	Nuclear Factor kappa B
NK :	Natural Killer
NLS :	Nuclear Localisation Signal
NPC :	Nasopharyngeal Carcinoma
NRP :	Neuropiline
OB :	Bulbe Olfactif
OB :	Ostéoblaste
OC :	Ostéoclaste
OE :	Epithélium Olfactif
OPG :	Ostéoprotégérine
OPN :	Cellules Squameuses de Carcinomes Oraux
OSCC :	Ostéopontine
OSN :	Neurone Olfactif Sensoriel
Osx :	Ostérix
PAK :	P21-Activated protein Kinase
PDGF :	Platelet Derived Growth Factor
PI3-K :	Phosphoinositide 3-Kinase

PGE2 :	Prostaglandine E2
PLCγ2 :	Phospholipase γ 2
PSA :	Prostate-Specific Antigen
PTH :	Hormone Parathyroïdienne
PTHrP :	Parathyroid Hormone-related Protein
RANK :	Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B
RANK-L :	Receptor Activator of NF κ B Ligand
RGC :	Cellule Ganglionnaire de la Rétine
RGD :	séquence Arginine-Glycine-Acide aspartique
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
Robo :	Roundabout
Runx2/cbfa-1 :	Runt Related Transcription Factor 2
RX :	radiographie à Rayon X
SCF :	Stem Cell Factor
Sema :	Sémaphorine
SNC :	Système Nerveux central
SNO cell :	Spindle-shaped N-cadherin ⁺ CD45 ⁻ Osteoblastic cell
SNS :	Système Nerveux Sympathique
SO :	Scintigraphie Osseuse
Sos :	Son of Sevenless
SOT :	Surface Ostéoïde Totale
Sox :	Sry-related high mobility box
SPECT :	Tomographie Couplée à Emission de Positons
SRE :	Skeletal-Related Events
srGAP :	slit/robo GAP
SRO :	Surface de Résorption Ostéoclastique
TEMP :	Tomographie d'Emission Monophotonique
TEP/PET :	Tomographie par Emission de Positons
TEP-CT/CT-scan :	TEP-Tomographie Couplée/Computing Tomography
TGFβ :	Transforming Growth Factor β
TIMP-1/2 :	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1/2
TMD :	Tomodensitométrie
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TRAP :	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase

UNC5 :	Uncoordinated 5
uNTx :	N-télopeptide du collagène de type I
uPA :	Urokinase-type Plasminogen Activator
USP33 :	Ubiquitin-Specific Protease 33
3'-UTR :	3'-Untranslated region
VCAM-1 :	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VDR :	Vitamin D Receptor
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4 :	Very Late Antigen 4
VM :	Vitesse de Minéralisation
VNO :	Organe Voméro-Nasal
VOR :	Volume d'Ostéoïde Relatif
VSN :	Neurone Sensitif Voméro-nasal
VTO :	Volume Trabéculaire Osseux
Wasp :	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

PARTIE I : Préambule

Dans les pays occidentaux, les cancers constituent la première cause de mortalité chez l'homme et la seconde, après les maladies cardiovasculaires, chez la femme. En 2011, le nombre de nouveaux diagnostics de cancer en France métropolitaine a été estimé à 365 500 pour l'ensemble de la population, respectivement 207 000 hommes et 158 500 femmes. Les cancers de la prostate chez l'homme (71 000 cas incidents) et du sein chez la femme (53 000 cas) sont les plus fréquents. En 2011, 147 500 décès par cancer ont été répertoriés, dont 11 500 dans le cas du cancer du sein. Bien que l'incidence du cancer du sein ait doublé entre 1980 et 2005, la survie relative est très bonne, supérieure à 80% (www.e-cancer.fr). La prise en charge des patientes présentant un cancer localisé par des approches chirurgicales ou de radiothérapies est efficace. Malheureusement, ces traitements sont beaucoup moins efficaces dans le cas de cancers avec métastases [1]. Le pronostic dépend alors moins de l'évolution locale de la tumeur primitive que d'une dissémination à distance aboutissant au développement de métastases.

L'os constitue le troisième site le plus fréquent pour le développement de métastases des tumeurs solides après le poumon et le foie. On estime qu'environ 80% des hommes avec un cancer évolué de la prostate, et 65 % des femmes avec un cancer du sein développeront des métastases osseuses durant l'évolution de leur maladie. Les métastases osseuses sont donc des complications fréquentes de nombreux cancers et sont associées à une morbidité sévère induisant des douleurs osseuses, des fractures pathologiques, des compressions médullaires et une hypercalcémie [1]. Ces complications entraînent une réduction importante de la qualité mais aussi de l'espérance de vie : la médiane de vie d'une patiente atteinte d'un cancer du sein métastatique est d'environ 2 ans. Avec 50 000 à 70 000 personnes concernées par an en France, les métastases osseuses constituent donc un problème majeur de santé publique.

Les cellules métastatiques présentes dans la moelle osseuse altèrent la fonction des cellules osseuses formatrices, les ostéoblastes, mais aussi résorptrices, les ostéoclastes et détournent à leur profit les signaux provenant de la matrice osseuse. En perturbant ainsi l'équilibre entre formation et résorption osseuse, les cellules métastatiques induisent la destruction de l'os [1]. Cette observation a conduit à l'élaboration de nombreuses thérapies visant à inhiber l'activité des ostéoclastes par traitement des patients avec les bisphosphonates et le dénosumab [2]. Toutefois, ces traitements sont uniquement donnés à visée palliative et n'améliorent pas la

survie des patients. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de ces lésions osseuses afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'étude du profil d'expression génique de xénogreffes de tumeurs mammaires a permis de montrer l'existence d'une signature génique spécifique pour chaque lignée cellulaire cancéreuse qui corrèle au développement de métastases dans des organes spécifiques [3]. Dans la continuité de ces observations, notre laboratoire a réalisé une étude transcriptomique comparative entre une lignée de cancer du sein, les MDA-MB-231, et leur sous-population ostéotrope, les B02, montrant ainsi une surexpression de la voie de signalisation Slit2/Robo1/Robo4. Initialement identifiées comme facteurs de répulsion, ces protéines jouent un rôle crucial en inhibant le franchissement de la ligne médiane de façon inappropriée par des neurones [4]. Les membres de cette famille sont maintenant également identifiés comme des régulateurs clés dans de nombreux processus cellulaires dans divers tissus tels que le sein, le cœur, le poumon, les reins ou bien la rétine [5]. Ils sont aussi impliqués dans plusieurs pathologies telles que les cancers ou bien l'inflammation [6] [7] [8] [9]. Toutefois, leur rôle dans la formation de métastases osseuses est inconnu.

Cette étude avait pour objectif de déterminer si les récepteurs de guidage axonal Robo1 et 4 étaient impliqués dans la formation et le développement des métastases osseuses et de préciser à quelles étapes du développement métastatique ils intervenaient, de la dissémination à l'ancrage des cellules tumorales dans l'environnement osseux. Nous avons également étudié si ces récepteurs modifiaient l'équilibre osseux entre ostéoclastes et ostéoblastes, contribuant ainsi au maintien du cercle vicieux mis en place lors de métastases. Afin d'étudier le rôle des récepteurs Robo1 et 4 dans la formation et le développement des métastases osseuses, nous avons inhibé leur expression, dans les cellules métastatiques B02, par des stratégies de génétique inverse. L'étude *in vitro* et *in vivo* des clones ainsi obtenus a montré un rôle antagoniste des récepteurs Robo1 et Robo4: Robo1 joue un rôle anti-invasif tandis que Robo4 favorise l'invasion de la matrice osseuse par les cellules métastatiques. Nous avons également évalué la valeur pronostique de l'expression des récepteurs Robo1 et 4 dans des tumeurs mammaires humaines par analyse d'une cohorte de patientes. Une forte expression de Robo4 dans les tumeurs primaires des patientes corrèle avec un mauvais pronostic et une augmentation du risque de rechute métastatique osseuse.

Après avoir replacé ce travail dans son contexte bibliographique en présentant l'état des connaissances actuelles sur le tissu osseux, les métastases osseuses des tumeurs solides, l'implication des différents récepteurs de guidage axonal dans l'os et le rôle des récepteurs Roundabout en cancérologie, les résultats obtenus au cours des travaux de thèse ainsi que les perspectives qui en découlent seront présentés.

PARTIE II : Etat de l'art

A- Physiologie osseuse

L'os est un tissu conjonctif solidifié qui, avec le cartilage, constitue le squelette. Chez l'Homme, il est composé de 350 os chez l'enfant, puis 206 chez l'adulte, suite à la soudure de certains d'entre eux au cours de la croissance. Le tissu osseux assure différentes fonctions au sein de l'organisme. Ainsi, il supporte les structures corporelles, protège les organes internes, et facilite le mouvement du corps en conjonction avec les muscles. De plus, il constitue le site principal de l'hématopoïèse [10] joue un rôle majeur dans le métabolisme du calcium et le stockage de minéraux (phosphore et magnésium). Enfin, il peut aussi jouer un rôle de détoxification, par exemple en fixant le plomb. L'os est donc un tissu complexe, dynamique et dont la composition biochimique peut influencer le devenir des cellules cancéreuses métastatiques présentes dans cet environnement, c'est pourquoi nous nous intéressons dans un premier temps à la structure ainsi qu'à la composition de ce tissu.

1- Morphologie du tissu osseux / organisation macroscopique

1.1- Structure de l'os

D'un point de vue anatomique, il existe trois types d'os : les os longs (fémur, tibia, humérus), les os courts (vertèbres, phalanges), et les os plats (crâne, omoplates, mandibule). L'os long est constitué principalement de trois parties : la diaphyse, les épiphyses et la métaphyse (Figure 1). La diaphyse est constituée d'un tissu compact épais appelé corticale et est creusée d'un canal médullaire rempli de moelle osseuse jaune (stockage de graisse) et rouge (stockage de cellules hématopoïétiques et immunopoïétiques). Elle est entourée de deux fines membranes conjonctives : le périoste (côté externe), qui est riche en vaisseaux nourriciers participant à l'ossification en épaisseur et à la cicatrisation de l'os, et l'endoste (côté interne, le long de la cavité centrale) contenant les cellules ostéoprogénitrices et les cellules bordantes. Les épiphyses, situées aux extrémités des os longs, sont formées de tissu spongieux et sont recouvertes de cartilage articulaire. La métaphyse est la

région située entre la diaphyse et l'épiphyse. Siège de la croissance, elle est aussi appelée cartilage de croissance ou cartilage de conjugaison. Celui-ci ne s'ossifie complètement qu'à la fin de la croissance. D'un point de vue macroscopique, deux types d'architecture sont présentes dans les os longs et courts : l'os compact, dit cortical, dense, lisse et très résistant situé à l'extérieur et l'os spongieux ou trabéculaire, que l'on retrouve à l'intérieur des os, poreux et de faible résistance mécanique. Les os plats sont composés de deux couches d'os compact enfermant une couche d'os spongieux.

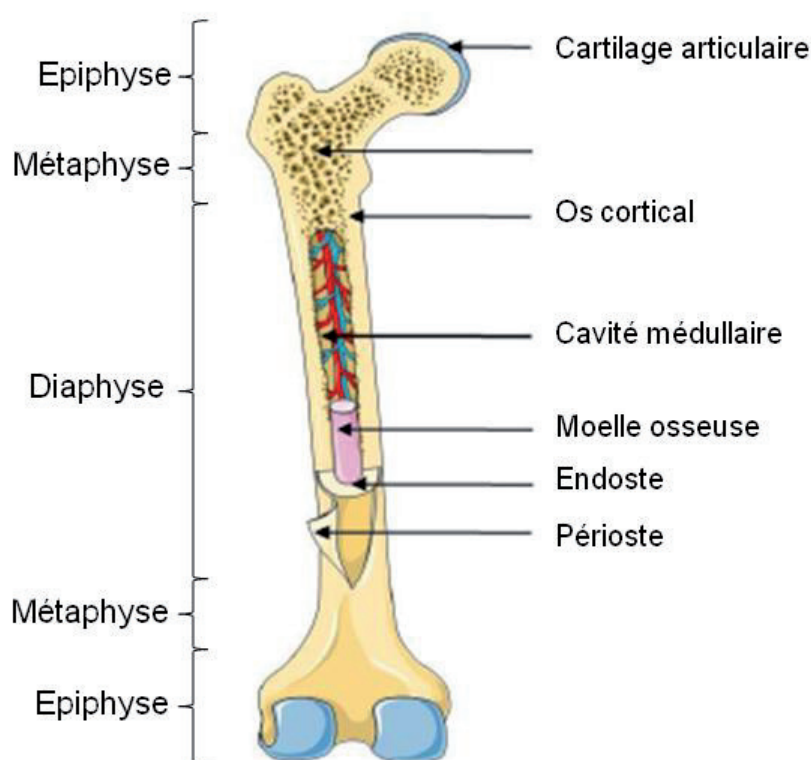


Figure 1. Structure d'un os long.

1.2- Vascularisation et innervation

La vascularisation osseuse est assurée par un réseau périphérique longeant le périoste. Les vaisseaux sanguins traversent les couches externes de l'os et le pénètrent perpendiculairement par les canaux de Volkmann, reliés entre eux par les canaux de Harvers qui parcourent l'os selon son grand axe (Figure 2). Le système artériel se compose de trois éléments : l'artère nourricière principale, les artères métaphysaires et épiphysaires ainsi que les artères périostées (Figure 3).

L'artère nourricière principale pénètre dans l'os par le trou nourricier, et parcourt l'os selon un trajet généralement oblique et caractéristique de chaque os, pour atteindre la cavité médullaire s'il s'agit d'un os long, le tissu spongieux dans les autres types d'os [11]. Cette artère se subdivise à ce niveau en deux branches, une ascendante, l'autre descendante ; chacune d'elles se ramifie en plusieurs artérioles. Elle participe ainsi à la vascularisation de la quasi-totalité du cortex diaphysaire. Les artères métaphysaires et épiphysaires pénètrent le long de la surface périostée des métaphyses et épiphyses et assurent la totalité de leur vascularisation, participant ainsi à la vascularisation médullaire [12]. Enfin, les artères périostées sont responsables de la vascularisation du cortex ; cependant, elles n'atteignent pas la partie centromédullaire.

Le retour veineux s'effectue, quant à lui, par des voies parallèles. Il prend un trajet centrifuge en se prolongeant de l'os spongieux vers la surface périostée. En effet dans l'os long le drainage se fait par un réseau se prolongeant par une ou deux petites veines satellites de l'artère nourricière et par des veines plus volumineuses passant par des trous au niveau des extrémités. Dans les os plats et courts les veines se comportent comme celles des extrémités des os longs.

Le drainage lymphatique se fait par des gaines périvasculaires en plus des capillaires lymphatiques au niveau du périoste [11], [12].

Des fibres nerveuses, myélinisées ou non provenant du système sympathique, sont également présentes dans le périoste et l'os. Les os les plus riches en fibres nerveuses sont le périoste du tibia, de la calotte crânienne ainsi que des mandibules. Ces fibres se terminent par un renflement à l'interface os-périoste mais quelques petites ramifications nerveuses isolées peuvent pénétrer dans l'os cortical par les canaux de Harvers ou les canaux de Volkmann. Les nerfs dyaphysaires pénètrent dans le canal médullaire avec les vaisseaux nourriciers tandis que les ceux de l'épiphyse passent par les canaux artériels et veineux. Quelques nerfs sont aussi présents dans l'endoste [13].

Par ailleurs, il est maintenant établi que l'os constitue un site de prédilection pour le développement de métastases de tumeurs solides telles que le cancer du sein, de la prostate ou du poumon. L'analyse radiographique et histologique de pattes métastatiques de souris injectées par voie intra-cardiaque avec des cellules de cancers de la prostate ou du sein montre un développement de métastases spécifiquement à l'os et très rarement à d'autres organes. Cette étude a démontré

que la colonisation des cellules métastatiques dans l'os est initiée à l'extrémité des artères principales (épiphysaire, métaphysaire et nourricière) et se déroule ensuite le long de ces artères majeures parcourant l'os. L'architecture vasculaire de l'os constitue donc aussi un facteur critique influençant la dissémination métastatique dans la moelle osseuse, en plus des propriétés moléculaires et cellulaires de ce microenvironnement [14].

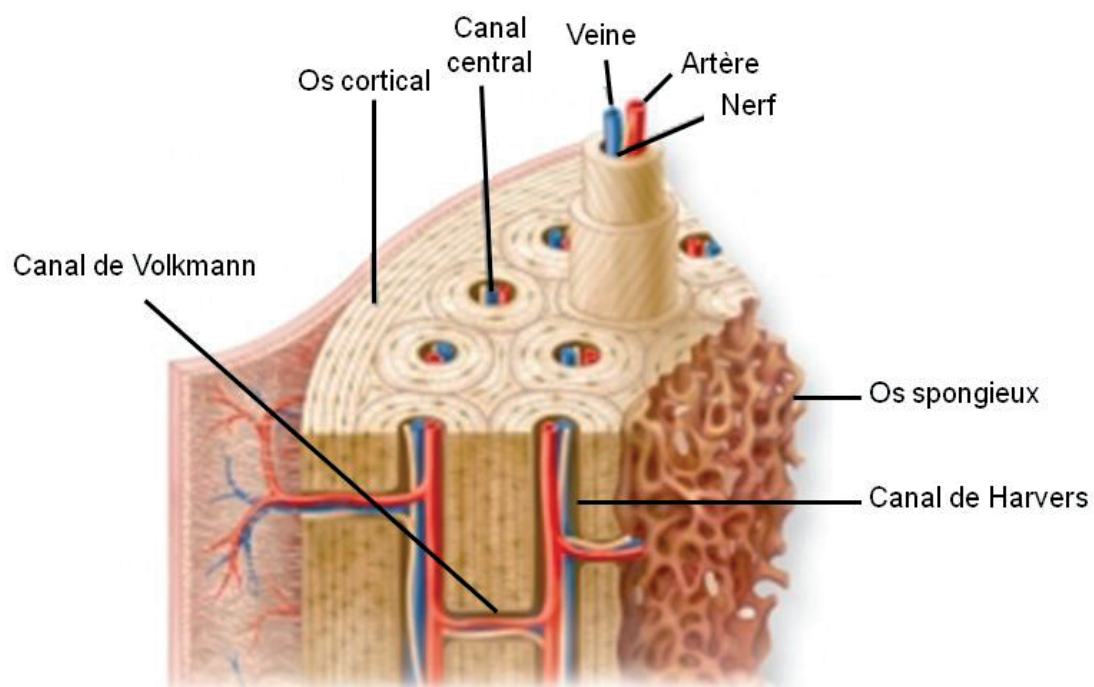


Figure 2. Architecture osseuse et vascularisation.

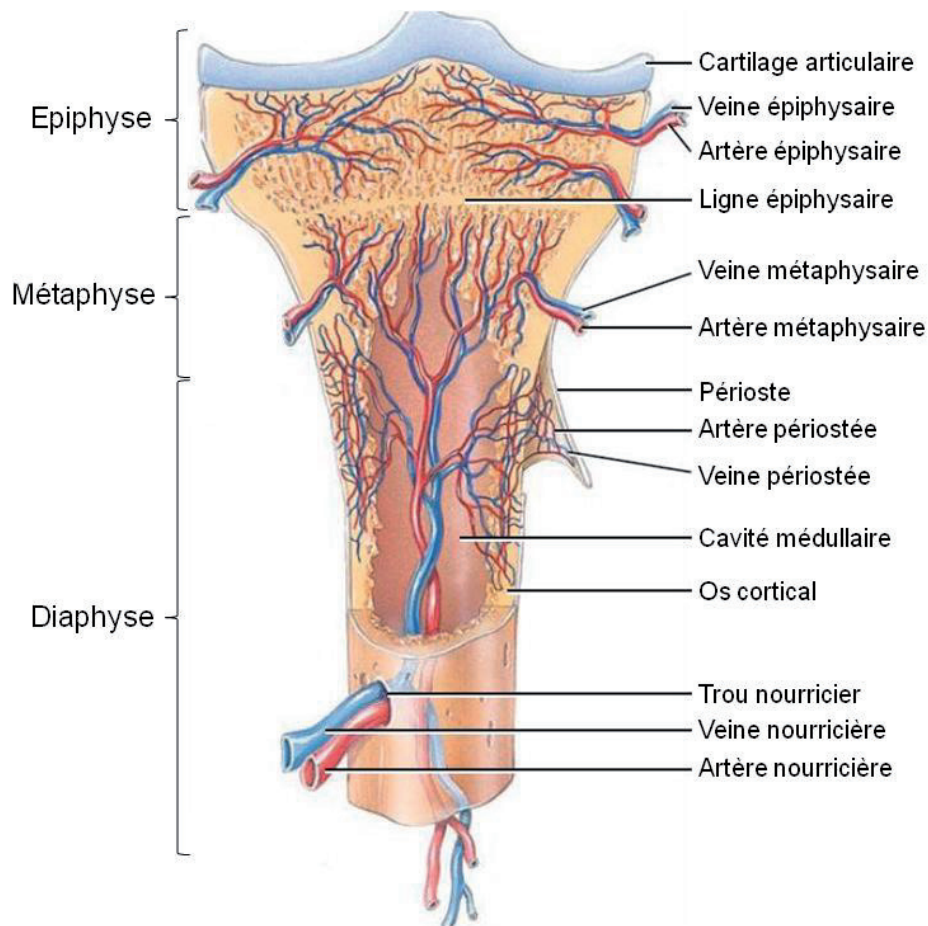


Figure 3. Représentation schématique de la vascularisation osseuse.

2- Composition du tissu osseux / organisation microscopique

Le tissu osseux est constitué de cellules (ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes) ainsi que d'une matrice extracellulaire.

2.1- La matrice extracellulaire osseuse

La matrice osseuse est différente des autres matrices de l'organisme par son aspect solide. Elle occupe entre 92 et 95 % du volume tissulaire et peut être subdivisée en fraction organique (30 %) et fraction inorganique, dite minérale (70%). Sa teneur en eau est très variable selon l'âge et le degré de minéralisation [15]. L'association de ces deux matrices, organique et inorganique, confère à l'os sa résistance et sa dureté.

2.1.1- Matrice organique

La matrice organique est composée à 90% de collagène (essentiellement collagène de type 1) et à 10% de protéines non collagéniques [16]. Les fibres de collagène forment un réseau fibreux caractéristique qui fournit l'élasticité et la flexibilité de l'os. Le stockage de cristaux d'hydroxyapatite de calcium (ou phosphate tricalcique) sur les fibres de collagène favorise la minéralisation, ce qui confère la dureté du tissu osseux. Cette matrice contient également des carbonates de calcium et des phosphates de magnésium.

L'interface entre matrice organique et inorganique est assurée par les protéines non collagéniques. Environ 25 % de ces protéines sont de nature exogène et proviennent en grande partie du sérum. Ces protéines (albumine, transferrine) se retrouvent piégées dans la matrice osseuse par leur affinité pour l'hydroxyapatite et participent à la régulation de la minéralisation osseuse. Les protéines non collagéniques restantes sont produites de façon endogène (notamment par les ostéoblastes) et sont divisées en trois catégories : les glycoprotéines, les protéoglycanes et les gla-protéines [17]. Ces protéines dotées d'un grand pouvoir osmotique, attirent et retiennent l'eau pour former des gels permettant la diffusion rapide des nutriments, métabolites et hormones entre le sang et les cellules du tissu osseux. Cette phase aqueuse est rapidement remplacée par les minéraux qui vont durcir la matrice.

	Exemple de protéines	Fonctions
Glycoprotéines	Ostéonectine	- peut réguler le dépôt d'hydroxyapatites - se lie aux facteurs de croissance, au Ca^{2+} - peut influencer le cycle cellulaire des ostéoblastes - régulateur positif de la formation osseuse
	Ostéopontine	- se lie aux cellules de l'os (OB et OC), peut réguler négativement la minéralisation, se lie au Ca^{2+} - pourrait réguler la prolifération des cellules de l'os (OB et OC)
Protéoglycanes	Décorine	- se lie au collagène et peut réguler le diamètre des fibres - se lie au $\text{TGF}\beta$ et peut réguler son activité - inhibe l'attachement des cellules à la fibronectine - se lie à la thrombospondine
Gla-protéines	Ostéocalcine	- peut réguler l'activité des OCs et leurs précurseurs - pourrait servir de signal pour l'initiation de la résorption osseuse - hormone qui régule le remodelage osseux
	Gla-protéines matricielles	- régulateur négatif de la minéralisation

Tableau 1. Fonctions principales des protéines non collagéniques de l'os.

La matrice osseuse contient également un grand nombre de facteurs de croissance dont les IGF (Insulin-like Growth Factor), le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), les BMPs (Bone Morphogenetic Protein), les $\text{TGF}\beta$ (Transforming Growth Factor β) et des interleukines. Ces protéines jouent un rôle dans le contrôle local de la formation et de la dégradation osseuse. On peut également trouver des protéases : les métalloprotéases (MMP) et leurs inhibiteurs TIMP-1 et -2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1/2) [17].

2.1.2- Matrice inorganique

La matrice osseuse inorganique est un compartiment minéral composé de petits cristaux d'hydroxyapatite de calcium sous forme de petites aiguilles et de formule générale $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Ce minéral osseux contient de nombreuses particules telles que du carbonate de calcium, du magnésium, et du phosphate d'ammonium. Le phénomène d'initiation de formation des cristaux est appelé nucléation, et se situe dans le réseau de fibres de collagène [17]. Certaines protéines

telles que l'ostéocalcine et l'ostéonectine présentent une forte affinité pour le calcium et pourraient contribuer à la minéralisation du collagène auquel elles sont associées [16].

La formation osseuse se produit soit dans le cartilage (ossification enchondrale), soit dans une matrice organique (ossification membranaire). Ainsi les os longs subissent plutôt une ossification enchondrale alors que les os plats ont une ossification plutôt membranaire [18].

Ce compartiment représente approximativement 50 à 70% de la masse osseuse adulte, il confère la rigidité mécanique de l'os et lui permet d'agir tel un réservoir pour les ions calcium, phosphate et magnésium.

2.2- Les cellules du tissu osseux

L'os est un tissu dynamique en perpétuel renouvellement. Il contient des cellules impliquées dans le renouvellement et le maintien de son architecture. On distingue alors deux catégories de cellules osseuses. Les cellules d'origine hématopoïétique qui comprennent les ostéoclastes ainsi que leurs précurseurs et les cellules d'origine mésenchymateuse présentes sous trois états physiologiques différents mais fonctionnant de façon simultanée, ce sont les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes.

A côté du tissu osseux, on distingue les cellules hématopoïétiques constituant la moelle rouge. Ces deux tissus interagissent : une lésion de la moelle induit une lésion de l'os et inversement. Ces interactions se font *via* des échanges de cytokines notamment. On parle de microenvironnement médullaire.

Enfin, l'os contient des cellules nerveuses.

2.2.1- Les cellules impliquées dans l'architecture osseuse

2.2.1.1- Ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules géantes (20 à 100 μm de diamètre), plurinuclées (2 à 50 noyaux), dérivant des monocytes sanguins. Ils sont responsables de la résorption osseuse, appelée aussi ostéoclasie. Ils possèdent de

nombreuses mitochondries et vacuoles chargées d'enzymes lysosomiales nécessaires à l'activité de résorption.

- *Ostéoclastogenèse*

Les précurseurs des ostéoclastes sont des cellules souches hématopoïétiques communes aux cellules de la lignée monocyte-macrophages. Le CFU-GM (Granulocyte Macrophage Colony Forming Unit) est le premier précurseur connu de la lignée ostéoclastique [19]. Les cellules, après initiation du processus de différenciation, quittent la moelle et migrent vers les surfaces osseuses où elles fusionnent pour former de grosses cellules multinucléées (Figure 4). L'ostéoclastogenèse est initiée et contrôlée par des facteurs synthétisés par les ostéoblastes/cellules stromales mais aussi par des interactions directes avec ces cellules. Les ostéoblastes produisent trois facteurs essentiels à ce processus de différenciation : le M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), le RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand), et l'OPG (Ostéoprotégérine) [20] [21] [22].

Le M-CSF, sécrété par les précurseurs ostéoblastiques, se lie à son récepteur CSF1R/cfms (Colony Stimulating Factor 1 Receptor) et permet alors l'engagement des précurseurs dans une voie macrophage/monocyte en stimulant leur prolifération ainsi que leur survie. Il induit également la production du récepteur RANK (Receptor Activator of NFκB) à la surface des ostéoclastes. Son ligand, RANKL, est synthétisé dans l'os par les cellules mésenchymateuses du stroma médullaire et par les ostéoblastes, et appartient à la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor). Ce second couple, RANK/RANKL, permet la différenciation des précurseurs en ostéoclastes matures et stimule aussi leur fusion ainsi que la synthèse de protéines essentielles à l'activation de la résorption osseuse telles que l'intégrine $\alpha\text{v}\beta3$, le récepteur à la calcitonine ou la cathepsine K [22]. L'OPG, membre de la famille des récepteurs du TNF, est un inhibiteur naturel du RANKL ; il constitue un récepteur leurre. L'OPG est sécrété sous forme d'une protéine soluble par les cellules de la lignée ostéoblastique. Il inhibe la différenciation, la survie et la fusion des précurseurs ostéoclastiques en inhibant l'interaction RANK/RANKL. C'est le rapport de sécrétion OPG/RANKL par les ostéoblastes qui constitue le contrôle essentiel du processus de résorption osseuse [22] [23].

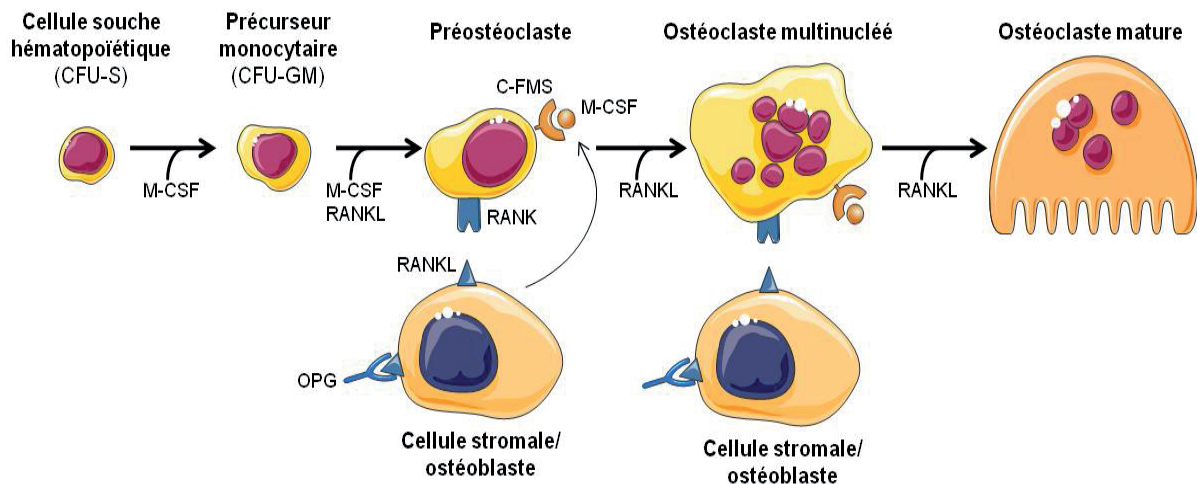


Figure 4. Etapes de l'ostéoclastogénèse.

Les ostéoclastes sont issus de précurseurs de la lignée monocyte-macrophage GFU-GM. Deux facteurs sont essentiels à leur différenciation : M-CSF et RANKL, se fixant respectivement à leur récepteur C-FMS et RANK. Ces deux facteurs hématopoïétiques sont synthétisés par les cellules du microenvironnement osseux. Les précurseurs fusionnent alors pour donner des ostéoclastes multinucléés qui se polarisent au contact de l'os pour donner des ostéoclastes matures polarisés. L'OPG, synthétisé par les ostéoblastes, joue un rôle d'inhibiteur naturel de l'ostéoclastogénèse

- *Organisation cellulaire et résorption osseuse*

L'ostéoclaste mature polarisé va subir, en réponse au RANKL, des changements de structure interne qui le préparent à la résorption osseuse, tel qu'un réarrangement du cytosquelette d'actine permettant la formation d'un anneau d'actine assurant une fine jonction entre la surface de l'os et la membrane apicale pour former ainsi un compartiment étanche appelé lacune de Howship (Figure 5). On distingue alors deux domaines dans l'ostéoclaste : d'une part le domaine apical, appelé aussi la zone claire dépourvue de tout organite et qui constitue une chambre de résorption pouvant atteindre un pH de 4.5. Elle présente une spécialisation de la membrane plasmique avec de nombreuses invaginations qui permettent une augmentation du volume de la zone de résorption. On parle de membrane ondulée, ou de « ruffled border ». Au niveau de cette zone, les ostéoclastes expriment également différentes protéines membranaires telles que l'intégrine $\alpha\beta3$ qui reconnaît une protéine non collagénique de la matrice osseuse, l'ostéopontine (OPN) permettant alors une forte adhésion de l'ostéoclaste à la travée osseuse [24]. D'autre

part, le pôle baso-latéral présente un cytoplasme chargé de très nombreuses vacuoles, de vésicules et de lysosomes qui contiennent des enzymes capables de détruire la matrice osseuse minéralisée.

La résorption osseuse se déroule en trois étapes. Premièrement, les ostéoclastes matures, une fois fixés à la matrice osseuse, vont déminéraliser et décalcifier l'os *via* des pompes à protons ATPasiques qui expulsent les ions H^+ vers la chambre de résorption et l'acidifie, permettant ainsi la solubilisation des cristaux d'hydroxyapatite [25].

Dans un deuxième temps, les ostéoclastes vont dégrader la matrice osseuse déminéralisée *via* un processus d'hydrolyse. En effet, des enzymes hydrolytiques d'origine lysosomiales telles que la cathepsine K et la Phosphatase Acide Tartrate Résistance (TRAP), dont le fonctionnement est optimal à pH acide, sont sécrétées. Des métalloprotéases actives à pH optimal neutre sont également sécrétées et participent à la dégradation totale de la matrice. Les produits de dégradation sont ensuite évacués par transcytose dans la zone basolatérale. Il a été suggéré que la cathepsine K peut être internalisée avec les produits de dégradation de la matrice, puis fusionnée avec une vésicule contenant la TRAP. L'activation de la TRAP par clivage en TRAP 5b dans les vésicules d'endocytose conduit à la production de dérivés oxygénés finalisant la dégradation de la matrice [26].

Enfin, lors de la dernière étape du processus de résorption osseuse, la calcitonine se fixe sur les récepteurs exprimés à la surface des ostéoclastes, entraînant ainsi une rétraction cellulaire et permettant leur détachement [25].

Un ostéoclaste peut creuser jusqu'à une profondeur de 40 μm .

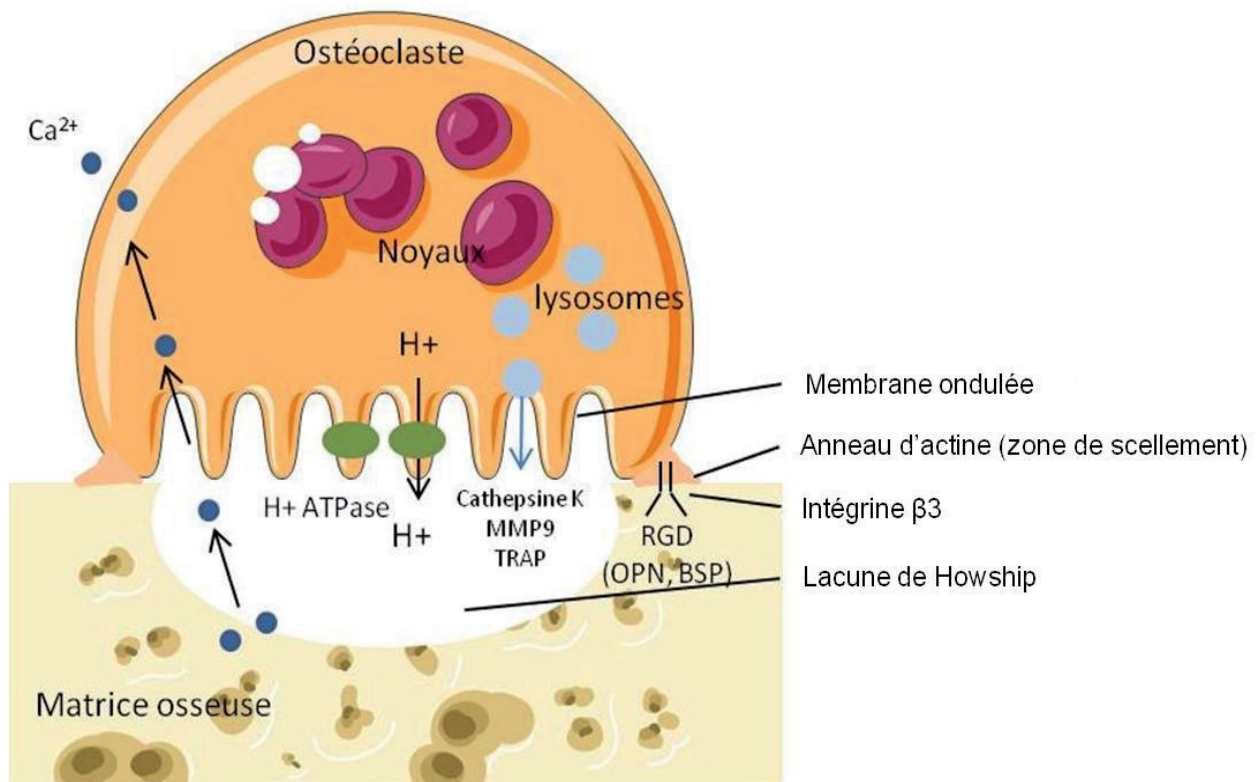


Figure 5. Représentation schématique du mécanisme de résorption osseuse par un ostéoclaste.

L'ostéoclaste mature se fixe à la matrice osseuse via l'interaction de l'intégrine $\alpha\beta 3$ exprimée par l'ostéoclaste, avec le motif RGD porté par les protéines matricielles. Il se forme ainsi une zone scellée, la lacune de Howship, dans laquelle la cellule libère des protons H^+ qui acidifient le compartiment et induisent une déminéralisation de la matrice osseuse ; les ostéoclastes libèrent ensuite des enzymes spécifiques (cathepsine K, métalloprotéinases, TRAP) qui dégradent la trame collagénique de l'os.

2.2.1.2- Ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la synthèse de la matrice osseuse qui mesurent de 20 à 30 μm de diamètre. Les ostéoblastes matures sont des cellules mononucléées, cuboïdes, polyédriques et polarisées.

• Ostéoblastogenèse

Les pré-ostéoblastes sont issus de la division de cellules souches mésenchymateuses localisées dans la moelle osseuse [27]. L'orientation des cellules

mésenchymateuses constitue la première étape de l'engagement vers la lignée ostéoblastique, suivie d'une importante étape de multiplication cellulaire associée à l'expression de gènes précoces comme le facteur de transcription Runx2/cbfa-1 (Runt-Related Transcription Factor 2). Runx2, qui joue un rôle clé dans l'ostéoblastogenèse, permet directement la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en pré-ostéoblastes, et indirectement en régulant l'expression d'un autre facteur de transcription : Ostéix (Osx), qui permet la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes immatures (Figure 6) [28]. Ce dernier est également régulé par la β -caténine par l'intermédiaire de la voie Wnt. Les protéines Wnt activent la voie intracellulaire de la β -caténine, en inhibant sa phosphorylation et donc sa dégradation, *via* leur liaison à un récepteur de la famille Frizzled. La β -caténine, qui est un facteur de transcription, peut ainsi entrer dans le noyau et activer des gènes spécifiques, notamment celui codant Osx [28] [29]. Par ailleurs, la β -caténine peut également augmenter l'activité du promoteur Runx2 et ainsi accroître son expression [28].

Runx2 est également régulé positivement par certaines BMP produites par les ostéoblastes [30], mais aussi par le TGF β , PTH (Hormone Parathyroïdienne) et FGFs (Fibroblast Growth Factor) [31]. Il a aussi été décrit que les facteurs de transcription de la famille AP-1, tel que c-fos, jouent un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération cellulaire au cours des phases précoces de la différenciation ostéoblastique, et par conséquent dans la formation osseuse [28]. Dlx5 (Distal-less homeobox 5) et MSX2 (Msh homeobox) régulent également positivement l'engagement des ostéoblastes dans le processus de différenciation. Toutefois le rôle précis de MSX2 est très controversé, d'autres études montrant qu'il inhibe cette différenciation ostéoblastique. L'expression du facteur de transcription Twist est associée à une inhibition de la prolifération et de la différenciation ostéoblastique. En effet, il est capable d'interagir directement avec Runx2 et d'inhiber sa fonction. Cependant, la coopération de Twist avec MSX2 peut promouvoir la différenciation ostéoblastique [28].

Enfin, Runx2, à des niveaux élevés, peut inhiber le processus de maturation des ostéoblastes, exerçant ainsi un rétrocontrôle négatif [31].

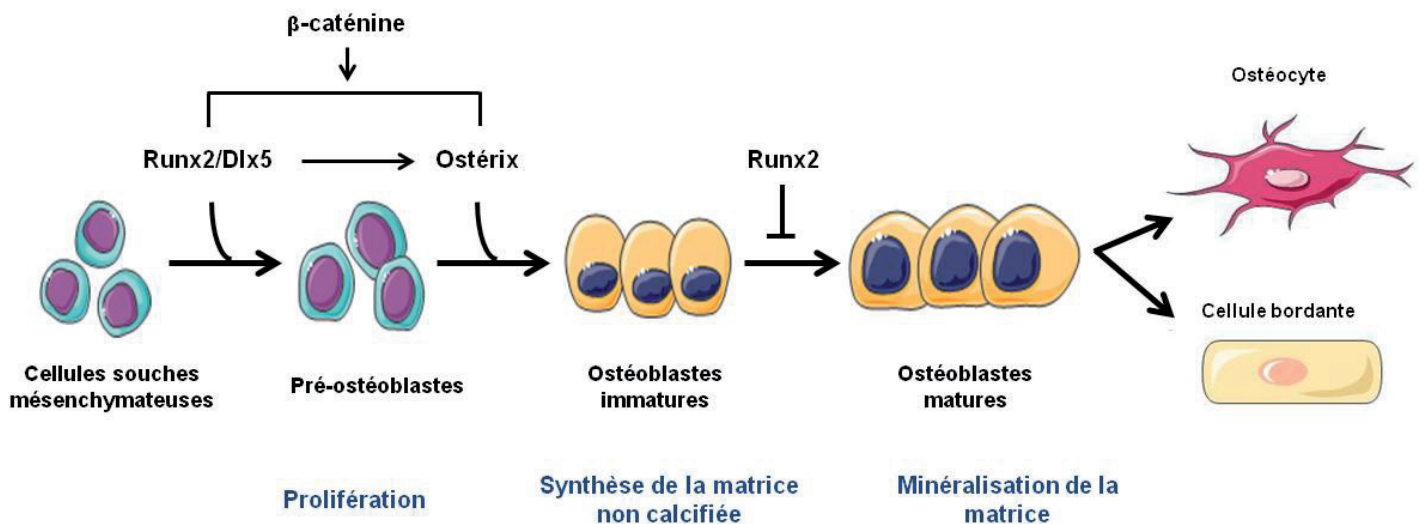


Figure 6. Etapes de la différenciation ostéoblastique.

L'action conjointe de différents facteurs comme la β -caténine, Runx-2 et Ostérix sur les cellules ostéoprogénitrices induit la différenciation d'ostéoblastes matures capables de synthétiser de l'os.

- *Organisation cellulaire et ostéogenèse*

Les ostéoblastes matures sont des cellules polarisées localisées à la surface de l'os en croissance, encore non minéralisé et appelé ostéoïde, [32] dont la fonction est de synthétiser et de minéraliser la matrice osseuse collagénique. Le noyau excentré est situé au pôle basal et la membrane présente quelques modifications structurales associées à la polarité cellulaire. En effet, la membrane en contact avec l'os en formation se trouve hérissée d'un nombre important de prolongements cytoplasmiques qui peuvent s'étendre profondément dans l'ostéoïde, permettant ainsi le contact des ostéoblastes avec d'autres cellules. La membrane située au pôle opposé, quant à elle, possède peu d'expansions. Les ostéoblastes forment un tapis de cellules jointives, disposées de façon pseudo-épithéliale, et communiquent entre eux *via* des jonctions communicantes : les jonctions « Gap ». Ces dernières permettent le passage d'ions et de petites molécules. Le cytoplasme des ostéoblastes est riche en organites (au pôle apical) impliqués dans la synthèse protéique, tels qu'un appareil de Golgi très développé, un important réticulum endoplasmique, de nombreuses mitochondries ou vésicules de sécrétion [18].

L'ostéogénèse comporte deux étapes : la sécrétion de la matrice ostéoïde, puis la minéralisation proprement dite.

Lors de la première phase, les ostéoblastes différenciés produisent les éléments de la matrice organique sous l'action de Runx-2 [33]. Ils sécrètent alors des facteurs de croissance tels que le TGF β , l'IGF et des BMP [30]. Ces derniers vont activer en retour la sécrétion, par les ostéoblastes, de collagène de type I et de protéines non collagéniques telles que l'ostéocalcine, l'ostéopontine, l'ostéonectine ou la BSPII (Bone Sialoprotein II) mais aussi de protéoglycanes tels que la décorine ou le biglycan qui composeront la matrice ostéoïde non minéralisée [34]. Un ostéoblaste produit 2 μm^3 de matrice par jour qui s'accumule couche après couche pour former une bande de 10 à 15 μm .

Lors de la seconde phase, les ostéoblastes contrôlent la minéralisation de la matrice néoformée. La dureté du tissu osseux est due à la présence de sels minéraux dans la matrice ostéoïde et plus particulièrement de calcium et d'hydroxyde de phosphate qui précipitent pour former des cristaux d'hydroxyapatite, qui se fixent entre et sur les fibres de collagène assurant ainsi la minéralisation de la matrice. L'initiation de ce processus s'appelle la nucléation. Toutefois, la formation de ces cristaux n'est possible que si les concentrations en ions Ca^{2+} et PO_4^- atteignent un certain seuil. Ceci est possible, d'une part, *via* la sécrétion d'ostéocalcine, par les ostéoblastes, capable de capter les ions Ca^{2+} extracellulaires et par conséquent permet d'augmenter la concentration locale. D'autre part, les ostéoblastes génèrent des vésicules matricielles riches en phosphatases alcalines (ALP) qui permettent l'accumulation d'ions Ca^{2+} et PO_4^- ainsi que de pyrophosphatases capables de cliver les ions PO_4^- à partir de molécules plus grosses [35].

Une fois le dépôt de la matrice osseuse terminé, les ostéoblastes peuvent emprunter trois voies différentes : soit ils restent en surface et diminuent leur activité synthétique pour devenir des cellules bordantes tapissant la surface de l'os, soit ils se laissent emprisonner dans la matrice calcifiée pour devenir des ostéocytes, soit ils meurent par apoptose (Figure 6) [34].

2.2.1.3- Ostéocytes

Les ostéocytes sont des ostéoblastes différenciés (10 à 20 % des ostéoblastes se différencient en ostéocytes), incapables de se diviser et entièrement entourés de matrice osseuse minéralisée (Figure 7). Ce sont les cellules les plus abondantes de l'os ; ils constituent en effet, 90 % des cellules osseuses adultes [36]. Les ostéocytes sont plus petits que les ostéoblastes et siègent dans un système de cavités interconnectées, les ostéoplastes, d'où partent des canalicules contenant leurs nombreux prolongements cytoplasmiques, fins, reliés entre eux par des jonctions communicantes. Ces canalicules reliés forment un réseau dans lequel circule un fluide extracellulaire. Les ostéocytes sont des mécano-senseurs capables de percevoir les contraintes mécaniques exercées sur l'os. Ils détectent en effet l'écoulement du fluide extracellulaire assurant ainsi la transduction des signaux de contraintes mécaniques, subies par l'os, aux cellules en surface. Ainsi, il a été montré qu'une pression mécanique entraînant un déplacement du fluide dans les canalicules provoque une sécrétion de prostaglandines et de calcium, ce qui favorise l'action des ostéoclastes. Cependant il a également été montré que cette pression mécanique peut permettre une sécrétion d'OPG, un antagoniste de RANKL qui inhibe la destruction osseuse [37].

Les ostéocytes participent également au maintien de la matrice osseuse, de l'homéostasie de la calcémie et du phosphate, et participent à l'activité des ostéoclastes. En effet, les ostéocytes sécrètent du RANKL ainsi que du MCS-F, tous deux impliqués dans la différenciation ostéoclastique. Par ailleurs, ils peuvent aussi produire de la sclérostine et les protéines de la famille DKK (Dickkopf protein), inhibant ainsi la formation osseuse. Les ostéocytes participent donc au maintien de l'architecture osseuse [36].

Enfin, les ostéocytes peuvent rester de longues périodes (jusqu'à plusieurs années) dans les lacunes ; cependant l'observation de lacunes vides dans l'os âgé suggère qu'ils peuvent être éliminés par apoptose. Ce mécanisme s'accompagne le plus souvent d'un remodelage osseux [38]. Ils peuvent également être lysés au cours de la résorption osseuse par les ostéoclastes.

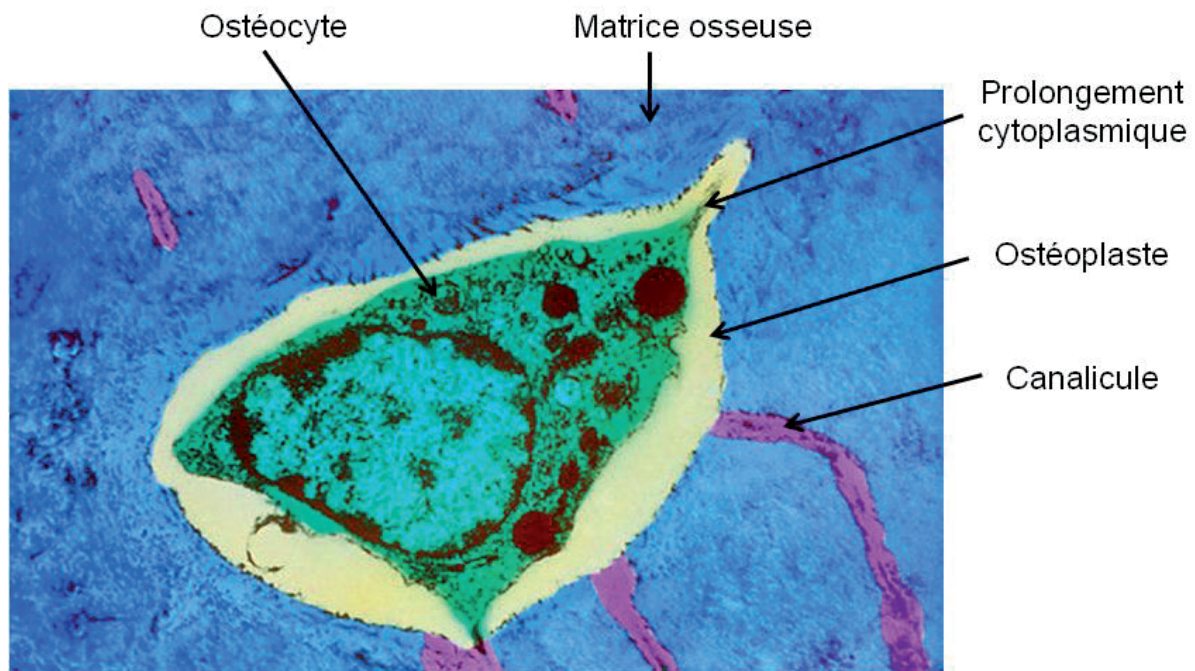


Figure 7. Ostéocyte humain visualisé par microscopie à électronique à transmission.

2.2.2- Autres types cellulaires

2.2.2.1- Cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont les précurseurs de toutes les lignées cellulaires sanguines, incluant les cellules immunes. Elles sont localisées au sein de la moelle osseuse, au niveau de microenvironnements appelés des « niches » qui assurent leur maintien, survie, prolifération et différenciation afin de maintenir un nombre stable de cellules sanguines matures, tout au long de la vie.

Une niche hématopoïétique osseuse comprend les MSCs (Mesenchymal Stem Cells) qui sécrètent des facteurs de maintien pour les HSC, des ostéoblastes dérivés des MSCs et présents à la surface de l'os, ainsi qu'une matrice extracellulaire qui supporte l'expansion et l'activité des HSC. Cet environnement va permettre de moduler le destin de chaque HSC : quiescence, apoptose, migration, renouvellement cellulaire ou bien génération d'une cellule hématopoïétique progénitrice (HPC). Basés sur la différence de prolifération entre les populations d'HSC, deux modèles de niches ont été proposés : la niche endostéale, qui contrôle la quiescence des HSC, et la niche vasculaire (au centre de la cavité osseuse) qui permet l'auto-renouvellement des HSC.

Les HSC sont attachées dans cette niche *via* différentes interactions avec une grande variété de molécules d'adhésion. La perturbation d'une de ces interactions avec la niche peut conduire à une libération des HSC et leur passage de la moelle osseuse vers la circulation sanguine périphérique. Ce processus est appelé mobilisation des cellules souches sanguines périphériques et a été exploité notamment pour collecter les HSPC (HSC et HPC) mais aussi plus largement lors de transplantations. En effet, cette mobilisation est associée à une meilleure prise de greffe et une réduction des complications infectieuses. Actuellement, le G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor), le G-MSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) et un antagoniste de CXCR-4 (plerixafor) sont les seuls agents de mobilisation des HSC approuvés par l'Administration de la Nourriture et des Drogues [39] [40].

Différents mécanismes clés ont été mis en évidence concernant cette mobilisation des HSC suite à un traitement par le G-CSF :

- *Interactions cellulaires / adhésions moléculaires*

L'interaction du récepteur CXCR4 (Chemokine C-X-C motif Receptor 4) avec son ligand SDF1 α (Stromal cell-Derived Factor 1 α), connu aussi sous le nom de CXCL12 (Chemokine C-X-C motif Ligand 12), est le mécanisme, de maintien et de contrôle du trafic des HSPC dans la niche endostéale, le plus étudié. Des études par ciblage de gènes ont révélé que cette interaction est essentielle : les HSPC exprimant CXCR4 sont chémo-attirées et retenues dans la niche, *via* leur interaction avec le SDF1 α produit par les cellules stromales, plus précisément par les ostéoblastes, les cellules CAR (CXCL12-Abundant Reticular cells) et les MSC nestin⁺. Ces dernières, nommées aussi cellules SNO (Spindle-shaped N-cadherin⁺CD45⁻ Osteoblastic), sont en contact avec les cellules bordantes. Une déplétion sélective de ces cellules exprimant la nestin, protéine des filaments intermédiaires, originellement identifiée comme un marqueur des progéniteurs neuronaux, a permis de démontrer leur rôle essentiel dans le maintien du nombre d'HSC, notamment en retenant ces cellules dans la moelle osseuse. La déplétion des cellules CAR, productrices majeures de la chémokine CXCL12, conduit à la mise en évidence d'un rôle important dans le maintien des HSC dans un état prolifératif et

indifférencié. Les cellules endothéliales hors de la moelle osseuse, participeraient également au maintien de ces HSC, *via* la sécrétion de la protéine SCF (Stem Cell Factor) liant le récepteur CD117 et présentant un rôle important dans la survie, la prolifération et la différenciation des HSPC [41]. La majorité des HSC est en contact avec les cellules CAR, qui entourent les sinus de cellules endothéliales, tandis qu'une faible proportion est en contact avec les cellules SNO qui constituent une niche pour les HSC (Figure 8). Cependant, les interactions entre ces cellules CAR et SNO restent à éclaircir.

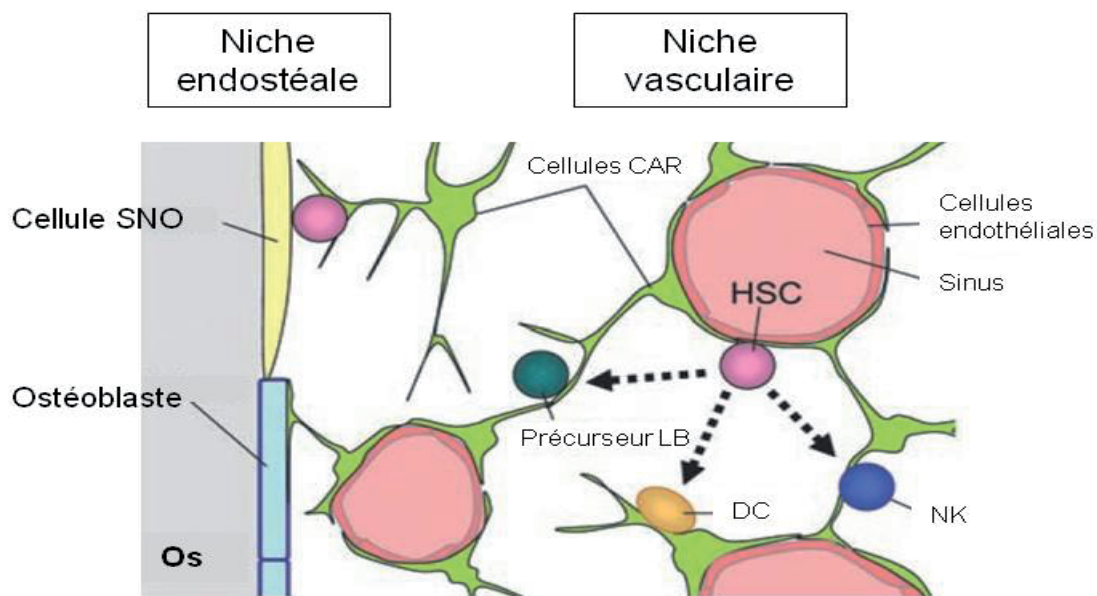


Figure 8. Interactions des cellules souches hématopoïétiques (HSC) favorisant leur maintien dans la niche osseuse.

Les HSC peuvent interagir avec les cellules CAR, producteur majeur de CXCL12, les cellules SNO, produisant de la N-cadhérine et nestin, et les ostéoblastes. Par l'intermédiaire des cellules CAR, les HSC peuvent aussi interagir avec les précurseurs des lymphocytes B, les cellules dendritiques (DC) et les natural killers (NK) [41].

Les ostéoblastes expriment également VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) capable de se lier à VLA-4 (Very Late Antigen 4). L'utilisation d'anticorps dirigés contre VCAM-1 ou VLA-4, ainsi que d'une molécule inhibitrice de VLA-4, BIO5192, induit une mobilisation des HSPC. De plus, la perturbation de l'axe de signalisation Eph-ephrin A3, *via* une protéine de fusion EphA3-Fc, mobilise aussi les HSPC. L'ostéopontine est également un régulateur négatif des HSPC dans la niche :

elle permet leur adhésion *via* les intégrines $\beta 1$ telles que VLA-4. Ces différentes interactions jouent donc aussi un rôle important dans le maintien de ces HSPC dans la niche endostéale [39]. La diminution de la sécrétion de différents facteurs par les ostéoblastes, en réponse au G-CSF, s'explique par une augmentation de l'apoptose ostéoblastique ainsi que par la déformation de ces cellules ; elles passent d'un aspect cuboïde à un état aplati. Cette diminution d'expression des molécules de rétention est alors associée à une mobilisation des HSPC.

- *Rôle des macrophages*

Le G-CSF peut également induire une perte rapide des ostéoblastes endostéaux, visualisée par un arrêt de la formation de l'os endostéal. Étonnamment, cette déplétion d'ostéoblastes est accompagnée d'une perte des macrophages de la moelle osseuse, plus précisément, des macrophages endostéaux appelés ostéomacs, ainsi que d'une autre lignée particulière de macrophages phagocytaires. La perte de ces macrophages suffit à supprimer les ostéoblastes endostéaux, ce qui induit une perte des cytokines ostéoblastiques au niveau de l'endostéum, permettant ainsi la mobilisation des HSPC dans le sang périphérique. Le rôle précis de ces 2 types de macrophages dans le maintien des HSPC ainsi que les mécanismes par lesquels ils régulent la niche restent à élucider [40].

- *Rôle des ostéoclastes*

Le rôle des ostéoclastes dans la mobilisation des HSPC, en réponse au G-CSF, est très controversé. Winkler *et al* ont démontré que ni le nombre d'ostéoclastes, ni la transcription de la cathepsine K, n'étaient augmentés durant l'initiation de la mobilisation des HSPC en réponse au G-CSF. Cette augmentation apparaît ensuite, lorsque la mobilisation est finie [40]. Cependant, Kollet *et al* ont suggéré un rôle des ostéoclastes dans cette mobilisation et proposent un modèle dans lequel la balance entre ostéoblastes et ostéoclastes serait requise pour maintenir cette homéostasie. Le rôle des ostéoclastes a été démontré en administrant du RANKL à des souris, qui présentent alors une augmentation de l'activité ostéoclastique, suivie d'un accroissement modéré de la mobilisation des

HPC. L'importance des ostéoclastes dans la mobilisation des HSPC en réponse au G-CSF demeure non élucidée [39].

- *Mobilisation des HSPC via la régulation de l'oxygène*

La niche hématopoïétique de la moelle osseuse a été démontrée comme étant hypoxique. De plus, les HSPC résidant en condition hypoxique présentent une meilleure capacité de repopulation que ceux n'étant pas en hypoxie. Une réponse physiologique connue à l'hypoxie est la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α), qui augmente la production de l'érythropoïétine, du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ainsi que l'expression de nombreux gènes impliqués dans prolifération et la survie cellulaire. Il a été suggéré que les conditions hypoxiques de la moelle osseuse stabilisent l'activité de l'HIF-1 α et par conséquent le maintien des HSPC. HIF-1 α favorise la production de CXCL12 ainsi que de son récepteur CXCR4. Il permet aussi d'empêcher les dommages sur les HSPC causés par les espèces dérivées de l'oxygène. L'hypoxie permet donc de maintenir une plus longue durée de vie des HSPC dans la niche [39].

- *Rôle du récepteur Robo4*

Robo4 est un récepteur, initialement impliqué dans le guidage axonal, et qui appartient à la famille des protéines ROBO (Roundabout). Récemment, il a été démontré que Robo4 coopère avec CXCR4 pour maintenir les HSC dans la niche osseuse. En effet, l'absence de Robo4 dans les HSC induit une perte de la localisation de ces cellules au sein de la niche. CXCR4, un régulateur crucial de la localisation des HSC, est alors surexprimé afin de compenser l'absence de Robo4. De plus, CXCR4 est présent dans de nombreux types cellulaires, notamment dans le cerveau, tandis que l'expression de Robo4 est limitée aux HSC et aux cellules endothéliales. Par conséquent, Robo4 semble être une meilleure cible thérapeutique pour la mobilisation des HSC [42].

2.2.2.2- Cellules nerveuses

Il existe une interaction dynamique entre la niche de la moelle osseuse et le système nerveux. En effet, la niche endostéale contient, en plus des ostéoblastes, des MSC et de la matrice extracellulaire, des fibres nerveuses sympathiques qui coordonnent les réponses systémiques et les données du système nerveux central. La mobilisation des HSPC, en réponse au G-CSF, requière des signaux $\beta 2$ -adrénergiques périphériques. De plus, l'atténuation de la fonction des ostéoblastes, en réponse au G-CSF, peut avoir lieu *via* le système nerveux sympathique ; il en résulte alors un changement de phénotype des ostéoblastes qui paraissent aplatis. Les signaux provenant du système nerveux peuvent agir directement sur les HSC par l'intermédiaire des récepteurs $\beta 2$ -adrénergique et de la dopamine qui sont surexprimés en réponse au G-CSF. Les neurotransmetteurs servent alors de chémoattractants pour les HSPC favorisant ainsi leur maintien dans la niche ; un traitement avec de la norépinephrine résulte alors dans la mobilisation de ces HSPC. Cette molécule peut aussi augmenter l'expression du récepteur CXCR4, suggérant alors que les signaux adrénergiques peuvent affecter directement la voie de signalisation CXCR4/SDF-1 α dans les HSPC.

Par ailleurs, le système nerveux peut aussi réguler le trafic des HSPC via un rythme circadien. En effet, les stimulations *via* les récepteurs $\beta 3$ -adrénergiques induisent une sécrétion de la norépinephrine selon des oscillations circadiennes, ainsi qu'une production de CXCR4 et de SDF-1 α conduisant à une sortie rythmée des HSPC de la niche endostéale. Ainsi, la mobilisation des HSPC diffère dans le temps selon les espèces : une mobilisation optimale a lieu chez les souris le matin tandis que chez l'Homme, ce pic apparaît en fin de soirée.

Il a également été démontré que les signaux $\beta 2$ -adrénergiques augmentent le récepteur à la vitamine D (VDR) présent sur les ostéoblastes, dont l'expression est nécessaire pour la suppression de la fonction des ostéoblastes en réponse au G-CSF. Un KO de ce récepteur chez les souris réduit la mobilisation des HSPC. Ce récepteur est aussi régulé de manière circadienne [39].

Dans une récente étude, il a été démontré que des cellules de Schwann non-myélinisantes, un type de cellules gliales s'enroulant autour des fibres nerveuses dans la moelle osseuse, notamment autour du nerf autonome, constituent un

nouveau composant fonctionnel important de la niche hématopoïétique. Ces cellules sont importantes pour maintenir les HSC en dormance. Dans la niche, le TGF- β est présent sous forme inactif piégé dans le complexe LLC (Large Latent Complex) dans lequel la protéine LAP (Latency-Associated Protein) le séquestre. La protéine LTBP-1 (Latent TGF- β Binding Protein-1) permet l'attachement du complexe LLC à la matrice extracellulaire. La cellule de Schwann, provenant du système nerveux périphérique, constitue une source majeure de TGF- β actif dans la moelle osseuse, qui en se liant à son récepteur présent sur les HSC, induit une cascade de réactions conduisant à la dormance des HSC. En effet, la cellule de Schwann est capable de cliver le complexe LLC, *via* l'interaction de son intégrine $\alpha\beta 8$ avec ce complexe et des MMP (Matrix MetalloProteinase), afin de libérer le TGF- β [43].

Dans une autre étude, le nerf autonome a été retiré. Cette ablation a conduit à une perte des cellules de Schwann ainsi qu'à une forte diminution du nombre d'HSC dans la niche osseuse. Ces cellules sont donc bien des composants importants de la niche osseuse permettant la quiescence des HSC *via* l'activation du TFG- β latent [44].

3- Le remodelage osseux

L'os est un tissu dynamique, en constant renouvellement durant toute la vie de chaque individu grâce au processus de remodelage osseux. Chez l'adulte, 10% du squelette sont renouvelés chaque année. Ce processus physiologique est nécessaire pour la substitution de l'os primaire infantile en os secondaire qui est plus résistant. Il est aussi nécessaire pour ôter les micro-fractures, renouveler l'os âgé, et garantir une homéostasie calcique correcte. Le remodelage osseux repose sur une balance correcte entre résorption osseuse, réalisée par les ostéoclastes, et dépôt d'os par les ostéoblastes. Ces fonctions sont étroitement couplées non seulement quantitativement, mais aussi dans le temps et l'espace [31]. Ce remodelage dure environ 4 mois ; l'étape de résorption osseuse étant d'environ 3 semaines, celle de formation, plus longue, s'étend environ 3 mois mais peut durer jusqu'à 6 mois [15] [16].

3.1- Processus du remodelage osseux

Le remodelage osseux se déroule au niveau d'unités fonctionnelles appelées BMU (Basic Multicellular Unit) [34]. Le résultat du travail d'une unité fonctionnelle de remodelage (résorption puis formation) est une unité structurale appelée ostéon. Ce processus comprend quatre étapes [31], [34] (Figure 9) :

- La phase d'activation, est une étape d'initiation qui correspond au recrutement des précurseurs ostéoclastiques à la surface de l'os, qui sont ensuite différenciés et activés afin de résorber l'os. Cette phase débute suite à des micro-fractures ou bien des altérations mécaniques de l'os repérées notamment par les ostéocytes qui vont alors sécréter dans le microenvironnement osseux des facteurs tels que l'IGF-I, le $TNF\alpha$, la PTH (Parathormone) ou l'IL6. En réponse à ces facteurs, les cellules bordantes sécrètent des chémokines telles que MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) et CXCL12, qui permettent le recrutement des précurseurs ostéoclastiques. Ces derniers produisent alors la MMP9 (Matrix Metalloproteinase 9) qui va dégrader la matrice environnante et permettre leur migration vers l'os. Les ostéoblastes et ostéocytes produisent ensuite du RANKL qui se fixe sur les récepteurs RANK des pré-ostéoclastes permettant ainsi leur différenciation en ostéoclastes multinucléés.
- Lors de la phase de résorption, les ostéoclastes subissent une étape de polarisation et amorcent le processus de résorption osseuse. Comme décrit précédemment (paragraphe 2.2.1.1 ostéoclastes), cette fonction requiert l'acidification du milieu osseux pour dissoudre les composants inorganiques et le relargage d'enzymes lysosomiales pour détruire la matrice organique.
- La phase de réversion (qui dure environ 9 jours chez l'Homme) correspond à l'arrêt progressif des ostéoclastes, probablement par apoptose. De plus, des « cellules de réversion », appelées aussi « ostéoMacs », apparaissent. Elles s'intercalent entre les cellules bordantes à la surface de l'os. Leur rôle n'est

pas encore connu, cependant de par leur ressemblance avec des macrophages, un rôle d'élimination des débris de la matrice osseuse leur est attribué. Un autre rôle serait la production de facteurs permettant l'inhibition des ostéoclastes et/ou la stimulation des ostéoblastes. Ces macrophages sont donc des cellules sentinelles au sein du tissu osseux qui sont capables de moduler le couple canonique « ostéoclastes/ostéoblastes », participant ainsi à la coordination de la dynamique osseuse [45].

De plus, les ostéoclastes matures vont activer la différenciation des pré-ostéoblastes par contact cellule-cellule, *via* l'interaction entre l'éphrine B2 et son récepteur EphB4, exprimés respectivement par les ostéoclastes et les ostéoblastes. Cette interaction conduit aussi à l'inhibition de l'ostéoclastogenèse [46]. Par ailleurs, la résorption osseuse a conduit à la libération de facteurs de croissance comme le TGF β , les BMPs, l'IGF et le PDGF qui vont activer les ostéoblastes. Pendant cette étape, les ostéoblastes vont aussi produire de l'OPG qui inhibe la différenciation ostéoclastique finissant ainsi de stopper la résorption.

- Lors de la phase de formation / quiescence, les ostéoblastes mature recrutés synthétisent la nouvelle matrice osseuse non calcifiée (ostéoïde) dans un premier temps, puis la minéralisent ensuite. Cette étape complète alors le remodelage osseux. Les ostéoblastes restants sont ensuite soit éliminés par apoptose, soit emprisonnés dans la matrice pour devenir des ostéocytes, soit encore deviennent quiescents formant ainsi les cellules bordantes à la surface de l'os, jusqu'au cycle de remodelage suivant. Lors de la phase de quiescence, les ostéocytes produisent alors de la sclérostine qui inhibe la formation de l'os en induisant l'apoptose des ostéoblastes [47].

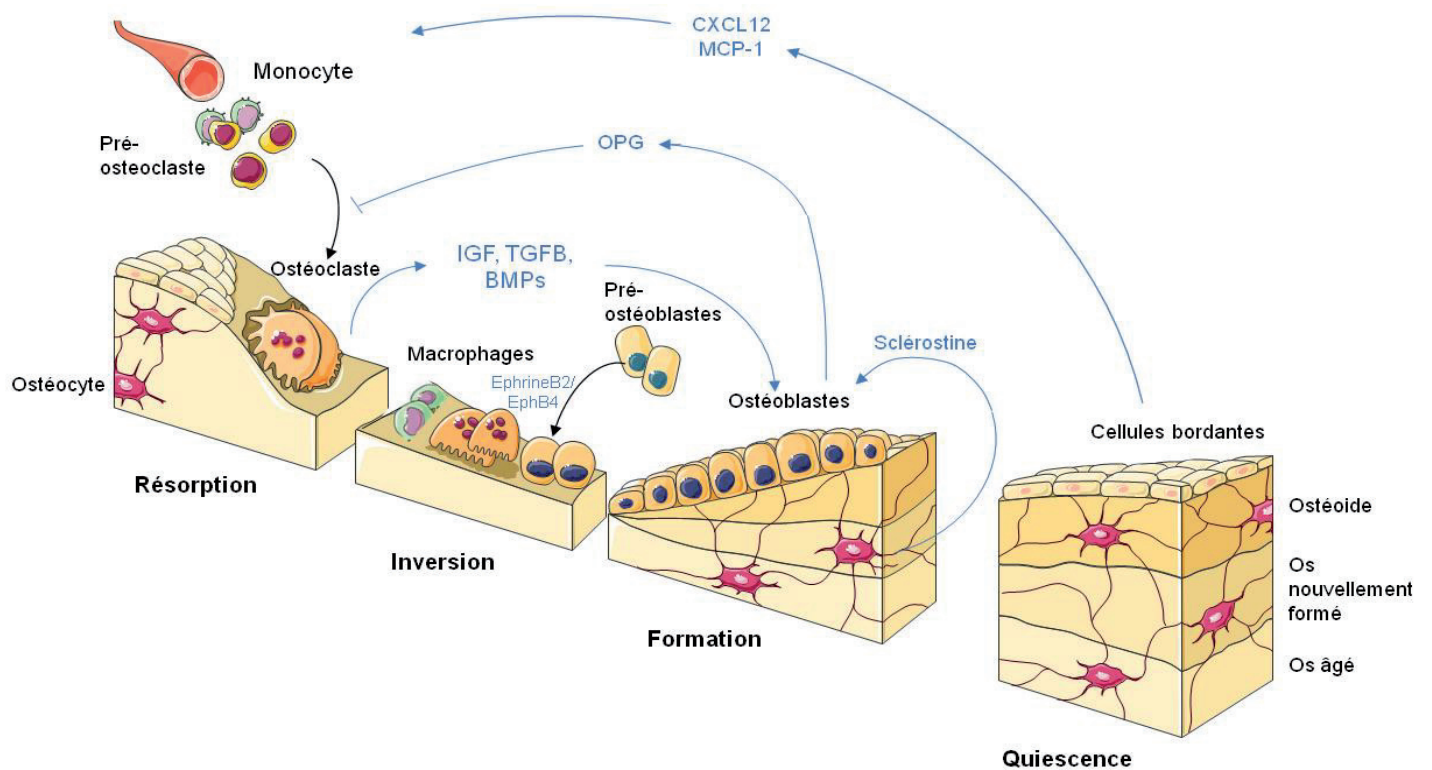


Figure 9. Représentation schématique du remodelage osseux et des protéines impliquées.

3.2- Régulation du remodelage osseux

Comme précédemment mentionné, le remodelage osseux est principalement orchestré par deux types cellulaires, les ostéoclastes et les ostéoblastes. Toutefois ce processus complexe fait intervenir de nombreux autres partenaires tels que des facteurs systémiques, hormones et facteurs nutritionnels, ainsi que des facteurs locaux du micro-environnement, facteurs de croissance et cytokines. Le système RANK/RANKL/Ostéoprotégérine représente le facteur essentiel de régulation des ostéoclastes.

3.2.1- Régulation par des facteurs systémiques

3.2.1.1- Les hormones systémiques

La *PTH*, sécrétée par la glande parathyroïde, est une hormone hypercalcémiante. Elle peut aussi stimuler la formation ou la résorption osseuse *in vitro* et *in vivo* selon la dose et la voie d'administration utilisées. Cette dualité d'action

pourrait s'expliquer par le fait que la liaison de la PTH à son récepteur régule l'expression de Runx2 dans les ostéoblastes [48]. En effet ce facteur de transcription peut non seulement stimuler l'ostéoblastogenèse mentionnée précédemment, mais il peut aussi induire une augmentation de l'expression de RANKL et une diminution de la synthèse d'OPG par les cellules de la lignée ostéoblastique [49]. En influant ainsi sur la balance RANKL/OPG, la PTH peut stimuler indirectement la formation des ostéoclastes.

La vitamine D joue un rôle majeur dans l'homéostasie calcique en favorisant la fixation du calcium sur l'os et en diminuant la prolifération des cellules parathyroïdiennes qui sécrètent la PTH. La vitamine D agit sur la différenciation et la maturation des ostéoblastes en stimulant l'expression de gènes ostéoblastiques comme l'ostéopontine et l'ostéocalcine [50]. A doses physiologiques, l'effet est anabolique et les ostéoblastes sécrètent la matrice osseuse. A doses importantes, l'effet est inverse. De plus, une carence en vitamine D est très souvent retrouvée dans les pathologies telles que l'ostéomalacie ou bien l'ostéoporose, et est associée à une perte de la minéralisation osseuse. La synthèse locale de la vitamine D dans l'os est donc nécessaire pour moduler la résorption osseuse et promouvoir la formation. Par conséquent, un taux adéquat de vitamine D est nécessaire pour l'établissement correct du squelette [51].

La calcitonine, sécrétée par des cellules de la glande thyroïde, est une hormone hypocalcémiante ; elle mobilise le calcium circulant et le fixe sur le tissu ostéoïde ; elle exerce donc un rétro-contrôle négatif de la voie PTH/vitamine D. De plus, elle diminue l'activité ostéoclastique et stimule à court terme l'activité ostéoblastique. En effet, elle est capable d'inhiber la fonctionnalité des ostéoclastes et d'accélérer leur apoptose [52].

Les œstrogènes sont des inhibiteurs de la résorption osseuse. Ils se lient aux récepteurs des ostéoblastes et augmentent ainsi directement la production d'OPG, inhibiteur naturel du RANKL, diminuant ainsi la différenciation ostéoclastique. Ils peuvent aussi exercer un effet anabolique sur les ostéoblastes [53]. De plus, les œstrogènes diminuent la production ostéoblastique de cytokines pro-ostéoclastiques telles que IL-1, IL-6 ou TNF α [34].

Récemment, *l'ostéocalcine décarboxylée* a été identifiée comme une hormone pouvant agir sur le métabolisme du glucose en stimulant la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas. L'insuline sécrétée est alors capable de reconnaître son

récepteur à la surface des ostéoblastes et d'activer la prolifération et la différenciation ostéoblastique. L'insuline induit aussi une baisse de la production d'OPG par les ostéoblastes conduisant à une hausse de la résorption osseuse. La résorption osseuse permettant la libération de l'OCN, sa décarboxylation et son relargage dans la circulation sanguine, l'insuline conduit donc également à une augmentation de la décarboxylation de l'OCN. Il existe donc une boucle de régulation entre l'insuline, la résorption osseuse et l'activité de l'OCN [54].

3.2.1.2- Les facteurs nutritionnels

Les apports alimentaires présentent un rôle important dans le remodelage osseux. Ainsi, les acides aminés sont indispensables à la synthèse des protéines de la matrice osseuse telles que le collagène, les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes. Les vitamines (A, C, D et K) permettent aussi la synthèse de la matrice ostéoïde. Par exemple, une carence en vitamine C induit une diminution ou un arrêt de la formation osseuse. Le calcium est également indispensable à la minéralisation osseuse [55].

3.2.2- Régulation par des facteurs locaux

3.2.2.1- Les facteurs de croissance

Lors de la formation osseuse, un certain nombre de facteurs de croissance sont emprisonnés dans la matrice osseuse. Ces facteurs sont ensuite libérés lors de la résorption osseuse et jouent un rôle dans le remodelage osseux.

Les BMPs, protéines ostéoinductives, appartiennent à la famille des polypeptides du TGF β . Les BMPs, en régulant l'expression de *Runx2*, ont pour fonction d'induire la différenciation des ostéoblastes, ce qui provoque l'accroissement du nombre d'ostéoblastes matures et l'augmentation de leur fonctionnalité [56].

Le TGF β , protéine de la famille des BMPs, est un régulateur important de l'ostéogénèse. Il est synthétisé par les ostéoblastes, sous l'action de la PTH, et stocké dans la matrice osseuse sous trois formes, TGF β 1/2/3, d'activité biologique identique. Ses effets sont multiples : il stimule la synthèse de collagène de type I, de protéoglycanes et des protéines non collagéniques telles que l'ostéopontine et

l'ostéonectine. Il diminue également la dégradation de la matrice en inhibant la production de collagénase et en s'opposant à la prolifération des précurseurs ostéoclastiques [57]. Toutefois, son rôle sur l'ostéoclastogenèse est quelque peu ambigu, le TGF β stimule également la production de cytokines pro-ostéoclastiques par les cellules tumorales, favorisant ainsi la résorption osseuse [58].

Les facteurs de croissance IGF sont synthétisés par les ostéoblastes et agissent de façon autocrine en augmentant le nombre et l'activité de ces cellules. Les effets des IGFs sur les ostéoblastes sont modulés par des protéines porteuses IGF-BPs (IGF Binding Proteins) synthétisées par les ostéoblastes. IGF-BP5 qui lie principalement les IGFs dans l'os, stimule l'action de l'IGF sur les ostéoblastes. A l'inverse, IGF-BP4 bloque l'action de l'IGF [59].

Les protéines FGF sont des régulateurs importants de la prolifération, de l'activité et de la durée de vie des ostéoblastes [60]. Les FGF2, 4, 9 et 18 augmentent la réplication des ostéoblastes en culture conduisant à une augmentation du nombre de cellules différenciées [61]. L'effet anabolique des protéines FGF se retrouve également *in vivo*. Ainsi, les FGF2 et 9 augmentent le nombre d'ostéoblastes fonctionnels et l'ostéogenèse au niveau des os crâniens [62]. Un autre membre de cette famille, le FGF18 est également impliqué FGF-18 dans la régénération osseuse en régulant Runx2 et l'ostéocalcine [63].

3.2.2.2- Les cytokines

Les facteurs de croissance libérés lors de la résorption osseuse vont induire l'expression de cytokines par les ostéoblastes. Ces cytokines, comme le TNF α , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-11, agissent directement sur les ostéoclastes et stimulent ainsi la résorption osseuse [52].

L'IL-11 stimule également la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse par la levée de l'inhibition de la voie Wnt [64].

3.2.3- Le système RANK/RANKL/OPG

Une des principales voies de régulation du remodelage osseux est la voie RANK/RANKL/OPG. Les ostéoblastes et l'environnement stromal produisent le RANKL et l'OPG. RANKL va permettre la différenciation des ostéoclastes *via* le

récepteur RANK présent à la surface des préostéoclastes. En parallèle, l'OPG capable de piéger le RANKL bloque l'interaction RANK/RANKL inhibant ainsi la différenciation ostéoclastique et permettant un équilibre résorption/formation (voir partie 2.2.1.1 / ostéoclastogenèse).

3.2.4- Autres régulations

Les ostéocytes jouent également un rôle important dans la régulation du remodelage osseux. Ces cellules sont des mécanosenseurs et sécrètent de l'OPG lors de pressions mécaniques. Ils produisent aussi du RANKL et MCS-F, protéines activatrices de l'ostéoclastogenèse, ainsi que la sclérostine et des protéines de la famille DKK, responsables de l'inhibition des ostéoblastes (voir partie 2.2.1.3 ostéocytes).

Le système immunitaire est également impliqué dans la régulation du remodelage osseux. Ainsi, les cellules immunitaires présentes dans la moelle osseuse, interagissent avec les cellules de l'os. Par exemple, les lymphocytes T activés produisent du RANKL, de l'IL-6, IL-1 et du TNF α , induisant alors la résorption osseuse. L'activation anormale du système immunitaire peut mener à la destruction osseuse comme c'est le cas dans l'arthrite rhumatoïde [65].

Le système nerveux intervient également dans cette régulation osseuse, notamment *via* la leptine, une hormone dérivée des adipocytes, qui inhibe la formation osseuse en se liant à son récepteur hypothalamique [66]. Le système nerveux sympathique sert alors de médiateur afférent à l'action de l'hormone sur le contrôle de la formation osseuse *via* le récepteur adrénergique β 2 (ADRB2), seul récepteur adrénergique exprimé par les ostéoblastes. Il est montré que des souris dont le gène codant pour le récepteur ADRb2 a été invalidé ADRb2 $^{-/-}$, présentent une élévation des marqueurs de la formation osseuse. L'injection de leptine par voie intracérébroventriculaire ne diminue pas la formation osseuse chez ces souris, validant la nécessité d'une intégrité du système sympathique pour relayer les effets de la leptine sur l'os [67]. Récemment, il a été démontré qu'il existait une régulation coordonnée, de nature endocrine, entre les métabolismes du remodelage osseux et énergétique. L'existence de ce lien est probablement due aux besoins énergétiques nécessaires au squelette. Par conséquent, d'un point de vue évolutif, l'apparition des hormones impliquées dans cette régulation est concomitante à celle du squelette et

non du métabolisme énergétique. Ainsi, la leptine régule négativement la masse osseuse, ainsi que l'appétit, en inhibant la synthèse de la sérotonine [68].

Par ailleurs, il a également été récemment démontré que la leptine peut inhiber la sécrétion d'insuline, par l'intermédiaire du système sympathique, notamment *via* le récepteur Adrb2 exprimé par les ostéoblastes. Comme décrit précédemment, il existe une boucle de rétro-contrôle entre l'insuline, l'OCN décarboxylée et la résorption osseuse : l'OCN décarboxylée induit la sécrétion d'insuline qui active les ostéoblastes mais aussi la résorption osseuse. Cette dernière permet en retour la libération de l'OCN décarboxylée, qui favorise à nouveau la sécrétion d'insuline. La leptine, en inhibant la sécrétion d'insuline, diminue donc indirectement la libération d'OCN décarboxylée et contrôle ainsi l'insulinémie mais aussi le remodelage osseux [54]. La fonction métabolique de l'OCN est donc régulée par la leptine et l'insuline montrant ainsi l'interconnexion entre le métabolisme énergétique et le remodelage osseux.

4- Techniques d'étude de l'os

Initiée au début du siècle avec la radiographie par rayons X, l'imagerie médicale connaît depuis ces vingt dernières années un développement fulgurant. De nouvelles techniques comme l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) ou la TEP (Tomographie par Emission de Positons) sont aujourd'hui accessibles aux patients, et permettent de réaliser des analyses *in vivo* non invasives, permettant ainsi de détecter de nombreux cancers et éventuellement des métastases associées.

La compréhension de l'architecture osseuse, *via* notamment des techniques invasives telles que l'histomorphométrie, est également un facteur déterminant dans l'avancée des connaissances sur l'os mais aussi dans l'établissement de diagnostics.

4.1- Techniques invasives

L'architecture tridimensionnelle du réseau trabéculaire peut être visualisée grâce à la microscopie électronique à balayage. Cependant, cette technique ne peut être utilisée en routine du fait qu'il est nécessaire d'éliminer toutes les cellules présentes dans l'échantillon afin de conserver uniquement la trame osseuse

minéralisée. Elle ne permet donc pas d'apprécier l'histodynamique ainsi que la cytologie des prélèvements ; cette technique est purement descriptive et ne fournit aucune donnée chiffrée.

L'histomorphométrie est la principale technique d'analyse invasive du tissu osseux. Elle nécessite en effet, un prélèvement osseux (généralement, une biopsie au niveau de l'aile iliaque conservant les deux corticales) [69]. C'est une technique basée sur l'analyse quantitative de coupes histologiques correspondant à des échantillons bidimensionnels issus d'objet tridimensionnels. Une reconstitution tridimensionnelle du réseau trabéculaire est donc nécessaire afin de refléter le plus précisément la structure osseuse et est possible à partir de coupes semi-sérialisées régulièrement espacées. Cette représentation est ensuite analysée à l'aide de différents algorithmes qui vont permettre d'étudier et quantifier les différents aspects structuraux, architecturaux et cellulaires du tissu osseux. Un exemple d'algorithme utilisé est l'index d'interconnectivité (ICI), qui utilise une technique de morphologie mathématique appelée la squelettisation. Il permet d'apprécier les connexions entre chaque os mais aussi entre l'os et son environnement (notamment musculaire). Les paramètres histomorphométriques caractéristiques de l'os évalués sont [69] :

- **VTO** = Volume Trabéculaire Osseux ; correspond au pourcentage d'os spongieux présent dans les travées osseuses
- **VOR** = Volume d'Ostéoïde Relatif
- **SOT** = Surface Ostéoïde Totale
- **SRO** = Surface de Résorption Ostéoclastique, définie par la surface occupée par les lacunes de Howship
- **FC** = Front de Calcification
- **VM** = Vitesse de Minéralisation

Il est donc possible grâce à l'histomorphométrie de visualiser précisément la répartition tridimensionnelle de l'os trabéculaire et ainsi de repérer des anomalies architecturales de façon à pouvoir mieux appréhender les maladies liées à des altérations de l'architecture osseuse.

4.2- Techniques non invasives

Les techniques non invasives sont notamment utilisées pour établir un diagnostic précis lors d'une suspicion d'une lésion d'aspect tumoral. Dans cette partie, nous allons nous axer sur la démarche diagnostique à adopter lors de la découverte d'une lésion osseuse en décrivant brièvement les différentes techniques d'imagerie médicale.

En effet, les métastases issues de divers cancers sont les tumeurs malignes les plus fréquentes impliquant le squelette. L'imagerie médicale présente un rôle important dans la détection, le diagnostic, mais aussi dans la planification du traitement ainsi que le suivi des métastases osseuses. L'imagerie est cruciale pour le criblage du squelette afin de détecter d'éventuelles métastases ainsi que leur étendue [70] [71].

- *Examen clinique / Radiographie*

L'examen clinique doit être précisé par quelques examens complémentaires notamment *via* des radiographies conventionnelles (de face et de profil) avant tout autre examen d'imagerie (Figure 10).

La radiographie est une technique d'imagerie de transmission basée sur les propriétés intrinsèques de l'objet à visualiser, notamment sa capacité à absorber la matière. Les principaux rayons utilisés sont les rayons X (radiographie X) ; les rayons gamma peuvent aussi être exploités dans le cas de la gammagraphie. La radiographie permet d'obtenir un cliché dont le contraste dépend à la fois de l'épaisseur et du coefficient d'atténuation des structures traversées [72].

L'analyse des radiographies va permettre de préciser la localisation des atteintes osseuses dans le plan longitudinal (la majorité des lésions sont métaphysaires), mais aussi axial (lésion au niveau de l'os intra-spongieux, intra-cortical ou juxta-cortical), la nature de ces lésions osseuses (lytiques, blastiques ou mixte), mais aussi l'aspect de la tumeur (contours réguliers ou flous) qui orientera vers une tumeur bénigne ou maligne [73].

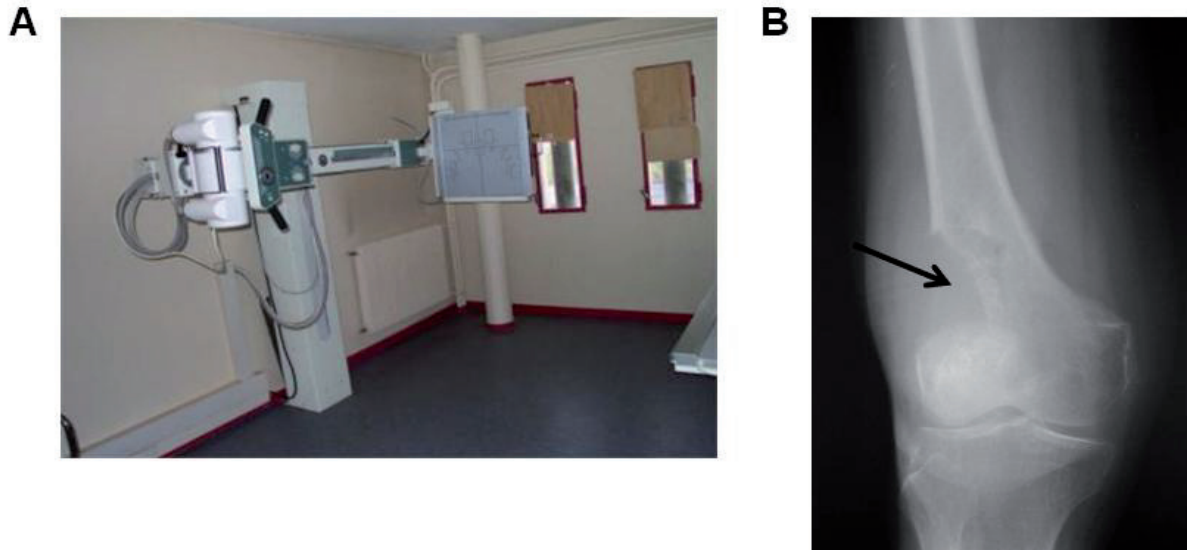


Figure 10. La radiographie.

(A) Appareil de radiographie. (B) Radiographie montrant une métastase ostéolytique dans le fémur distal d'une femme âgée de 51 ans et atteinte d'un cancer du sein.

- *Bilan d'extension / Scintigraphie*

D'autres examens d'imageries plus sophistiqués peuvent être prescrits lors du bilan d'extension. Parmi ceux-ci, la scintigraphie osseuse (Figure 11). La scintigraphie est une méthode d'imagerie médicale nucléaire basée sur l'imagerie d'émission suite à l'injection, dans l'organisme, d'isotopes radioactifs afin de produire une image par la détection des rayonnements émis par ces isotopes après captation par les organes à examiner [72].

La scintigraphie est une méthode efficace pour le dépistage des métastases osseuses sur corps entier [74]. Elle permet la visualisation de plusieurs zones d'hyperfixation.

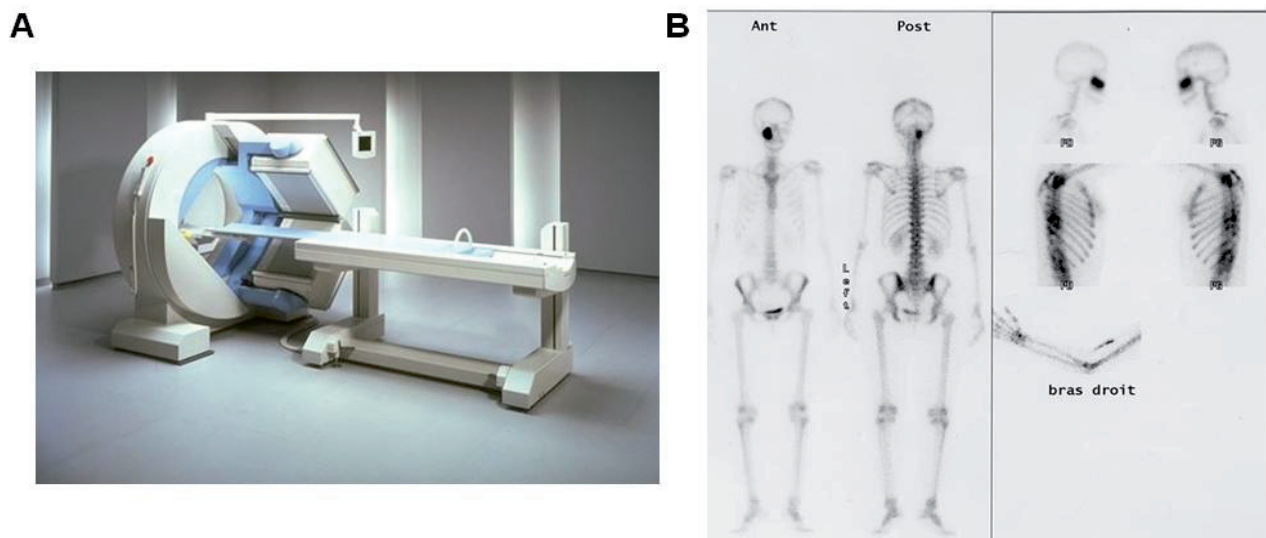


Figure 11. La scintigraphie osseuse.

(A) Appareil de scintigraphie osseuse. (B) Scintigraphie osseuse révélant une lésion sous le bord inférieur droit de l'orbite.

- *Bilan d'extension / Tomodensitométrie (ou scanner) / IRM*

La tomodensitométrie (TDM) est une technique d'imagerie médicale permettant d'analyser finement la structure anatomique de l'os, notamment l'atteinte corticale lors de métastases osseuses [75].

La TDM consiste à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus puis, par traitement informatique à numériser et enfin reconstruire des images 2D ou 3D des structures anatomiques.

La tomodensitométrie hélicoïdale multi-barrettes correspond à la nouvelle génération de scanner dans laquelle l'émission des rayons X est continue et l'acquisition se fait *via* un très grand nombre de capteurs (jusqu'à 128 barrettes). Elle est particulièrement utile pour l'identification du processus de destruction des métastases osseuses, la menace de fracture et le tassement vertébral [75] (Figure 12).

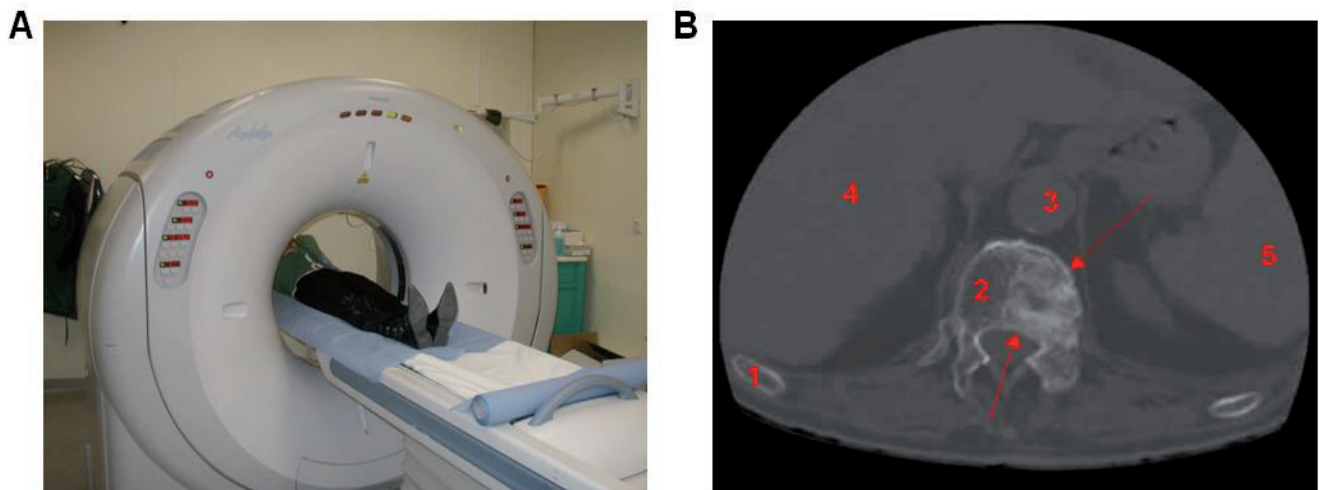


Figure 12. La tomodensitométrie.

(A) Scanner. (B) Tomodensitométrie du rachis lombaire présentant de multiples métastases osseuses vertébrales (coupe axiale en fenêtre osseuse). 1 = Arc costal. 2 = Corps vertébral. 3 = Aorte. 4 = Foie. 5 = Rate. Flèche = Métastase.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie médicale permettant d'obtenir une image anatomique de l'intérieur du corps de façon non-invasive avec une résolution relativement élevée. L'IRM repose sur le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui utilise les propriétés quantiques des noyaux atomiques ; dans le cas de l'IRM il s'agit de la résonance des noyaux d'hydrogène très présents dans l'eau et les graisses des tissus. L'IRM nécessite un champ magnétique puissant et stable produit par un aimant supraconducteur qui crée une magnétisation des tissus qui donne lieu à un signal électromagnétique mesurable. En utilisant le principe de la tomographie, il est alors possible de reconstruire une image en deux dimensions puis en trois dimensions de la composition chimique et donc de la nature des tissus biologiques explorés [76].

L'IRM permet d'observer les tissus mous avec des contrastes plus élevés qu'avec la tomodensitométrie. Elle permet donc l'analyse de l'os spongieux mais pas des corticales osseuses. Elle permet toutefois de mesurer l'extension en hauteur de la tumeur ainsi que son extension dans les parties molles [75] (Figure 13).

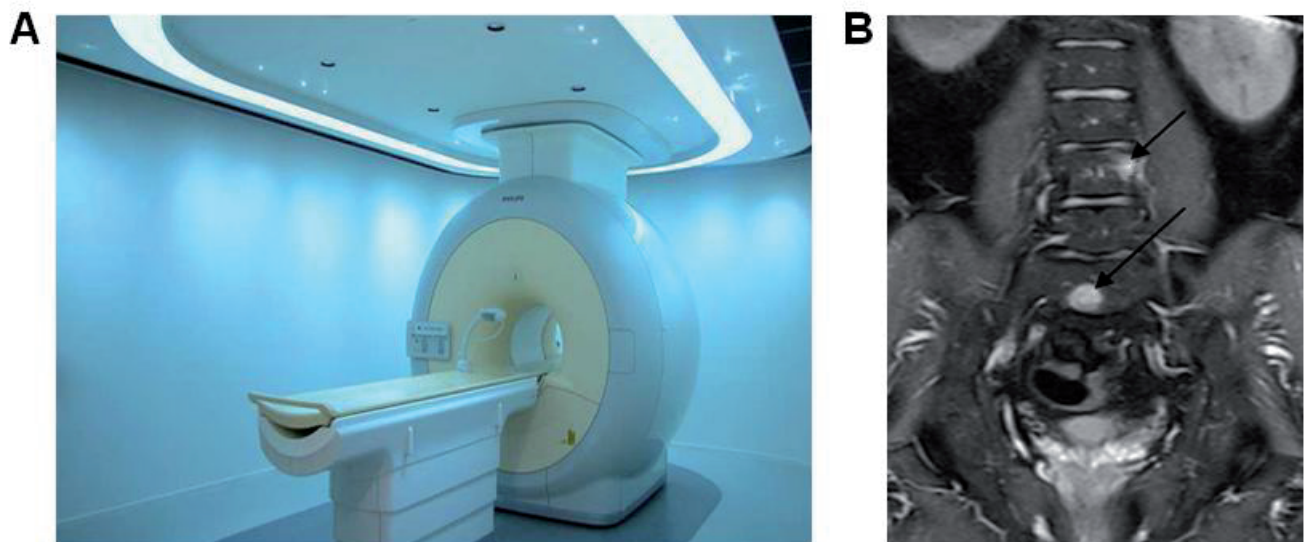


Figure 13. L'IRM.

(A) Scanner IRM. (B). IRM d'une métastase osseuse ostéocondensante (flèches) d'un cancer du poumon.

- *Bilan d'extension / Tomographie à émission de positons*

La tomographie par émission de positons (TEP), appelée aussi PET ou PET scan (Positron Emission Tomography) est également une méthode d'imagerie médicale nucléaire qui nécessite l'injection d'un traceur (élément radioactif). Elle permet de mesurer en trois dimensions l'activité métabolique d'un organe grâce aux émissions produites par les positons (ou positrons) issus de la désintégration du produit radioactif injecté au préalable. La TEP repose sur le principe général de la scintigraphie consistant à injecter un traceur dont on connaît le comportement et les propriétés biologiques pour obtenir une image du fonctionnement d'un organe *via* la caméra TEP. L'information quantitative ainsi détectée est représentée sous la forme d'une image faisant apparaître en couleurs les zones de forte concentration du traceur. La reconstitution 3D de cette image fait appel au principe de tomographie.

La TEP permet de visualiser les activités du métabolisme des cellules : on parle d'imagerie fonctionnelle par opposition aux techniques d'imagerie dites structurales comme celles basées sur les rayons X qui réalisent des images de l'anatomie. Par conséquent, la tomographie par émission de positons est un outil diagnostique qui permet de déceler certaines pathologies qui se traduisent par une altération de la physiologie normale comme les cancers. Dans le cas de métastases

osseuses, la TEP permet une détection précoce des cellules cancéreuses, *via* la forte augmentation du métabolisme du glucose dans ces cellules [77].

L'appareil TEP peut être couplé avec un scanner (CT (Tomographie Couplée) ou CT-scan (Computing Tomography) en anglais) pour obtenir une meilleure localisation anatomique des structures tumorales (Figure 14).

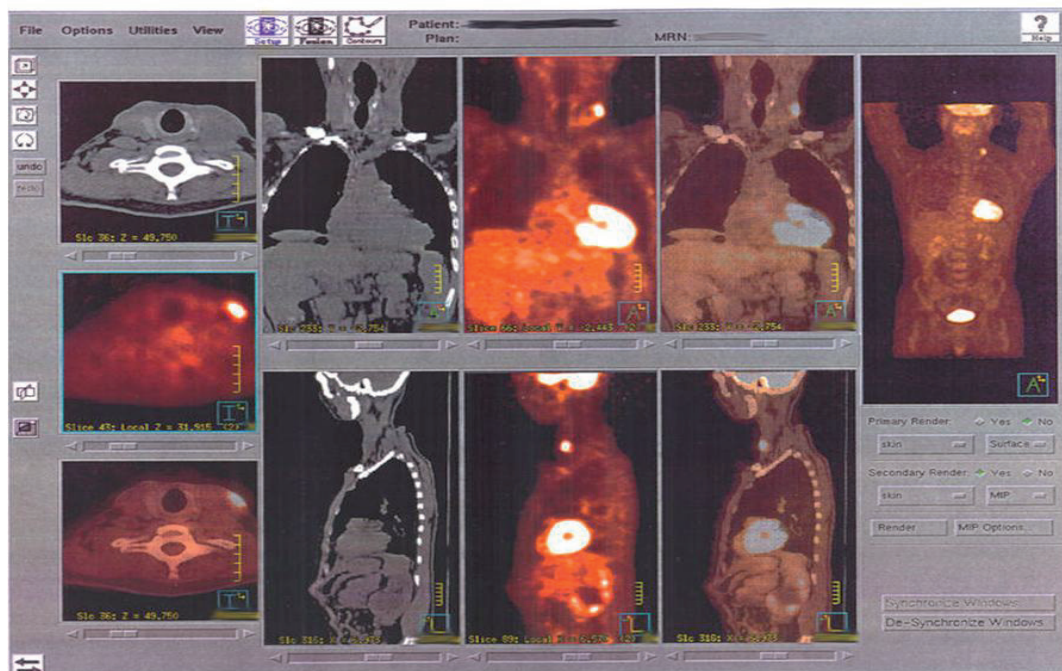


Figure 14. Bilan d'une tomographie par émission de positons (TEP) couplée à un scanner (CT-scan).

Ici, un ganglion cervical sus-claviculaire gauche est le siège d'une hyperfixation du traceur radioactif.

- *Comparaison des différentes techniques d'imagerie médicale non invasives*

L'imagerie médicale est essentielle pour détecter les métastases osseuses et de manière plus générale, toute lésion de l'os. Cependant, aucun consensus n'existe quant à la meilleure façon de procéder pour diagnostiquer une lésion. L'imagerie médicale permet soit directement de visualiser de façon anatomique l'os ou la tumeur, soit indirectement en mesurant le métabolisme osseux ou tumoral (Figure 15).

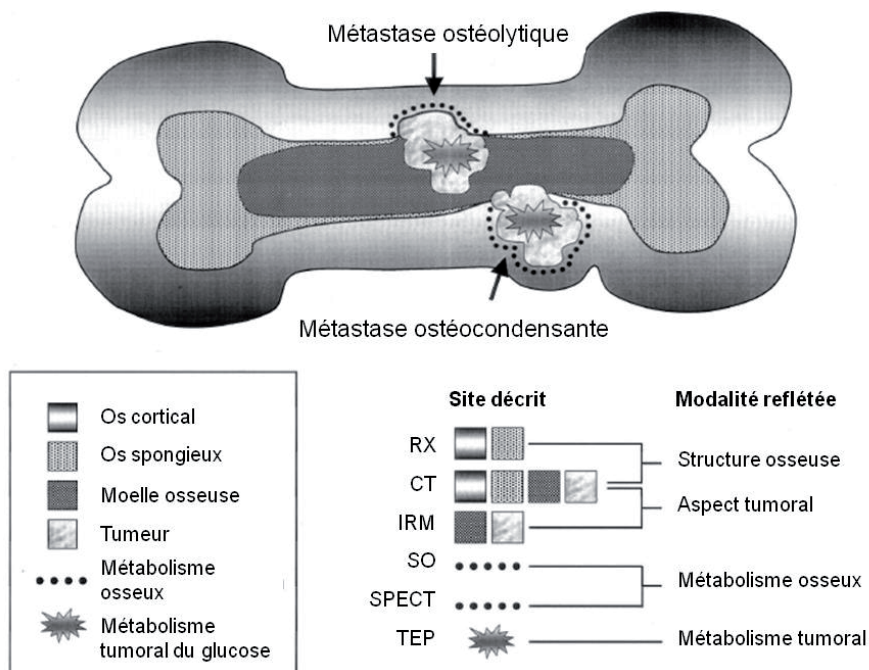


Figure 15. Résumé des différentes techniques d'imagerie de métastases osseuses.

Radiographie standard (RX) et tomographie couplée (CT) visualisent la structure osseuse. CT et IRM (imagerie à résonance magnétique) visualisent les tumeurs et la moelle osseuse. La scintigraphie osseuse (SO) et la tomographie couplée à émission de simple photon (SPECT) révèlent le métabolisme osseux ostéoblastique. La tomographie à émission de positons (TEP) visualise le métabolisme tumoral. CT, IRM et TEP peuvent détecter précocement de petites métastases dans la moelle osseuse, avant même tout changement visible de l'os cortical [78].

B- Les métastases osseuses des tumeurs solides

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

Il est connu que chaque cancer se propage à un organe-cible préférentiel (Tableau 2). Par exemple, les ostéosarcomes et mélanomes métastasent préférentiellement au poumon, tandis qu'un cancer du colon métastase sélectivement au foie. Les cancers du sein, prostate et poumon ont une forte prédilection pour métastaser à l'os [79]. Les mécanismes exacts de ces préférences métastatiques sont encore peu connus, cependant en ce qui concerne l'os, il apparaît que l'environnement osseux possède des caractéristiques biologiques uniques qui permettent aux cellules cancéreuses circulantes de s'y installer, survivre et proliférer. Ainsi, Stephan Paget proposa en 1889 l'hypothèse « seed-and-soil » selon laquelle les cellules circulantes cancéreuses peuvent réaliser des métastases seulement dans les organes qui possèdent un microenvironnement favorables pour leur développement [80].

L'os est un tissu richement vascularisé, ce qui en fait un site de prédilection pour les métastases. Ces cancers sont dits ostéophiles ou ostéotropiques.

Sur le plan clinique, les métastases osseuses sont associées à une morbidité considérable (fractures pathologiques, compression médullaire, hypercalcémie et douleurs) qui dégrade sérieusement la qualité de vie des patients et qui peut même engager leur pronostic vital.

Tumeur primitive	Site métastatique préférentiel
Sein	Os, poumon, plèvre, foie, péritoine
Broncho-pulmonaire	Os, foie, encéphale, surrénales
Prostate	Os
Thyroïde	Os, poumon
Foie	Poumon
Reins	Poumon
Ostéosarcome	Poumon
Mélanome	Poumon
Colon	Foie
Tube digestif	Foie, péritoine

Tableau 2. Liste non exhaustive des principaux cancers et de leurs localisations métastatiques préférentielles.

1- Le processus métastatique

La progression métastatique consiste en de multiples étapes, séquentielles et interdépendantes, à partir de l'échappement d'une ou plusieurs cellule(s) du site primitif jusqu'à la colonisation du site cible. Cette cascade métastatique suit plusieurs étapes clés incluant [81] (Figure 16) :

- La prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses au site tumoral primitif.
- L'intravasation, migration dans la circulation sanguine et extravasation.
- Arrêt des cellules cancéreuses au niveau de l'organe-cible (ici l'os), sortie du sinus central et envahissement de la moelle osseuse.
- Colonisation du nouvel environnement (ici l'os) par les cellules cancéreuses.

De plus la matrice osseuse est un réservoir important de facteurs de croissance tels que le TGF- β , IGF I et II, FGF, PDGF, BMP et calcium. Ces facteurs de croissance, libérés durant la résorption osseuse, fournissent un environnement propice dans lequel les cellules cancéreuses peuvent proliférer. Les cellules cancéreuses, notamment les cellules issues d'un cancer du sein, expriment des gènes qui facilitent leur migration à l'os. Ces gènes sont impliqués dans l'invasion et l'extravasation dans les capillaires sanguins, dans la réponse au chimiotactisme, et dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire osseuse. Une fois que les cellules cancéreuses

ont migré à l'os, elles utilisent l'environnement osseux unique pour communiquer avec l'os et établir une métastase [82].

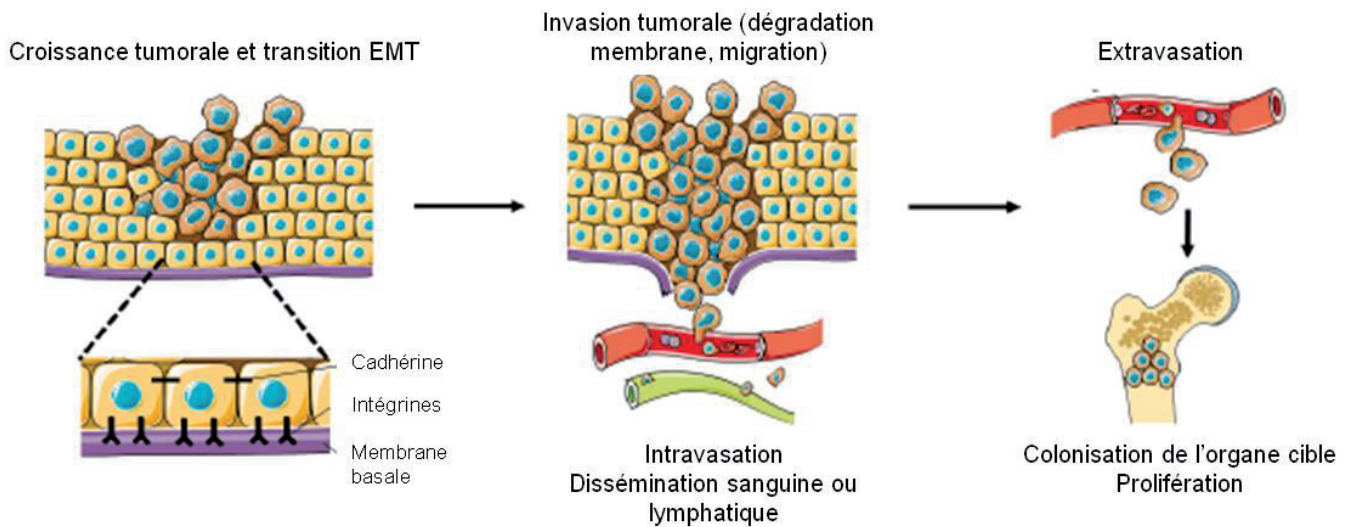


Figure 16. Représentation schématique des mécanismes de la formation des métastases osseuses.

Des cellules tumorales au caractère métastatique s'individualisent et prolifèrent au sein de la tumeur primaire, puis après migrent dans le système vasculaire (étape d'invasion). Via le système sanguin ou lymphatique, les cellules tumorales disséminent jusqu'à l'organe ciblé, au niveau duquel elles réalisent l'extravasation. Pour cela, elles induisent l'agrégation plaquettaire, facilitant ainsi leur adhésion à la paroi endothéliale. Une fois dans l'organe cible, les cellules prolifèrent pour établir une nouvelle tumeur.

2- Ostéotropisme

2.1- Invasion et échappement du site tumoral primitif

La première étape du processus métastatique comprend la prolifération des cellules tumorales qui vont alors envahir et dégrader la matrice extracellulaire du site primitif afin de pouvoir s'échapper et migrer dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques (= intravasation). Pour cela, il est nécessaire que les cellules cancéreuses se détachent de la matrice et sécrètent des protéases capables de la dégrader.

- *Les cadhérines*

L'E-cadhérine est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'adhésion cellule-cellule et qui joue un rôle de suppresseur dans l'invasion des cellules tumorales et dans les métastases [83]. En effet, la perte d'expression de l'E-cadhérine est associée à différents types de cancers, notamment à celui du cancer du sein [84]. L'expression de l'E-cadhérine est inversement corrélée avec la fréquence d'apparition de métastases chez les patientes atteintes de cancer du sein. Yoneda *et al.* ont montré que lorsque les cellules MDA-MB-231 sont transfectées avec de l'E-cadhérine, le nombre de métastases ostéolytiques diminue, suggérant ainsi qu'une augmentation de l'adhésion de ces cellules réduit leur capacité à s'échapper de la tumeur primaire [85]. A l'inverse, l'expression de N-cadhérine et de la cadhérine-11 corrèle avec l'augmentation de la migration cellulaire et l'apparition de métastases [86]. En effet la surexpression de cadhérine-11 dans les cellules MDA-MB-231 [87] ou dans des cellules de cancer de la prostate PC3 entraîne une augmentation de la formation de métastases osseuses par ces cellules [88]. Par conséquent, la cadhérine 11 et la N-cadhérine favorisent la formation de métastases osseuses, tandis que l'E-cadhérine l'inhibe.

- *Les protéases*

Les MMP, capables de dégrader la matrice extracellulaire, sont également impliquées dans l'invasion tumorale et la formation de métastases [89]. Ces MMP sont surexprimées dans de nombreuses tumeurs humaines malignes et leur surexpression augmente la capacité invasive des cellules tumorales. Les MMP sont impliquées à différentes étapes de la progression tumorale, notamment dans la prolifération et l'échappement des cellules tumorales du site primitif, dans l'intravasation ainsi que dans la survie de ces cellules dans la circulation sanguine. En effet, la dégradation de la matrice extracellulaire est une étape clé pour la migration et l'échappement tumoral au stade précoce du processus métastatique [90]. Il existe donc une connexion claire entre MMP, dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion par les cellules cancéreuses.

En dehors de leur rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire, les MMP clivent également des facteurs de croissance tels que le TGF β , conduisant à leur

activation, ainsi que des protéines exposées à la surface des cellules telles que l'E-cadhérine [91].

Il a aussi été démontré que les cellules tumorales à fort tropisme osseux expriment la cathepsine K qui est une cystéine protéase que l'on pensait spécifiques des ostéoclastes [55,56,57,58]. La cathepsine K a pour propriété de dégrader les fibres de collagène. On peut donc supposer que cette protéine produite par les cellules tumorales pourrait permettre la dégradation de la trame collagénique et favoriser ainsi l'invasion tumorale [92].

Les protéases telles que l'uPA (urokinase Plasminogen Activator) et les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) permettent aussi aux cellules cancéreuses de dégrader la matrice extracellulaire environnante et ainsi de migrer vers les sites métastatiques à distance [93]. Ces protéines sont également essentielles pour les étapes précoces du processus métastatique telles que l'invasion.

- *Les intégrines*

Les intégrines sont des hétérodimères composés de sous-unités α et β . Ce sont des récepteurs majeurs pour les protéines de la matrice extracellulaire et sont cruciaux pour l'invasion et la migration cellulaire. En effet, Chen *et al* ont démontré un lien fonctionnel entre les intégrines α_v , l'activité des MAPK et l'expression de l'uPA dans l'invasion des cellules tumorales. Le blocage de ces intégrines entraîne une diminution du taux de MAPK actives et inhibe l'expression de l'uPA dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 [94]. De plus, l'intégrine $\alpha\beta_3$, *via* son interaction avec la MMP1, peut augmenter la migration, et ainsi l'invasion tumorale, des cellules de cancer du sein MCF7 [95]. Il en est de même avec l'activation de la MMP2 [96].

- *RANKL*

En plus de sa capacité à activer la différenciation des ostéoclastes, il a été démontré que RANKL stimule aussi la migration et donc l'invasion des cellules tumorales (sein, prostate, mélanome) qui expriment le récepteur RANK. En effet, RANKL est capable de réprimer l'expression de la maspine (un inhibiteur endogène

des sérines-protéases) dans les cellules épithéliales du cancer de la prostate. Or les cellules tumorales produisent des sérines-protéases telles que l'uPA ou la plasmine ainsi que des MMP qui dégradent localement la matrice extracellulaire. RANKL permet donc, *via* son interaction à son récepteur RANK, d'augmenter la capacité invasive et métastatique des cellules tumorales [97].

2.2- Migration ciblée des cellules tumorales vers l'os

A la suite de l'intravasation, les cellules cancéreuses se retrouvent dans le système sanguin ou lymphatique ; elles vont alors migrer de façon ciblée vers l'organe cible, notamment l'os. Plusieurs facteurs interviennent alors, dont les cytokines et chémokines qui sont de petites cytokines solubles qui attirent à distance les cellules tumorales et immunitaires. Elles peuvent aussi réguler le réarrangement du cytosquelette et l'adhésion cellulaire ; elles ont un rôle important dans le « homing » des cellules hématopoïétiques (voir chapitre 2.2.2.1 - cellules souches hématopoïétiques).

- **CXCR4 / CXCL12**

Une des cytokines les plus étudiées dans les cancers est CXCL12 ; elle est abondamment sécrétée dans les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et la moelle osseuse qui constituent les sites privilégiés des métastases du cancer du sein [98]. A l'inverse, les organes rarement ciblés par les cellules métastatiques de ce type de cancer, tels que les reins ou le petit intestin, expriment de très faibles niveaux de CXCL12 [99]. De plus, la surexpression de CXCR4 est détectée dans les cellules cancéreuses métastatiques humaines de cancer du sein comparées aux cellules épithéliales mammaires normales [98]. La surexpression de CXCR4 augmente la formation de métastases osseuses *in vivo* [100]. Chez l'animal, CXCR4 contrôle la croissance et la dissémination métastatique des cancers du sein [101]. Récemment, il a été montré que l'inhibition pharmacologique de CXCR4 par le CTCE-9908 inhibe la dissémination métastatique des cellules MDA-MB-231 au poumon et à l'os, démontrant ainsi le potentiel thérapeutique du ciblage de CXCR4 [102].

- **RANKL**

RANK-L est capable d'agir sur les cellules tumorales telles que les MDA-MB-231, DU-145 (carcinome prostatique), PC-3 et B16F10 (mélanome) qui expriment le récepteur RANK et d'induire la migration cellulaire [103]. L'OPG, en bloquant RANK-L, inhibe *in vitro* la migration des cellules de carcinomes prostatiques DU-145 et PC-3 et, *in vivo*, la colonisation de la moelle osseuse par les cellules B16F10 [103]. RANK-L pourrait intervenir non seulement dans la circulation en tant que facteur chimioattractant, des taux circulants de RANK-L ont d'ailleurs pu être détectés dans le sérum de patients atteints de cancers métastatiques [104], mais aussi localement au niveau de la tumeur primitive (comme décrit précédemment). Le RANK-L produit au niveau des tumeurs primaires favoriserait donc l'essaimage des cellules tumorales alors que le RANK-L produit par les cellules de moelle osseuse favoriserait l'invasion au site osseux des cellules tumorales qui expriment le récepteur RANK. Toutes ces observations permettent donc de supposer que RANK-L et son récepteur RANK sont également impliqués dans le tropisme osseux des cellules tumorales.

2.3- Attachement des cellules à l'endothélium/extravasation

Une fois que les cellules tumorales atteignent leur organe cible, elles adhèrent au vaisseau sanguin par lequel elles sont arrivées, et qui est juxtaposé au site métastatique, pour pénétrer ; ce processus s'appelle l'extravasation. Dans le cas de métastases osseuses, les cellules sortent de la circulation sanguine au niveau des vaisseaux de la moelle osseuse, aussi appelés sinusoides.

Les cellules tumorales, présentes dans la circulation sanguine, interagissent avec les plaquettes sanguines et les activent. Il en résulte la constitution d'agrégats plaquettaires à la surface des cellules tumorales qui servent alors d'écran, permettant aux cellules tumorales d'échapper à une reconnaissance par le système immunitaire [105]. Ces agrégats plaquettaires vont également indirectement augmenter la taille des cellules tumorales et favoriser la formation d'embols dans les microvaisseaux qui permettent aux cellules tumorales de sortir des vaisseaux sanguins (extravasation) [106]. Ce phénomène d'extravasation n'est pas passif. L'interaction des cellules tumorales avec l'endothélium fait intervenir différentes molécules à la surface des cellules endothéliales.

- *Chimiokines*

Il a été observé que ces cellules tumorales métastatiques s'attachent et sont extravasées à des endroits spécifiques de l'endothélium de la moelle osseuse, appelés microdomaines. Ces derniers expriment spécifiquement CXCL12. L'imagerie confocale dynamique sur crâne de souris a en effet montré que les cellules de différentes lignées tumorales qui expriment CXCR4 s'attachent et s'extravasent uniquement au niveau de ces microdomaines. Ces cellules emprunteraient les mêmes accès que les cellules souches hématopoïétiques et les lymphocytes T pour s'extravaser [107].

De plus, il a été également observé que les cellules endothéliales expriment la fractalkine, aussi nommée CX3CL1, qui peut favoriser, *in vitro*, l'adhésion des cellules tumorales prostatiques exprimant CX3CR1 [108].

- *Molécules d'adhésion*

Les cellules tumorales sont également freinées, dans l'endothélium, par des molécules de la famille des sélectines et s'y arrêtent suite au contact avec des chimiokines qui induisent l'activation des intégrines. L'interaction de ces dernières avec des molécules de la super famille des immunoglobulines CAMs (Cell Adhesion Molecules) permet une forte adhésion des cellules tumorales à l'endothélium et leur passage jusqu'à la matrice osseuse. Les microdomaines, qui expriment un taux élevé de CXCL12, contiennent également de la E-sélectine (Endothelial-sélectine). Ainsi, en cas d'injection de cellules cancéreuses dans des souris KO pour la E-selectine ou en cas d'inhibition de l'axe CXCR4/CXCL12, une nette diminution de l'extravasation est observée [107].

Par ailleurs, il a été observé que les cellules des métastases osseuses associées au cancer de la prostate expriment un ligand de la E-selectine, le PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotéine Ligand-1). *In vitro*, l'expression de ce ligand permet aux cellules de carcinome prostatique d'interagir avec les cellules endothéliales [109].

D'autres molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), ou VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) sont exprimées *in vivo* dans le système vasculaire de la moelle osseuse, et notamment au niveau des microdomaines décrits par Sipkins *et al* [107].

2.4- Envahissement et nidation

Après la migration et l'initiation du processus d'extravasation, l'étape suivante de formation d'une métastase osseuse est l'adhésion spécifique des cellules tumorales à la matrice extracellulaire osseuse ou aux cellules stromales osseuses.

- *Métalloprotéinases matricielles*

A leur arrivée au site osseux, les cellules tumorales peuvent sécréter différentes MMP qui permettent de dégrader localement la matrice extracellulaire et d'envahir la moelle osseuse. Les études de Kang ont permis de démontrer l'implication de ces protéases dans le processus de formation des métastases osseuses. En effet, ces études ont mis en évidence que des sous-clones ostéophiles de la lignée MDA-MB-231 sur-exprimant la MMP-1 induisent une formation des métastases osseuses plus précocement que les lignées parentales [100].

- *L'intégrine $\alpha\beta3$*

Les cellules tumorales créent des liaisons spécifiques avec la matrice osseuse extracellulaire et les cellules stromales notamment grâce aux intégrines. L'intégrine $\alpha\beta3$ se lie aux motifs RGD (Arg-Gly-Asp) présents sur plusieurs protéines de la matrice osseuse comme la vitronectine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse [81]. Notre laboratoire a montré que la surexpression de cette intégrine augmente la capacité des cellules de cancer du sein à former des métastases osseuses [110].

- *La cadhérine-11*

Les cellules stromales osseuses expriment constitutivement et spécifiquement la cadhérine-11, appelée aussi OB-cadhérine. Cependant, cette expression a également été retrouvée dans les cancers du sein humain, dont l'agressivité corrèle avec le niveau d'expression de la cadhérine-11. Il a également été démontré que des interactions homophiliques entre les cellules de cancer du sein et les cellules stromales de la moelle osseuse *via* la cadhérine-11 augmentent le « homing » des

cellules cancéreuses dans l'os, ce qui suggère que la cadhérine-11 contribue à la diffusion préférentielle des cellules cancéreuses du sein à l'os [81].

De plus, la production de cadhérine-11 à la surface des cellules PC3 permet d'augmenter l'interaction de ses cellules avec les ostéoblastes [111].

- *La lysyl oxydase*

La LOX est une enzyme qui permet la réticulation des collagènes fibrillaires (dont les types I et IV) et de l'élastine. Quatre autres enzymes de la même famille que la LOX, les lysyl oxidase-like (LOXL)-1 à -4, exercent des fonctions similaires à la LOX. L'activité de la LOX peut être stimulée par différents facteurs provenant de la matrice osseuse (TGF β , BMP-1, périostine), permettant ainsi l'envahissement de la moelle osseuse par les cellules tumorales.

De plus, les enzymes LOX et LOXL2 (en réticulant les collagènes fibrillaires) augmentent la rigidité de la matrice extracellulaire, ce qui permet aux cellules tumorales d'adhérer et de s'ancrer plus facilement à cette matrice rigidifiée. Cette matrice un peu particulière qui sert de point d'ancrage aux cellules tumorales constitue une entité que l'on appelle « niche prémétastatique ». La LOX intervient donc dans le processus de nidation des cellules tumorales [112].

3- Ostéomimétisme

Après s'être implantées dans la cavité médullaire, les cellules tumorales acquièrent un phénotype osseux en exprimant des gènes qui sont normalement exprimés par les ostéoblastes et/ou les ostéoclastes. Ce phénomène s'appelle ostéomimétisme [113].

Les analyses transcriptomiques et immunohistochimiques réalisées sur des métastases osseuses suggèrent en effet que les cellules tumorales présentes dans la cavité médullaire, subissent une pression de sélection les amenant à s'adapter à l'environnement osseux en exprimant des gènes qui sont normalement exprimés par les ostéoblastes (cadhérine-11, connexine-43, ostéonectine, Runx2) ou les ostéoclastes (cathepsine K). De même, il a été démontré que les cellules tumorales prostatiques (PC-3, DU-145 et C4-2B) expriment Runx-2 et le récepteur Notch-1,

permettant la sécrétion de protéines osseuses (ostéopontine, ostéocalcine et sialoprotéine osseuse) et la formation de nodules de minéralisation. Ce phénomène, l'ostéomimétisme, permettrait aux cellules métastatiques de survivre et de progresser plus facilement dans l'environnement osseux [97].

4- Développement des métastases osseuses

L'arrivée des cellules tumorales dans le microenvironnement osseux augmente la complexité des interactions cellules-cellules déjà présentes. En effet, les cellules cancéreuses produisent de nombreux facteurs pro-ostéoclastiques et/ou pro-ostéoblastiques qui induisent un déséquilibre soit en faveur de la résorption osseuse, soit de la formation osseuse : l'équilibre entre résorption et formation osseuse normalement réalisé par le remodelage osseux est donc rompu (Figure 17).

Les métastases osseuses sont souvent ostéolytiques, entraînant une destruction osseuse, parfois ostéocondensantes, provoquant un excès de formation osseuse, ou mixtes, présentant alors au même site, des formes ostéolytiques et ostéocondensantes (Figure 17).

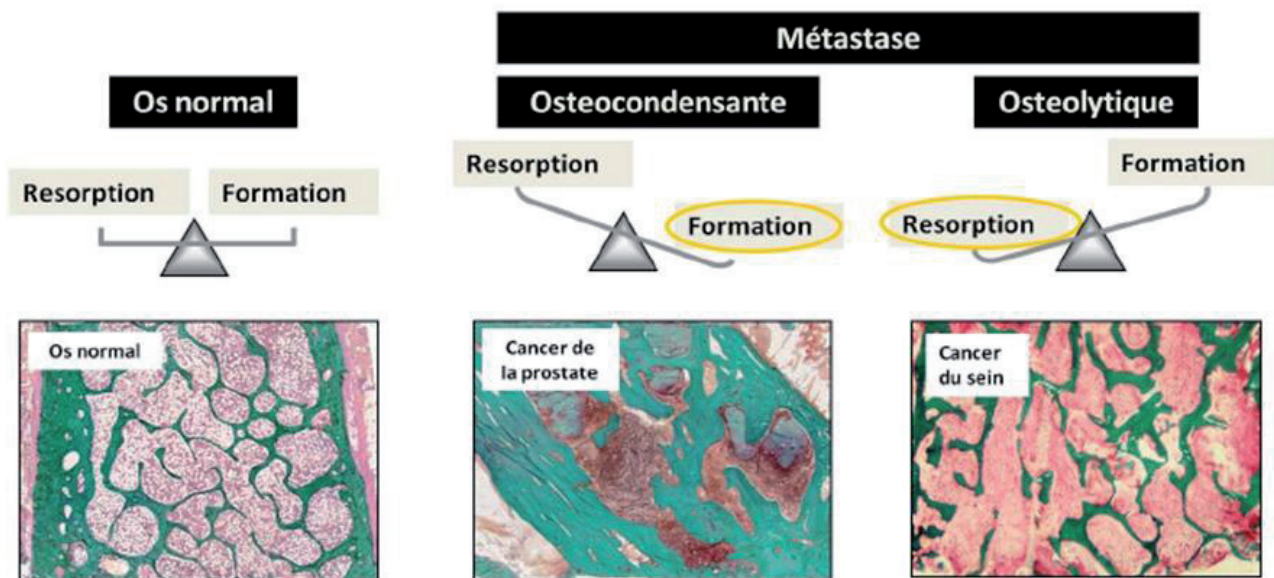


Figure 17. Deux types de métastases osseuses après coloration des sections osseuses au trichrome de Goldner.

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

4.1- Métastases ostéocondensantes

Les métastases ostéoblastiques sont caractérisées par la formation d'un os nouveau après la colonisation de la moelle osseuse par les cellules tumorales. Le cancer de la prostate est un exemple de cancer développant des lésions métastatiques ostéosclérotiques. Dans ce cas, les cellules tumorales sécrètent des facteurs qui stimulent la formation osseuse et inhibent la résorption osseuse (Figure 18).

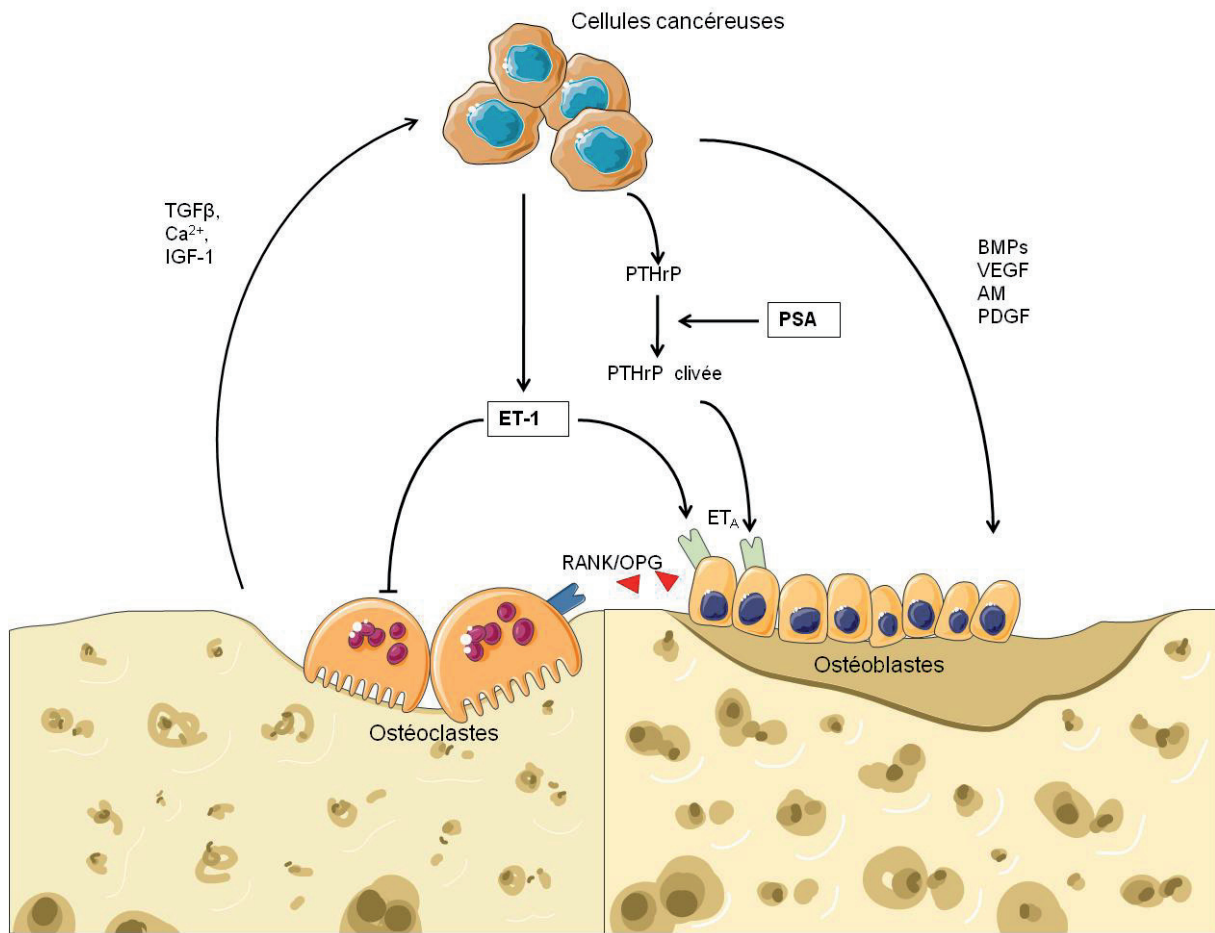


Figure 18. Représentation schématique des interactions moléculaires entre les cellules tumorales et l'environnement osseux impliquées dans des métastases ostéocondensantes.

Les cellules tumorales produisent de l'ET-1 et un fragment de la PTHrP (=PTHrP clivée) qui activent les ostéoblastes et inhibent les ostéoclastes. Les IGF et BMP, produits en retour, stimulent la prolifération des cellules tumorales et la production d'ET-1.

4.1.1- Stimulateurs de la formation osseuse

- *Endothéline-1 (ET-1)*

L'ET-1 est un facteur de croissance qui induit la prolifération ostéoblastique ainsi que la formation osseuse *via* le récepteur ET-1A (ETAR), induisant alors la transcription de gènes comme Runx2. Les effets de cette interaction ET-1/ETAR sont indirects et passent notamment *via* les voies des MAPK, Akt et du calcium [114].

L'endothéline-1 serait aussi capable de jouer sur la voie de signalisation Wnt en régulant négativement l'expression de son inhibiteur DKK-1, entraînant ainsi une augmentation de la différenciation des ostéoblastes [115].

Les patients atteints de métastases osseuses ostéoblastiques issues de cancer de la prostate présentent des taux sériques élevés d'ET-1 [116]. L'administration d'un antagoniste spécifique du récepteur de l'endothéline-1 réduit la survenue de métastases osseuses ostéoblastiques dans un modèle murin et réduit la morbidité chez les hommes atteints d'un cancer prostatique avancé [116] [117].

De plus, l'ET-1 augmente l'expression de protéines spécifiques de l'os telles que l'ostéocalcine, l'ostéonectine et l'alkaline phosphatase, ce qui suggère que l'ET-1 est une cytokine qui module les fonctions ostéoblastiques et qui joue un rôle important dans la régulation du métabolisme osseux [118].

En plus de son action positive sur la synthèse osseuse, l'ET-1 inhibe la mobilité et la fonction des ostéoclastes, ce qui contribue indirectement à la maladie métastatique ostéoblastique [119].

Enfin, l'ET-1 est capable de stimuler directement la prolifération des cellules tumorales qui possèdent elles aussi des récepteurs à l'ET-1 [119].

- *uPA, PSA et PTHrP*

Des taux sériques élevés d'uPA sont associés à l'agressivité des cancers de la prostate ainsi qu'au potentiel métastatique, lui suggérant un rôle important dans la réponse ostéoblastique métastatique [120]. En effet, l'uPA induit des protéases, telles que la PSA (Prostate Specific Antigen) capable d'inactiver la PTHrP (Parathyroid Hormone-related Protein) par clivage. La PTHrP, une hormone sécrétée par les ostéoblastes, possède une grande homologie dans sa partie N-terminale avec l'hormone parathyroïdienne (PTH) lui permettant ainsi de reconnaître les mêmes récepteurs et de partager les mêmes activités biologiques [121]. La dégradation de la PTHrP empêche l'activité des ostéoclastes et protège les ostéoblastes de l'apoptose, laissant ainsi une place prépondérante à la formation osseuse au site métastatique [122].

La PSA est aussi capable d'inhiber la sécrétion de RANK-L, de stimuler la production d'OPG par les ostéoblastes et d'induire l'apoptose des précurseurs ostéoclastiques [123] [124]. Enfin on retrouve des taux circulants élevés d'OPG chez

les patients présentant un cancer de la prostate associé à des métastases ostéocondensantes suggérant que cet inhibiteur de RANK-L pourrait intervenir dans la formation de ce type de métastases en bloquant l'ostéoclastogenèse [119].

- *BMP*

D'autres facteurs pro-ostéoblastiques, comme les BMPs, ont été identifiés comme participant au processus d'ostéocondensation des métastases osseuses [125] [126]. Ainsi, l'inhibition de la voie des BMP, par Noggin ou avec un anticorps dirigé contre la BMP-6 (facteur de croissance initialement découvert pour sa capacité à stimuler la formation osseuse), inhibe la capacité des cellules tumorales, LAPC-9 et LuCap 23.1, à former des métastases ostéocondensantes chez les animaux [127] [128]. D'autre part, il a été démontré que la formation des métastases osseuses est associée à une surexpression de la BMP-7 par les cellules épithéliales néoplasiques du cancer de la prostate [129]. Or, BMP-7 est impliquée dans le processus de minéralisation normale de l'os [130]. Ces résultats suggèrent que BMP-7 produit par les cellules tumorales, pourrait intervenir dans la formation des métastases ostéocondensantes. De plus, il a été montré que la BMP-2 produite par les ostéoclastes pouvait induire la migration de cellules de cancer de la prostate en augmentant l'expression des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ [131].

- *Autres facteurs*

Le PDGF, le VEGF et les IGFs synthétisés par les cellules tumorales ou présents au site osseux exercent également une action positive sur les ostéoblastes et participent à l'établissement de métastases ostéocondensantes [126] [132]. A titre d'exemple, les cellules de carcinome mammaire MDA-MB-231 transfectées pour exprimer PDGF-BB vont former des métastases mixtes au lieu d'induire uniquement des lésions ostéolytiques [133]. On va aussi constater une diminution de la formation des métastases ostéoblastiques induites par les cellules prostatiques C4-2B dès lors que l'on traite les animaux avec un inhibiteur d'un récepteur du VEGF [134].

L'adrénomédulline (AM) est un peptide multifonctionnel qui fixe les récepteurs CRLR (Calcitonin Receptor Like Receptor) couplés aux protéines G [135]. Rocchi *et al.* ont observé une corrélation entre l'expression d'AM par les cellules tumorales

prostatiques et le degré de gravité du cancer [136]. Or il a été démontré que l'AM a une activité mitogénique sur les ostéoblastes, *in vitro* [132], ainsi qu'un rôle anti-apoptotique [137]. L'adrénomédulline pourrait donc jouer un rôle dans l'ostéocondensation.

4.1.2- Contribution du tissu osseux dans la croissance des métastases ostéocondensante

La formation des lésions ostéoblastiques est précédée par une phase de résorption osseuse qui conduit à la libération d'un grand nombre de facteurs de croissance (TGF- β , IGFs, PDGF). En plus de son activité mitogène sur les cellules tumorales, le TGF- β régule également l'expression de Runx-2 et d'ET-1, stimulant ainsi la différenciation et l'activité ostéoblastiques permettant le maintien de métastases ostéocondensantes [126]. L'uPA peut également induire l'activation du TGF β en clivant la protéine liée au TGF β et responsable de sa latence, via des protéases telles sur le PSA [138]. De plus, les IGF et les BMP libérés de la matrice osseuse ont une activité mitogénique sur les cellules tumorales et stimulent leur migration et leur invasion [128] [126].

Enfin, le calcium extracellulaire a une activité mitogénique sur les cellules tumorales d'origine prostatique. Ainsi l'inhibition par siRNA du récepteur au calcium (CaSR) exprimé par les cellules PC3 et C4-2B induit une diminution de la progression tumorale [139].

4.2- Métastases ostéolytiques

La métastase ostéolytique est la forme plus commune des métastases osseuses. De nombreux cancers induisent des métastases ostéolytiques tels que le cancer du sein, de la thyroïde ou bien des poumons. Les métastases ostéolytiques sont la résultante d'une augmentation de l'activité ostéoclastique couplée à la diminution de celle des ostéoblastes, provoquée par les facteurs sécrétés par les cellules tumorales. Cette interaction entre les cellules tumorales et l'environnement osseux est vital pour la croissance de la métastase osseuse et est appelée « cercle vicieux ». Brièvement, les cellules cancéreuses interagissent avec les ostéoblastes

induisant ainsi leur activation. Les ostéoblastes communiquent alors avec les ostéoclastes menant à la maturation ostéoclastique et par conséquent à une résorption osseuse. En retour, des facteurs de croissance emprisonnés dans la matrice osseuse sont alors libérés et sont capables d'induire la croissance et le maintien des cellules tumorales réalimentant ainsi le cercle vicieux [140] (Figure 19).

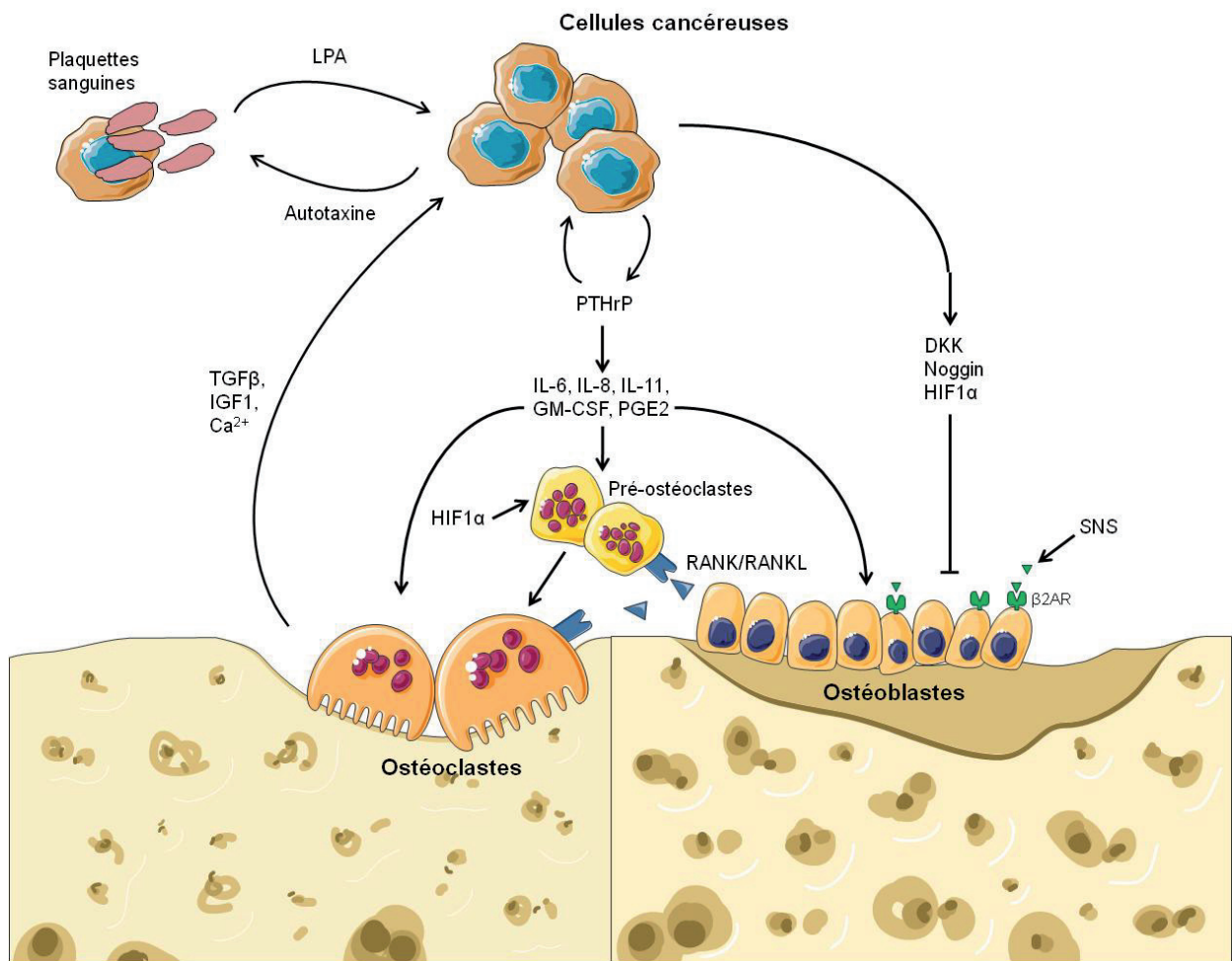


Figure 19. Représentation des interactions moléculaires entre les cellules tumorales et l'environnement osseux dans le développement des métastases ostéolytiques.

Les cellules métastatiques produisent des facteurs stimulant l'ostéoclastogénèse (PTHrP) et les ostéoblastes produisent du RANKL qui active l'ostéoclastogénèse. En retour, le TGFβ et l'IGF1 libérés de la matrice osseuse suite à l'activité résorptive des ostéoclastes, stimulent la prolifération des cellules métastatiques et induisent la production de PTHrP par les cellules tumorales. L'autotaxine produite par les cellules tumorales entraîne la production de LPA par les plaquettes sanguines, stimulant la prolifération des cellules tumorales. Il s'établit alors un cercle vicieux où la prolifération tumorale et la résorption osseuse s'entretiennent mutuellement.

4.2.1- Stimulateurs de la résorption osseuse

- *Facteurs produits par les cellules tumorales*

La *PTHrP* est considérée comme le médiateur clé de l'activation ostéoclastique et par conséquent de la destruction osseuse au site métastatique [121]. En se liant à son récepteur, le PTH-R1, ce peptide induit l'expression de RANKL et la diminution de celle de l'OPG, produits par les ostéoblastes, stimulant ainsi l'activité ostéoclastique [141]. Plusieurs études ont rapporté l'implication de la PTHrP dans les métastases osseuses ostéolytiques. Par exemple, une analyse immunohistochimique réalisée sur des coupes de tissus de cancer du sein humain a révélé une plus forte expression de la PTHrP dans les cellules malignes du site métastatique comparé à celle des cellules du site tumoral primaire [142]. Toutefois, une autre étude a démontré une corrélation positive entre une forte expression de PTHrP, dans des tumeurs de 526 patientes opérées d'un cancer du sein, et une augmentation de la survie. Ce résultat inattendu reflète la possibilité d'une distinction de l'effet de la PTHrP entre le site primaire et le site métastatique pour lesquels les microenvironnements sont très différents [143]. D'autres expériences ont montré qu'une stimulation des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 par le TGF β , l'un des facteurs de croissance le plus abondant de l'environnement osseux, augmente l'expression de la PTHrP. A l'inverse, l'expression d'une forme mutante du récepteur TGF β II dans ces cellules inhibe la synthèse de PTHrP induite par le TGF β , résultant ainsi en l'inhibition de la croissance tumorale, la répression de l'ostéolyse et finalement l'augmentation de la survie [144].

La PTHrP stimule aussi l'expression d'autres cytokines pro-ostéoclastiques telles que l'IL-6 ou LIF (Leukemia Inhibitory Factor) par les ostéoblastes [145]. Enfin, la PTHrP peut agir de manière autocrine sur les cellules métastatiques en augmentant l'expression du CTGF qui va alors stimuler l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse [146].

Plusieurs autres facteurs, tels que les *interleukines* (IL-6, IL-8, IL-11) et le *GM-CSF*, peuvent être aussi sécrétés par les cellules tumorales présentes dans l'environnement osseux et induire l'ostéolyse liée à la production de RANK-L, une

stimulation de l'ostéoclastogénèse ou une augmentation de l'activité de résorption des ostéoclastes [121].

De taux élevés d'IL6 et de son récepteur dans le sérum de patients cancéreux sont associés à un mauvais pronostic et au développement de métastases osseuses. L'IL-6 agit positivement sur la dégradation osseuse notamment en augmentant la production de RANK-L par les ostéoblastes, en induisant l'expression par les cellules tumorales de plusieurs protéines impliquées dans la résorption osseuse comme la PTHrP, IL-8, IL-11, RANK-L et COX-2 (Cyclooxygenase-2) et en stimulant l'expression de DKK-1, un inhibiteur de la formation osseuse [147].

De même, l'IL-8 active les ostéoclastes en induisant la production de RANKL par les ostéoblastes et en stimulant la différenciation des précurseurs ostéoclastiques qui expriment le récepteur à l'IL-8 (CXCR1) en ostéoclastes matures [148] [149].

La surexpression d'IL-11 dans les cellules de carcinome mammaire MDA-MB-231 et MCF-7 induit une augmentation de l'incidence des métastases osseuses chez les animaux [150]. De plus, une corrélation entre le niveau d'IL-11, exprimée dans les tumeurs de patientes atteintes de cancer du sein, et la survenue ultérieure de métastases osseuses a été établie [151]. Dans leur étude, Park *et al*, ont mis en évidence que les cellules MDA-MB-231 peuvent induire une ostéoclastogénèse *in vitro*, via l'expression de GM-CSF. L'invalidation génétique de GM-CSF induit une inhibition de la formation des métastases ostéolytiques chez les animaux [152].

Enfin, une étude récente a mis en évidence que le MCP-1 produit par les cellules de cancer prostatique active la différenciation de précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes capables de résorber l'os [153].

Les cellules de carcinomes mammaires produisent également une autre classe de molécules pro-ostéoclastiques, les *prostaglandines*. La prostaglandine E2 (PGE2) stimule la résorption osseuse en augmentant l'expression de RANK-L par les ostéoblastes et en inhibant l'expression d'OPG [154]. L'expression de PGE2, par les cellules tumorales, est sous le contrôle de COX2. Son inactivation dans les cellules MDA-MB-231 bloque la progression des métastases osseuses chez les animaux [154]. Ainsi, un traitement avec des inhibiteurs de COX-2 (NS-398, MF-tricyclic) inhibe la formation des métastases osseuses induites par les cellules tumorales d'origine mammaire [154] [155].

D'autres événements cellulaires peuvent survenir au cours de la mise en place de la métastase osseuse et conduire à la production de facteurs pro-ostéolytiques par les cellules tumorales. Les cellules tumorales présentes dans l'environnement osseux produisent une enzyme, l'autotaxine, qui lors de l'agrégation plaquettaire convertit le LPC (lysophosphatidylcholine) relargué par les plaquettes sanguines en acide lysophosphatidique (LPA) [156]. Le LPA exerce une action mitogène sur les cellules tumorales et stimule la production par ces cellules des facteurs pro-ostéolytiques IL-6 et IL-8, favorisant ainsi la progression de l'ostéolyse [157] [158].

- *L'hypoxie*

Les microenvironnements hypoxiques, tels que l'os, favorisent la croissance tumorale ainsi que le développement des métastases [159]. Comme décrit précédemment (chapitre 2.2.2.1 cellules souches hématopoïétiques), l'un des médiateurs majeurs de la signalisation hypoxique est le facteur de transcription HIF1 α . En conditions hypoxiques, HIF1 α s'accumule dans le cytoplasme avant d'être transloqué dans le noyau où il s'hétérodimérise avec HIF β pour se fixer ensuite sur l'élément de réponse HRE (Hypoxia-Response Element) présent sur les promoteurs de gènes cibles de l'hypoxie tels que le VEGF, IGF-2 ou CXCR4, gènes impliqués dans la colonisation métastatique de l'os, suggérant alors un rôle de l'hypoxie dans le développement métastatique [160]. HIF1 α a été retrouvé surexprimé dans les régions métastatiques, telles que l'os ou les ganglions lymphatiques, de divers cancers. Par exemple, dans le cas du cancer du sein, une augmentation d'HIF1 α est observée dans 69% des métastases contre seulement 29% des tumeurs primaires [161].

L'hypoxie et HIF1 α jouent également un rôle sur la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique. Ainsi, une surexpression d'HIF1 α diminue fortement la différenciation des ostéoblastes, tandis qu'il induit une augmentation la formation ostéoclastique. L'hypoxie contribue donc au développement des métastases ostéolytiques en inhibant la formation des ostéoblastes et en favorisant la différenciation des ostéoclastes. HIF1 α semble donc être une cible thérapeutique non négligeable [162]. En effet, des études ont montré que l'inhibition génétique et

pharmacologique d'HIF1 α diminuait significativement les étendues des plages d'ostéolyses [163].

- *Le système nerveux périphérique*

Des signaux hypothalamiques afférents stimulent le récepteur adrénergique β 2 (β 2AR) exprimé par les ostéoblastes *via* la stimulation de neurones sympathiques résultant en l'inhibition de la formation osseuse par les ostéoblastes et en l'augmentation de la résorption osseuse des ostéoclastes [164]. Un effet direct du système nerveux sympathique (SNS) sur les progéniteurs des ostéoblastes et/ou ostéoclastes n'a pas encore été démontré. Cependant, il est possible que le SNS affecte la résorption osseuse *via* la phosphorylation d'ATF4 (Activating Transcription Factor 4) et éventuellement *via* l'expression ostéoblastique du RANKL.

4.2.2- Inhibiteurs de la formation osseuse

- *Dickkopf-1*

L'inhibition de l'activité des ostéoblastes est liée à la production par les cellules tumorales d'une protéine soluble, Dickkopf-1 (DKK-1) qui bloque l'activité des protéines de la famille Wnt sur les ostéoblastes. DKK-1 empêche la fixation de Wnt à son récepteur Frizzled (Fzd) en formant un complexe trimoléculaire avec le co-récepteur LRP5/6 (Low density Lipoprotein Receptor related Protein 5/6) et une autre protéine transmembranaire : Kremen (Krm) [165].

Une étude immunohistochimique réalisée sur des adénocarcinomes de la prostate montre que DKK-1 n'est pas exprimée dans les tumeurs primitives, ni dans les métastases osseuses ostéocondensantes ou mixtes, mais uniquement dans les cellules métastatiques lorsque la métastase est de nature ostéolytique [166]. Par contre, DKK-1 est exprimée dans la plupart des adénocarcinomes mammaires hormonaux-indépendants ainsi que dans une lignée humaine hormonaux-indépendante de cancer du sein MDA-MB-231 qui induit des lésions ostéolytiques chez les animaux [126].

- *Noggin*

Les cellules tumorales (sein, prostate) capables d'induire des lésions ostéolytiques chez les animaux produisent non seulement DKK-1, mais également un facteur soluble Noggin [167]. Noggin est une protéine antagoniste des BMPs qui interagit directement avec les BMPs ou leurs récepteurs présents à la surface des ostéoblastes [168] [169], ce qui conduit à l'inhibition de la translocation nucléaire des protéines intracellulaires Smad1 et Smad5 connues pour stimuler l'expression des gènes codant pour les facteurs de transcription Runx-2 et Ostérix. Ainsi, en bloquant la fixation des BMP à leur récepteur, Noggin inhibe la transcription des gènes pro-ostéoblastiques [126].

L'expression *de novo* de Noggin dans les cellules prostatiques C4-2B et LAPC-4 qui forment normalement des métastases malignes ostéocondensantes, inhibe la formation de ce type de métastases osseuses [128].

4.2.3- Contribution du tissu osseux dans la croissance des métastases ostéolytiques

Le tissu osseux contribue directement à la croissance tumorale en libérant lors de l'ostéolyse des facteurs tels que le TGF- β , les IGF et du calcium ionisé [65].

- *TGF β*

Le TGF- β lorsqu'il est libéré se fixe à des récepteurs de haute affinité dits de type II, présents à la surface des cellules tumorales, permettant ainsi de stimuler l'expression de protéines pro-ostéoclastiques (PTHrP, IL-8, IL-11, PGE2) en activant la voie de signalisation dépendante des protéines Smads [154]. Il a été démontré que la transfection d'un récepteur T β RII dominant négatif inhibe l'expression de PTHrP par le TGF- β , *in vitro*, et inhibe le développement des métastases osseuses induites par les cellules tumorales MDA-MB-231 [144]. De plus, l'invalidation de Smad4 ou la surexpression de Smad7 (inhibiteur des protéines Smad2/3) dans les cellules tumorales, bloque l'expression de PTHrP et d'IL-11 et inhibe la formation des métastases osseuses *in vivo* [170] [171].

- *IGF*

Les IGF1 et 2 sont des facteurs de croissance stockés dans la matrice osseuse. Les récepteurs aux IGF présents à la surface des cellules cancéreuses stimulent l'angiogenèse, la prolifération et l'invasion cellulaire, et ils transmettent également un signal anti-apoptotique [172]. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les IGFs 1 et 2 bloque la prolifération de cellules de carcinome mammaire au cours de la résorption osseuse et inhibe la formation des métastases osseuses induite par les cellules tumorales d'origine prostatique [173].

- *Calcium*

Le calcium est le principal cation inorganique présent dans la matrice osseuse. Une résorption ostéoclastique active peut conduire à une augmentation de la concentration de calcium jusqu'à 40 nmol/L [172]. Le principal rôle physiologique des récepteurs au calcium est le contrôle de l'homéostasie du calcium : lorsque la calcémie est trop élevée, les récepteurs au calcium vont entraîner une inhibition de la sécrétion de la PTH, diminuant ainsi l'action des ostéoclastes.

Dans un contexte de métastases osseuses, l'augmentation de la concentration en calcium module la sécrétion de PTHrP, par les cellules tumorales, augmentant ainsi la résorption osseuse [174]. De plus, le calcium fixé au récepteur CaR exprimé par les ostéoclastes et les précurseurs ostéoclastiques, permet de stimuler la différenciation des ostéoclastes. Le mécanisme par lequel le calcium stimule l'ostéoclastogenèse n'est pas connu. Cependant, il a été démontré que le calcium induit la translocation nucléaire de NFκB dans les ostéoclastes [175].

Par ailleurs, le récepteur au calcium (CaR) est fortement exprimé dans les cellules cancéreuses de cancer du sein chez les patientes atteintes de métastases osseuses [176]. De plus, il a été observé que le Ca^{2+} stimule la prolifération des cellules de carcinome prostatique PC-3 et C4-2B qui sont respectivement ostéolytiques et mixtes [139].

Par conséquent, l'augmentation de la concentration en calcium dans l'environnement osseux permet de stimuler à la fois la prolifération des cellules tumorales et la résorption osseuse *via* la surexpression de PTHrP par les métastases osseuses et une stimulation directe de l'ostéoclastogenèse.

Facteur	Source	Cible	Effet sur la cible
PTH	sérum	OB	↑ RANKL
PTHrP	CC	OB	↑ RANKL
COX2/PGE2	OB, CC	OB, CC	OB : ↑ RANKL, CC : ↑ MMP
IL11	OB	OB	↑ RANKL
IGF	sérum	OB	↑ RANKL
TGFβ	OB, CC, matrice	OB, CC	OB : ↑ COX2, cytokines, CC : ↑ PTHrP
PDGF	OC, CC, plaquettes	OB	↑ prolifération, ↓ différenciation, adhésion
Vitamine D / Calcium	sérum	OB	↑ RANKL (si déficient)
RANKL	OB	OC	↑ ostéoclastogénèse
OPG	OB	OC	↓ ostéoclastogénèse
IL6	OB, CC	OC	↑ ostéoclastogénèse
IL8	OB, CC, CE, monocytes	OC	↑ activation OC
M-CSF	OB, CC	OC	↑ ostéoclastogénèse
MCP1	OB, CC	OC	↑ ostéoclastogénèse
VEGF	OB, CC, CE	OC	↑ Formation OC
MMP	OB, CC, CE	matrice	dégradation matrice
Cathepsine K	OC	matrice	dégradation matrice

Tableau 3. Facteurs impliqués dans la formation des métastases ostéolytiques.

CC = cellule cancéreuse, CE = cellule endothéliale, OB = ostéoblaste, OC = ostéoclastes. IGF = Insulin-like Growth Factor, MCP1 = Monocyte Chemotactic Protein, M-CSF = Macrophage Colony-Stimulating Factor, MMP = Matrix MetalloProteinase, OPG = Osteoprotegerin, PDGF = Platelet-Derived Growth Factor, PG = Prostaglandin, PTH = Parathyroid Hormone, PTHrP = Parathyroid Hormone-related Protein, RANK = Receptor Activator for NF_κB, RANKL = Receptor Activator for NF_κB Ligand, TGF = Transforming Growth Factor, VEGF= Vasuclar Endothelial Growth Factor [177].

5- Les stratégies thérapeutiques médicamenteuses

A l'heure actuelle, les métastases osseuses sont pratiquement incurables et associées à de fortes morbidité et mortalité. Les stratégies thérapeutiques actuelles réduisent la morbidité, cependant elles ne permettent ni de bloquer la colonisation de l'os par les métastases, ni de les réduire une fois établies. Pour cette raison, de nombreux traitements alternatifs sont à l'étude afin de développer de nouveaux composés ciblant l'os afin d'inhiber la formation des métastases osseuses et par conséquent les complications osseuses associées, appelées SRE (Skeletal-related events). Actuellement, la recherche se focalise sur l'interruption des interactions entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement osseux. Les agents émergents majeurs de traitement des métastases osseuses sont présentés dans le tableau 4.

Agent	Fonction	Mécanisme d'action
Bisphosphonates	Inhibent l'activité des OC en induisant leur apoptose	- BP 1 ^{ère} génération : interfèrent avec le potentiel membranaire des mitochondries entraînant leur dysfonctionnement - BP 2 ^{ème} génération : inhibent la voie du mévalonate en inhibant la farnesyl pyrophosphatase.
Dénosumab	Inhibe formation, maturation et activité OC	- Anticorps dirigé contre RANKL - Inhibe la liaison RANK/RANKL
Inhibiteurs Cathepsine K	↓ destruction osseuse réalisée par OC	- Inhibent la dégradation collagène type I
Inhibiteurs Src	Inhibent l'activité de résorption osseuse des OC	- Affectent l'intégrité morphologique des OC - ↓ prolifération, mobilité et invasion des CC - ↓ résistance des CC au signal apoptotique
Inhibiteurs Endothéline-1	Inhibent la prolifération des OB et donc formation osseuse	- Antagonistes du récepteur Endothéline 1A
Inhibiteurs CXCR4	↓ Migration et invasion CC	- Bloquent l'axe de signalisation CXCL12/CXCR4
Agents anti-TGFβ	↓ Activité OC ↑ Activité OB Inhibent migration et invasion des CC	- Bloquent cercle vicieux - Inhibent l'expression de facteurs ostéoclastogéniques
Antagonistes intégrine αvβ3	↓ Volume tumoral au site métastatique	- Bloquent l'adhésion des CC à la matrice osseuse - Inhibent l'angiogenèse
Anticorps anti-sclérostine	↑ Formation osseuse	- Inhibent la liaison sclérostine / Co-récepteurs LRP5/6

Tableau 4. Agents thérapeutiques émergents pour le traitement des métastases osseuses.

CC = cellules cancéreuses, OB = ostéoblastes, OC = ostéoclastes. CXCL12 = Chemokine C-X-C motif Ligand 12, CXCR4 = Chemokine C-X-C motif Receptor 4, LRP5/6 = Low density Lipoprotein Receptor related Protein 5/6, RANK = Receptor Activator for NFκB, RANKL = Receptor Activator for NFκB Ligand, TGF = Transforming Growth Factor [2].

● *Bisphosphonates*

Les bisphosphonates (BP) sont des substances anciennes (le premier fut synthétisé en 1865) et sont actuellement les principaux traitements des pathologies induisant une ostéolyse. Ces agents présentent une forte affinité pour l'os. Durant la résorption osseuse, les ostéoclastes ingèrent les BP, ce qui conduit à l'arrêt de l'activité ostéoclastique, inhibant ainsi la résorption osseuse. Il existe trois générations de BP, la différence entre les BP de 1^{ère} génération et ceux plus récents

se trouve principalement dans leur structure, les premiers ne contiennent pas de base azotée contrairement au nouveaux.

Suite à leur incorporation dans les ostéoclastes, les BP de 1^{ère} génération, tels que le clodronate ou l'étidronat, sont convertis en analogue de l'ATP qui interfère avec la membrane des mitochondries conduisant à leur déstabilisation, provoquant ainsi l'apoptose des ostéoclastes [178].

Les BP de 2^{ème} et 3^{ème} générations, par exemple l'alendronate, le risédronate et l'acide zolédronique, interfèrent avec la voie du mévalonate en inhibant la farnesyl pyrophosphatase. Cette enzyme est normalement responsable de modifications post-traductionnelles de certaines protéines, parmi lesquelles les GTPase, telles que Rho ou Ras, qui ne sont alors plus fonctionnelles. Or ces protéines sont essentielles pour l'intégrité structurale des ostéoclastes, leur fonction et l'inhibition de l'apoptose [178].

Des essais cliniques ont montré une réduction des taux de fractures vertébrales et non vertébrales de 40 à 50 % et de 20 à 40 % respectivement [179] [180]. L'acide zolédronique est le plus puissant des BP de dernières générations pour le traitement des métastases osseuses. En plus de diminuer l'ostéolyse, des études *in vitro* ont montré que le zoledronate induit l'apoptose des cellules cancéreuses, réduit l'angiogenèse et inhibe le développement de métastases viscérales [181].

Toutefois, il est important de noter que les BP présentent également des effets négatifs ; ils provoquent notamment d'importantes ostéonécroses de la mâchoire (qui apparaissent dans environ 5% des cas pour des patients traités pour des myélomes, cancers du sein ou de la prostate) [182].

- *Dénosumab*

Comme décrit précédemment, le système RANK/RANKL joue un rôle fondamental dans la maturation et l'activité des ostéoclastes et par conséquent dans le développement et la progression des métastases osseuses. Par conséquent, le ciblage de cette voie signalisation offre des perspectives thérapeutiques importantes. Le dénosumab est un anticorps monoclonal humain dirigé contre le RANKL et par conséquent un puissant inhibiteur de la résorption osseuse. Des études ont montré qu'une seule dose de dénosumab, injectée en sous-cutané, réduit la résorption osseuse. Cette réduction est évaluée notamment par le changement des taux de

certaines marqueurs osseux comme le N-télopeptide du collagène de type I (uNTx) [183]. Des études cliniques de phase II, chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique à l'os, et non traitées préalablement par des BP, révèlent que le dénosumab seul diminue le taux d'uNTx, de façon similaire à un traitement intraveineux par BP [184]. De plus, le dénosumab est capable de diminuer la résorption osseuse même chez des patients ayant répondu faiblement à l'administration de BP [185].

En ce qui concerne les effets négatifs de ce traitement, le dénosumab est bien toléré et les risques de SRE sont fortement diminués [184]. Cependant il provoque tout de même de graves effets délétères tels que des ostéonécroses de la mâchoire. Toutefois, une étude clinique de phase III a révélé que le dénosumab avait un potentiel anti-résorptif supérieur à celui des BP, pour des effets délétères similaires (toxicité rénale, ostéonécrose de la mâchoire, incidence SRE) [186]. Le dénosumab semble donc être un puissant anti-résorptif.

- *Inhibiteurs de la cathepsine K et Src*

La cathepsine K est une protéase produite par les ostéoclastes et responsable du clivage du collagène de type I. De récentes études ont démontré que des souris déficientes pour la cathepsine K présentaient une masse osseuse plus élevée [187]. Ces résultats sont en accord avec ceux d'études plus anciennes chez l'Homme montrant que l'inactivation, suite à une mutation dans le gène codant pour la cathepsine K, induit une pycnodysostose, une maladie autosomale récessive caractérisée par une forte ostéosclérose et d'autres déformations sévères du squelette [188]. Par ailleurs, la cathepsine K est surexprimée dans le cancer du sein, que ce soit au niveau de l'ARNm ou de la protéine [92]. La cathepsine K semble donc être une cible thérapeutique éventuelle dans le traitement des métastases osseuses. L'odanacatib, un inhibiteur de la cathepsine K, semble être un agent prometteur et plutôt bien toléré [189]. Son mécanisme d'action reste à élucider.

Src est un membre de la famille des tyrosines kinases. Ces cibles sous-jacentes sont les MAPK, PI3-K (phosphoinositide 3-kinase), NF κ B et VEGF. Src est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la prolifération et la différenciation cellulaire, l'adhésion, la migration et la survie [190]. Différentes études

ont démontré l'implication de Src dans de nombreuses tumeurs, notamment dans le cancer du sein. Une expression élevée de Src est associée à un mauvais pronostic chez des patientes atteintes de cancer du sein [191].

Src participe également à l'intégrité de la morphologie des ostéoclastes. En effet, des ostéoclastes isolés à partir de souris déficientes pour Src présentent une incapacité à former et organiser leur cytosquelette d'actine impactant ainsi sur la formation de la membrane ondulée (ou « ruffled border »), conduisant alors à la réduction de la résorption osseuse [192]. Récemment, Zhang *et al* ont mis évidence une corrélation entre l'activité de Src et la présence de métastases osseuses induites par un cancer du sein [193]. Le dasatinib est le meilleur inhibiteur de Src en clinique. Des études pré-cliniques ont montré que cet agent réduit le potentiel métastatique et induit l'apoptose de nombreuses tumeurs malignes telles que les cancers du pancréas ou du poumon [194].

- *Inhibiteurs de l'endothéline-1*

L'endothéline-1 est sécrétée par les cellules cancéreuses, de la prostate par exemple, et se lie à son récepteur ETAR présent sur les ostéoblastes, induisant ainsi une augmentation de la prolifération ostéoblastique, conduisant à l'établissement des métastases ostéocondensantes. Par conséquent, l'inhibition du récepteur ETAR semble être une approche thérapeutique judicieuse pour traiter ces métastases. L'atrasentan un antagoniste oral d'ETAR qui inhibe la formation de lésions ostéoblastiques dans des modèles d'animaux pré-cliniques mais aussi dans des essais cliniques de phases I et II [195]. Cependant, plusieurs études sur des patients atteints de cancer de la prostate montrent une inefficacité de cet agent [196]. Toutefois, un autre agent, le zibotentan (ZD4054), augmente significativement la survie et est bien toléré [197].

L'inhibition de facteurs tels que le PTHrP, CXCR4, TFG β , la sclérostine ou bien VEGF, COX2 ou Runx2 sont aussi à l'étude et des essais sur des souris ou des rats laissent entrevoir des effets prometteurs sur le traitement de ces métastases osseuses [2].

Enfin, d'autres approches thérapeutiques existent dans le traitement des métastases osseuses, comme des traitements plus locaux notamment la radiothérapie, la chirurgie ou bien la cimentoplastie. Ces derniers sont bien souvent couplés aux traitements médicamenteux.

C- Les récepteurs de guidage axonal et le tissu osseux

L'os est un organe largement innervé par le système sympathique et les nerfs sensoriels. Ces deux types de nerfs sont particulièrement abondants dans les régions de forte activité ostéogénique telles que la plaque de croissance. L'inhibition chimique, *via* la capsaïcine, chez le rat, mime une dénervation sensorielle et diminue le nombre d'ostéoclastes, tandis que la sympathectomie chimique, induite par la guanéthidine l'augmente. Ces observations suggèrent donc que l'innervation sympathique et sensorielle est requise pour la régulation du métabolisme osseux [198]. Comme décrit dans les chapitres précédents, la différenciation et la prolifération des ostéoblastes et des ostéoclastes peuvent être modulées par de nombreux facteurs transcriptionnels, cytokines, facteurs de croissance ou hormones mais aussi par des composés du système nerveux.

Les sémaphorines, les nétrines, les éphrines ainsi que les slits appartiennent à des familles de protéines sécrétées, initialement caractérisées dans le système nerveux comme des acteurs clés du guidage axonal. Cependant, de récentes études ont démontré que certains membres de ces familles contribuent au développement de différents organes. De plus, ils jouent un rôle dans la régulation des interactions cellules/cellules et cellules/matrice extracellulaire durant l'organogenèse [199]. Une analyse par RT-PCR, ELISA et western blot a démontré la présence de certaines de ces molécules de guidage axonal, telles que les neurotrophines, les sémaphorines de classe III et les nétrines, dans les cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques humaines, suggérant ainsi une possible régulation neuronale du métabolisme osseux [200].

1- Sémaphorines / Plexines, Neuropilines

Les sémaphorines sont des molécules de signalisation, initialement décrites comme impliquées dans le guidage axonal. Elles sont divisées en huit classes dont cinq (classes III-VII) sont largement exprimées dans les tissus des mammifères. Les récepteurs des sémaphorines sont les plexines. Cependant, les sémaphorines de classe III ont pour récepteur un hétérodimère composé d'un récepteur plexine et d'un co-récepteur tel que la neuropiline. Seule la Sema-3e est capable de se lier aux

plexines, sans l'intervention des neuropilines. La Sema-3e se lie à la plexine D1. Enfin la sémaphorine 7 peut se lier à la sous-unité β des intégrines.

Delorme *et al* ont démontré, par RT-PCR quantitative, la présence de l'ARNm Sema-7A à toutes les étapes de la différenciation et de la maturation des ostéoblastes. La Sema-7A est aussi exprimée dans les ostéoclastes, plus précisément durant la phase de différenciation ostéoclastique. L'ajout de Sema-7A à une culture ostéoclastique *in vitro* augmente la fusion des noyaux des pré-ostéoclastes. De plus, la Sema-7A induit la migration des cellules pré-ostéoblastiques MC3T3, via la voie des MAPK. Sema-7A joue donc un rôle dans la différenciation des cellules osseuses [201].

Les sémaphorines de classes III sont exprimées par les ostéoblastes de souris et sont régulées de façon différentielle par la croissance et la différenciation cellulaire. Ainsi l'expression de Sema-3d augmente durant la prolifération tandis que celle de la Sema-3e diminue. L'expression de la Sema-3a n'est pas affectée par la densité cellulaire, mais augmente dans des cultures d'ostéoblastes minéralisés. L'expression de ces sémaphorines est aussi régulée différemment suivant les stimuli ostéogéniques utilisés : l'inhibition de la GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β), qui phosphoryle la β -caténine induisant ainsi sa dégradation, diminue l'expression des Sema-3a et 3e, tandis que la 1.25-dihydroxyvitamine D3, qui induit la prolifération et la différenciation des ostéoblastes *in vitro*, augmente l'expression de la Sema-3e. La PTH n'a aucun effet sur leur expression. De plus, les ostéoblastes, les macrophages et les ostéoclastes expriment le récepteur de la Sema-3e, la plexine D1, ce qui suggère un rôle auto et paracrine de la Sema-3e. De plus, la Sema-3e inhibe la migration des ostéoblastes *in vitro* et diminue la formation d'ostéoclastes à partir de cultures de macrophages. Les sémaphorines de classe III sont donc exprimées par les ostéoblastes et régulées différemment suivant la différenciation, la minéralisation et les stimuli ostéogéniques. Par ailleurs, l'expression des Sema-3a, 3b, de la neuropiline1 (NRP1), des plexines A1 et A2 ainsi que de la plexine D1 a été observée dans des cellules ostéoblastiques primaires mais aussi dans des ostéoblastes en culture. Les ostéoclastes, quant à eux, n'expriment que les récepteurs. Sema-3e, produit par les ostéoblastes, peut donc agir de façon autocrine pour inhiber la migration des ostéoblastes mais aussi agir comme un régulateur paracrine sur les ostéoclastes en inhibant leur formation *in vitro*. De plus, l'expression

de la NRP1 n'est pas détectée dans les ostéocytes, suggérant que l'expression de la NRP1 est diminuée durant la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes [202].

Il a été démontré que la Sema-3a possède un rôle ostéoprotecteur. En effet elle peut à la fois supprimer la résorption osseuse induite par les ostéoclastes mais aussi augmenter la formation osseuse par les ostéoblastes. La liaison de la Sema-3a à son récepteur NRP1 inhibe la différenciation ostéoclastique induite par le RANKL. De plus, cette interaction stimule les ostéoblastes et inhibe la différenciation des adipocytes via la voie de signalisation canonique Wnt/ β -caténine [203].

En plus d'être innervé, l'os est un tissu richement vascularisé. Les neuropilines NRP1 et 2 sont des récepteurs transmembranaires pouvant aussi lier certaines formes du VEGF et sont impliqués dans l'angiogenèse. Une étude a démontré que les cellules de la moelle osseuse sont recrutées sur les sites de néo-angiogenèse *via* la NRP1. Ces cellules sont essentielles pour la maturation de l'endothélium et la formation des artères chez la souris. L'isoforme 165 du VEGF, qui active l'endothélium, permet le recrutement de cellules myéloïdes NRP1⁺. L'isoforme tronqué 121 du VEGF ne se lie pas au NRP1, ce qui empêche le recrutement des cellules myéloïdes. La sémaphorine 3a permet, quant à elle, d'attirer les cellules mais inhibe l'activation de l'endothélium, par compétition avec le VEGF. Les cellules de la moelle osseuse ne sont pas artériogéniques, elles-mêmes, cependant elles contribuent à la formation des artères en étant incorporées dans la nouvelle formation vasculaire mais aussi en contribuant, de façon paracrine, à l'activation et la prolifération du tissu musculaire lisse environnant. La formation de nouvelles artères repose donc sur deux processus essentiels : la stimulation de l'endothélium local, *via* les récepteurs du VEGF, et le recrutement de cellules myéloïdes circulantes *via* le NRP1 [204].

2- Nétrines / DCC

Les nétrines appartiennent à une famille de protéines sécrétées hautement conservée et dont la structure est similaire aux laminines. Chez les mammifères, il existe trois membres : nétrine 1, 3 et 4. Les nétrines induisent des signaux de guidage axonal bidirectionnels, en attirant certains axones et en repoussant d'autres.

Ces phénomènes d'attraction et de répulsion sont transmis via leurs liaisons aux récepteurs DCC (Deleted Colorectal Cancer) et UNC5 (Uncoordinated five). La famille des DCC contient les récepteurs DCC et neogenine, tandis que celle des UNC5 contient quatre membres UNC5A à D. Les signaux d'attractions sont induits par les récepteurs DCC, tandis que ceux de répulsion sont dus aux homodimères de UNC5 ou aux hétérodimères UNC5/DCC. Les nétrines et leurs récepteurs exprimés dans plusieurs tissus non neuronaux, notamment dans les cellules endothéliales.

Une analyse par RT-PCR a démontré la présence du transcrit de DCC dans le tissu osseux sain avec une faible variation entre les individus. Une réduction, voire une perte, de l'expression du gène DCC est observée dans la majorité des ostéosarcomes humains de haut grade et dans les lignées cellulaires dérivées des ostéosarcomes. DCC est souvent considéré comme un gène suppresseur de tumeur. Dans la plupart des cancers humains, les gènes suppresseurs sont inactivés. De nombreux mécanismes ont été décrits pour cette suppression, tels que les mutations, les délétions chromosomiques, les réarrangements et les insertions. Cependant, le mécanisme par lequel l'expression de DCC est réprimée n'est pas encore connu dans le cas des ostéosarcomes [205].

3- Ephrines / Eph récepteurs

Les récepteurs Eph appartiennent à la sous-famille des récepteurs à tyrosines kinases et sont activés par les ligands appelés éphrines. Les récepteurs Eph et leurs ligands sont tous divisés en deux groupes A et B. Généralement, les récepteurs EphA (EphA1-A8, A10) interagissent avec les ligands éphrines A (A1-A5) et les EphB (EphB1-B6) avec leurs ligands éphrines B (éphrines B1-B3). A l'exception de l'EphA4 qui se lie à l'éphrine B2, B3 et A5. L'interaction Eph/Ephrine a lieu à la surface des cellules et entraîne un signal bidirectionnel : le premier signal se fait *via* le récepteur Eph, le second *via* l'éphrine. Le signal « sens » dépend à la fois de l'activité kinase du récepteur Eph et du signal indépendant de la kinase, tandis que le signal « anti-sens » dépend principalement de l'activité des kinases de la famille Src. Dans la communication entre les neurones et la glie, les artères et les veines et d'autres types cellulaires, l'activation du signal due à l'interaction Eph/Ephrine peut altérer l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire.

Les cellules osseuses telles que les chondrocytes, les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes expriment les ligands éphrines ainsi que leurs récepteurs. Les interactions Eph/Ephrine peuvent moduler l'équilibre ostéoclastes-ostéoblastes et conduire à deux effets opposés (Figure 20) : stimulateur ou inhibiteur, suivant le couple considéré. Ainsi, le couple éphrine B avec son récepteur EphB possède un rôle stimulateur sur les ostéoblastes, tandis que le couple éphrinesA/EphA2 constitue un couple inhibiteur. En effet, l'éphrine B2 est exprimée par les ostéoclastes en cours de différenciation et matures, tandis que l'éphrine A2 est exprimée par les précurseurs des ostéoclastes. Les récepteurs EphB4 et EphA2 sont exprimés par les ostéoblastes. Le signal « sens » induit par l'interaction éphrineB/EphB4 supprime l'activité de la protéine RhoA et par conséquent stimule la différenciation ostéoblastique. A l'opposé, le signal induit *via* l'interaction éphrineA2/EphA2 augmente l'activité de la protéine RhoA et inhibe la différenciation ostéoblastique. La régulation différentielle de RhoA par EphB4 et EphA2 reste non éclaircie.

Le signal « anti-sens » induit par le ligand éphrine B2 supprime l'activité des facteurs de transcription tels que *c-fos* ou *Nfact1* (Nuclear Factor of Activated T-cells, cytoplasmic 1), ce qui entraîne l'inhibition de la différenciation des ostéoclastes, tandis que l'éphrine A2 conduit à une stimulation de cette différenciation, *via* l'activation de la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2). Les éphrines et leurs récepteurs jouent donc un rôle important dans le remodelage osseux. Par conséquent, ces protéines modulent probablement les conditions pathologiques dans l'arthrose, l'arthrite rhumatoïde ou bien les ostéosarcomes [206].

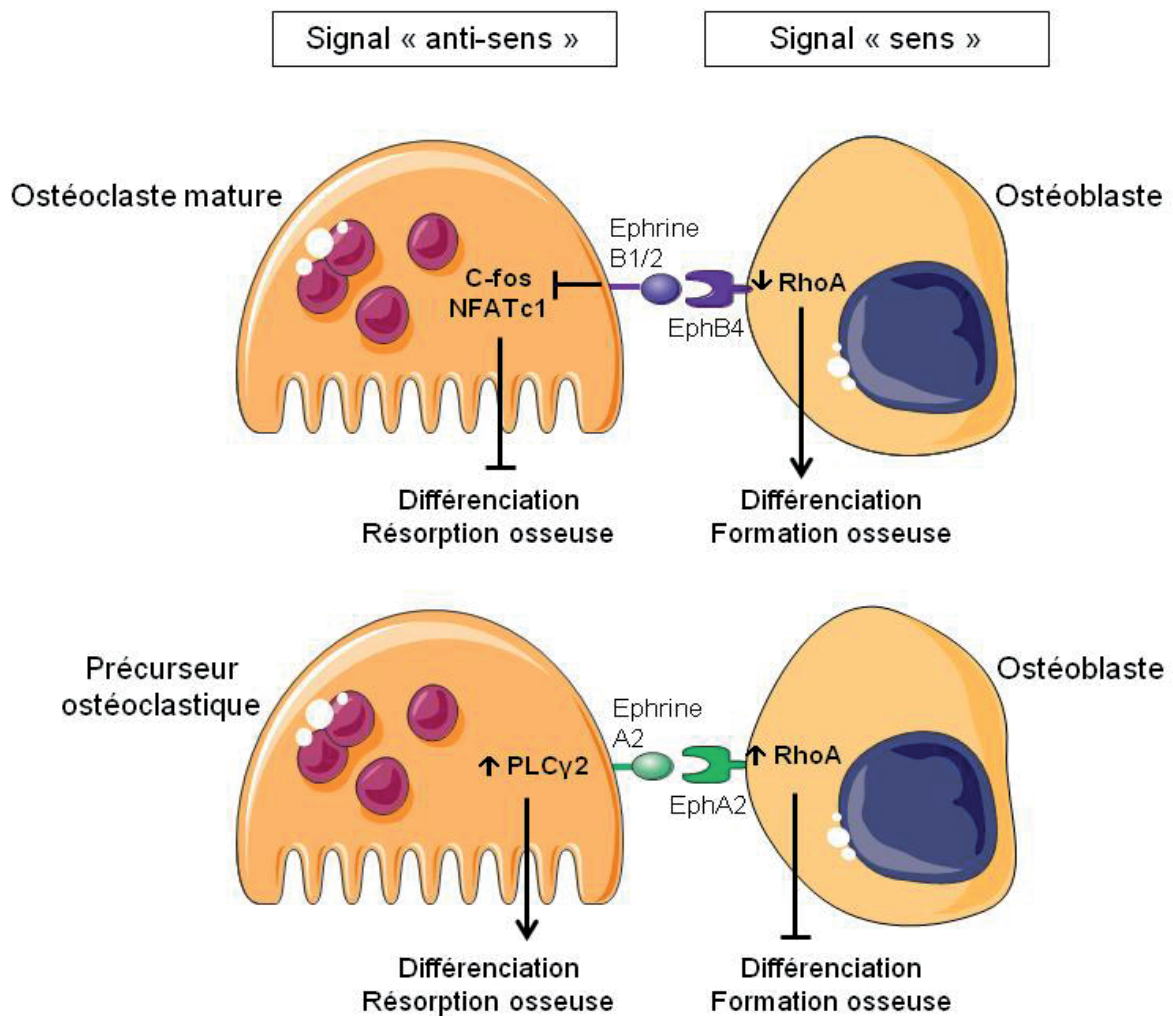


Figure 20. Interaction ostéoclaste-ostéoblaste via la voie de signalisation éphrines/Ephs.

Dans le remodelage osseux, l'éphrine B1/2 est considérée comme un acteur stimulateur. Dans ce cas, le signal bidirectionnel entre l'éphrine B1/2 portée par l'ostéoclaste mature et son récepteur ostéoblastique EphB4 supprime la résorption osseuse et augmente la formation osseuse, ce qui facilite la transition entre ces deux états lors du remodelage. A l'inverse, l'éphrine A2 est considérée comme un acteur inhibiteur, puisque le signal « anti-sens » de l'éphrine A2 dans les précurseurs ostéoclastiques augmente l'ostéoclastogenèse et donc la résorption osseuse, tandis que le signal « sens » du récepteur EphA2 supprime la formation osseuse et la minéralisation.

Le ligand éphrine B1 présent à la surface des cellules myéloïdes diminue la différenciation ostéoclastique et ainsi la résorption osseuse. En effet, des souris éphrine B1^{-/-} présentent une réduction du volume trabéculaire, du nombre et de

l'épaisseur des travées due à une augmentation de l'activité des ostéoclastes et donc de la résorption osseuse. De plus, un traitement des précurseurs ostéoclastiques sains avec une protéine Fc-éphrineB2 augmente la formation des ostéoclastes et de leur activité. Ce même traitement sur des précurseurs déficients en éphrine B1 entraîne peu d'effet sur la différenciation des ostéoclastes. De plus l'activation de l'éphrine B1, par un traitement avec une protéine chimère du récepteur EphB2, un Fc-EphB2, conduit à l'inhibition des ARNm TRAP, cathepsine K et NFATc1 exprimés par les ostéoclastes dérivés de souris sauvages. Par contre, aucun effet n'est observé sur ces ARNm d'ostéoclastes issus des souris éphrine B1^{-/-}. De plus, un traitement des ostéoclastes par le Fc-EphB2 diminue la phosphorylation des protéines de la famille des ERM (ezrine/radixine/moesine). Les cellules myéloïdes produisent donc de l'éphrine B1 qui est un régulateur négatif de la résorption osseuse *in vivo*. Cette activité inhibitrice de l'éphrine B1 a lieu, *in vitro*, par des mécanismes impliquant l'inhibition de l'expression de NFATc1 et la modulation du statut de phosphorylation des protéines de la famille ERM [207].

4- Slit / Robo

Les protéines Slit sont des glycoprotéines sécrétées dont les principaux récepteurs sont les protéines Robo (Roundabout). Les protéines Slit ont été initialement découvertes chez la drosophile et sont principalement connues pour leur implication dans le guidage axonal et ainsi dans le développement neuronal. Chez les mammifères, il existe trois protéines Slit (1-3) ainsi que quatre récepteurs Robo (1-4).

Il a été démontré que les ARNm Slit2, Robo1 et Robo2 sont exprimés à la fois par des lignées cellulaires primaires de rat (ostéoblastes et cellules souches mésenchymateuses) mais aussi par des lignées cellulaires ostéoblastiques de souris (MC3T3-E1 et C3H10T1/2) durant la différenciation ostéoblastique *in vitro*. De plus, un traitement de ces cellules par addition de Slit2 exogène inhibe cette différenciation ostéoblastique. A l'inverse, l'inhibition de Slit2, par l'utilisation d'un antagoniste HA-roboN qui représente la partie extracellulaire de Robo1, augmente la différenciation ostéoblastique. Le traitement des ostéoblastes avec un milieu conditionné contenant du Slit2 entraîne une modification de la forme cellulaire des

ostéoblastes, les faisant passer d'une forme aplatie à allongée. Plusieurs études ont montré que la forme des cellules pouvait intervenir dans la différenciation cellulaire. Ainsi Slit2 intervient dans la différenciation ostéoblastique également en modulant la forme cellulaire des ostéoblastes. Très souvent, la forme cellulaire régule le changement de différenciation en modulant la voie endogène RhoA/ROCK. Cependant, l'effet inhibiteur de Slit2 est indépendant de cette voie de signalisation [208].

Slit2 joue donc un rôle important dans la régulation de la différenciation des ostéoblastes, ce qui ouvre une nouvelle voie d'étude dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation ostéoblastique et donc dans le remodelage osseux.

Comme décrit dans la partie « 2.2.2.1 cellules souches hématopoïétiques », une récente étude a mis en évidence la coopération de Robo4 avec CXCR4 dans le maintien des HSC dans la niche osseuse [42]. Une hypothèse en faveur de cette coopération serait que Slit2 pourrait coopérer avec CXCL12 afin de maintenir spécifiquement les HSC au niveau de la niche. Une étude récente a en effet montré que Slit2 et CXCL12 sont exprimés par les cellules mésenchymateuses souches et les populations cellulaires ostéoblastiques, tandis que l'expression de Robo4 est limitée aux cellules endothéliales. De plus l'expression de Slit2 et CXCL12 est régulée de façon dynamique au sein de la niche osseuse. En effet, suite à des irradiations de la moelle osseuse, l'importante perte cellulaire est accompagnée d'une augmentation de l'expression de Slit2 et CXCL12, probablement dans un mécanisme de compensation. L'augmentation de l'expression de Slit2 suite aux irradiations se produit dans une population de cellules stromales non adhérentes tandis que CXCL12 est surtout exprimé par les cellules adhérentes. Toutefois, les schémas d'expression de Slit2 et CXCL12 dans la niche osseuse sont très proches, ce qui suggère un rôle fonctionnel similaire pour ces deux ligands, ce qui est en accord avec le rôle coopératif de leur récepteur précédemment décrit. Slit2 pourrait donc jouer un rôle important dans le maintien des HSC au sein de la moelle osseuse en interagissant avec Robo4 exprimé par les HSC, renforçant ainsi la fonction de l'interaction CXCL12/CXCR4 [209].

Les différentes molécules et récepteurs de guidage axonal peuvent donc intervenir à différentes étapes de la physiologie osseuse comme le remodelage osseux en contrôlant aussi bien la différenciation des ostéoclastes et ostéoblastes que leur activité.

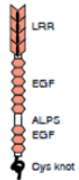
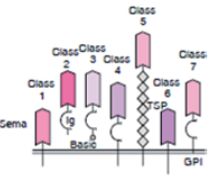
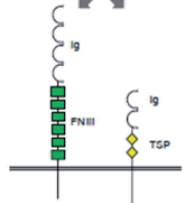
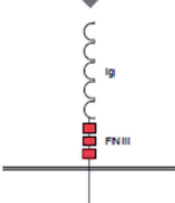
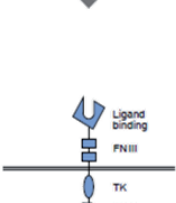
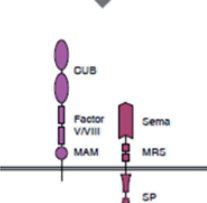
A Ligands	 Nétrines	 Slits	 Ephrines	 Sémaphorines
Récepteurs	 DCC UNC5	 Robo	 Eph	 NRP Plexines
Réponses	Attraction (répulsion) Répulsion	Répulsion	Répulsion	Répulsion (attraction)
B Rôle dans le tissu osseux	- ARNm DCC dans os sain - Perte d'expression du gène DCC dans ostéosarcomes	- ARNm Slit2, Robo1, Robo2 dans OB - Slit2/Robo1 inhibe la différenciation ostéoblastique - Coopération Robo4/CXCR4 maintien les HSC dans la niche osseuse	- Ephrines et récepteurs Ehp exprimés par les OC, OB, ostéocytes - EphrineB/EphB favorise la différenciation OB tandis que EphrineA/Eph A l'inhibe	- ARNm Sema7A à toutes les étapes de la différenciation des OB - Sema7A augmente fusion des noyaux des pré-OC et la migration des pré-OB -Sema 3a : rôles ostéoprotecteur
C Rôle dans les cancers	- DCC est un suppresseur de tumeur [314] - Nétrine1 favorise l'invasion cellulaire et l'angiogenèse via les voies RhoA, Cathepsine B et CREB dans les glioblastomes [312] - Par son action autocrine, la nétrine inhibe la mobilité des cellules de gliomes [315]	- Dérégulés dans de nombreux cancers - Slits et Robo1 : gènes suppresseurs de tumeurs -Slit2/Robo1 favorise la migration cellulaire dans cancer du sein -Robo4 est impliqué dans l'angiogenèse	- Surexpression dans cancers associée à la croissance et l'angiogenèse tumorale, l'invasion et métastases[311] - Taux élevé de EphA2 favorise la malignité des cellules tumorales en interagissant avec ErbB2 et EGFR [311]	- Sémaphorines pro-tumorales (ex : Sema3C) favorisent survie, invasion et métastases mais aussi angiogenèse - Sémaphorines suppressives de tumeurs (ex : Sema3B) les inhibent - Certaines sémaphorines sont impliquées dans la résistances aux thérapies [313]

Tableau 5. Bilan fonctionnel des récepteurs de guidage axonal.

D- Les récepteurs de guidage axonal Roundabout

L'existence des molécules de guidage axonal a été proposée par Raymon et Cajal à la fin des années 1800, cependant une centaine d'année aura été nécessaire avant leur identification moléculaire. Comme leur nom l'indique, ces molécules sont impliquées dans la migration des neurones et de leurs axones au cours du développement du système nerveux. Comme nous l'avons vu précédemment, ces molécules peuvent aussi intervenir dans divers autres processus, notamment dans le remodelage osseux.

Parmi ces molécules de guidage axonal, la voie de signalisation Slit/Robo constitue une petite famille de facteurs. Initialement identifiés comme facteurs de répulsion, ces protéines jouent un rôle crucial en inhibant le franchissement de la ligne médiane de façon inappropriée par des neurones commissuraux. Les membres de cette famille sont maintenant également identifiés comme des régulateurs clés dans de nombreux processus cellulaires dans divers tissus tels que le sein, le cœur, le poumon ou bien les reins. Ils sont aussi impliqués dans plusieurs pathologies telles que les cancers ou bien l'inflammation, c'est pourquoi la compréhension de leurs structures et activités est importante à éclaircir.

1- Les récepteurs Robo et leurs ligands

1.1- Structure des récepteurs Robo et de leurs ligands Slit

- *Les récepteurs Robo*

La famille des récepteurs Robo est très conservée au cours de l'évolution entre vertébrés et invertébrés, bien que le nombre de gènes varie selon les espèces. En effet, le nématode ne possède qu'un seul récepteur Robo (Sax-3) ; les drosophiles et le poulet en ont trois (Robo1-3) et les mammifères et le zébrafish quatre (Robo1/Dutt1, Robo2, Robo3/Rig-1 et Robo4) [210].

Les protéines Robo sont des récepteurs à une seule traversée membranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig) des CAMs (Cell Adhesion

Molécules) (Figure 21). Les protéines Robo des mammifères partagent toutes la même architecture que les CAM à l'exception du récepteur Robo4. L'ectodomaine contient cinq domaines Ig suivis de trois répétitions de fibronectine de type 3. Le domaine intracellulaire ne présente pas d'activité catalytique, cependant il peut induire un signal en aval en recrutant différents facteurs aux quatre domaines riches en proline, nommés CC0-CC3 (CC pour Cytoplasmic Conserved) [211]. Le récepteur Robo4, aussi appelé « magic roundabout » a été découvert plus tardivement et est unique d'un point de vue structural. En effet, il ne contient que deux domaines Ig extracellulaires et fibronectines et seulement deux domaines intracellulaires CC, CC0 et CC2 [212]. Il a été longtemps considéré que les différentes réponses induites par chaque récepteur Robo suite à sa liaison avec son ligand Slit étaient dues à la variation du nombre et de combinaisons des motifs CC dans la partie intracellulaire. Cependant, de récentes études montrent que les domaines extracellulaires de ces récepteurs dictent également la réponse intracellulaire. En effet, en fonction du site Ig de fixation de Slit2 sur le récepteur Robo2, différentes réponses sont transmises. Ainsi, les Ig1 et 3 sont requis pour un positionnement latéral des axones, tandis que l'Ig2 permet le franchissement de la ligne médiane. La réponse serait donc en partie due à différentes liaisons du ligand sur l'ectodomaine. Cette réponse serait également fonction de différentes multidimérisations et stoechiométries récepteur/ligand dictées par les domaines Ig [213]. Ces résultats suggèrent que le domaine cytoplasmique est important pour la réponse intracellulaire mais que la spécificité de la réponse peut être due aussi aux ectodomains. Les Ig ne serviraient donc pas uniquement à la reconnaissance des ligands.

- *Les ligands Slits*

Les protéines Slit sont des protéines sécrétées dans la matrice extracellulaire dans différents types cellulaires et tissus. Ce sont les principaux ligands des récepteurs Robo. Comme pour les protéines Robo, les protéines Slit sont très conservées parmi les vertébrés et les invertébrés et partagent un fort degré de conservation structurale. La drosophile et le nématode expriment une seule molécule Slit, tandis que chez la souris et l'Homme trois ligands Slit (Slit1-3) ont été identifiés [214].

Ces glycoprotéines Slit sont des protéines à multidomaines présentant une même structure (Figure 21) : un peptide signal en N-terminal, quatre domaines (D1-4) contenant des répétitions riches en leucine (motif LRR), sept à neuf séquences EGF (Epidermal Growth Factor), un domaine laminine G et un nœud cystéine en C-terminal. Des études structurales ont révélé que les domaines LRR contiennent chacun un motif conservé qui crée une forme concave qui serait importante pour la modulation de l'interaction entre les protéines Slit et leurs récepteurs Robo [211].

Le membre le plus étudié de la famille Slit est Slit2. Cette isoforme est la plus fréquemment exprimée dans les carcinomes [215]. Slit2 est connu pour réguler de nombreux aspects de la morphogenèse tissulaire ainsi que des fonctions cellulaires telles que la migration, la prolifération, l'adhésion et la mort cellulaire. Slit3 est impliqué dans l'angiogenèse embryonnaire ; il fonctionne comme un facteur angiogénique, en étant impliqué dans la prolifération et la motilité des cellules endothéliales, ainsi que dans la régulation de la formation du réseau vasculaire [216]. La fonction de Slit1 reste à élucider.

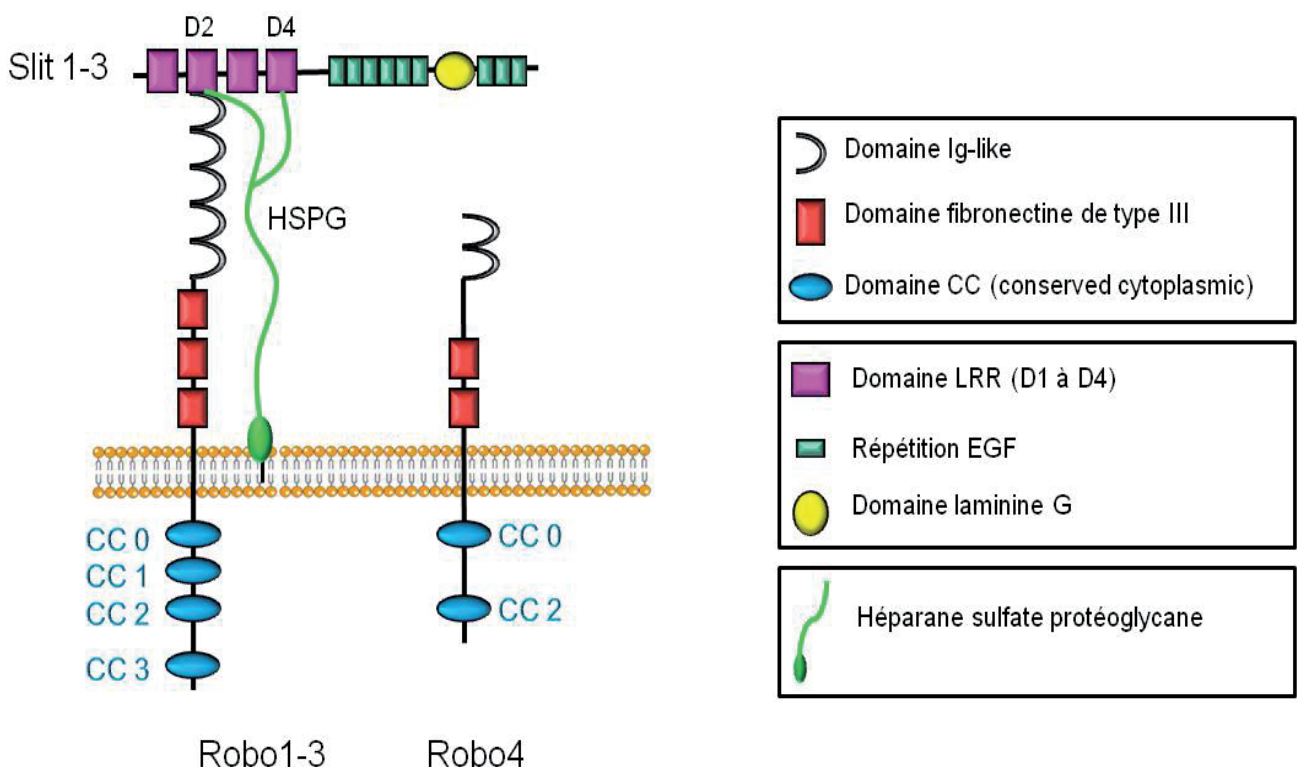


Figure 21. Structure des récepteurs Robos et de leurs ligands Slits.

1.2- Interaction Slit/Robo

Les interactions entre les protéines Slit et Robo sont très conservées au cours de l'évolution : Slit2 humain est capable de se lier au récepteur Robo1 de la drosophile avec la même affinité que pour le récepteur humain et le ligand Slit2 de drosophile peut aussi se lier aux récepteurs Robo1 et 2 du rat [217].

Des études biochimiques ont clairement démontré la liaison du ligand Slit à tous les récepteurs Robo à l'exception de Robo4. L'interaction ligand/récepteur implique le second domaine très conservé LRR (D2) de la protéine Slit ainsi que les domaines Ig1 et Ig2 des récepteurs Robo (Figure 21). Cependant, Ig1 reste le domaine privilégié d'interaction. En effet, la constante de dissociation K_d est d'environ 8nM (la liaison est donc de forte affinité) entre le domaine D2 de Slit2 et le domaine Ig1 de Robo1, tandis qu'elle ne peut être déterminée pour Ig2, sa liaison étant trop faible. La flexibilité de la liaison Ig1-Ig2 permettrait au domaine Ig2 de se lier simultanément au domaine D2 de Slit2 bien que le site primaire d'interaction soit Ig1, et participerait ainsi à la transduction du signal. Une analyse plus poussée révèle que le domaine Ig1 de Robo1 lie la face concave de la région D2 de Slit. Les domaines Ig3-Ig5 et tous les domaines FN3 de Robo1 ne semblent pas indispensables à cette liaison [211].

L'étude structurale de l'interaction Slit/Robo a révélé que ce complexe peut également interagir avec des héparane-sulfate protéoglycanes (HSPG), plus précisément *via* leur domaine héparane-sulfate (HS) (Figure 21). Ces derniers présentent une dualité de fonction. Ils participent à la stabilisation du complexe Slit/Robo en se liant au domaine D4 de Slit2. L'interaction HS/Slit2 est caractérisée par un K_d de 50nM révélant ainsi une forte affinité [218]. Hussain *et al* ont aussi démontré que l'héparine, un variant de l'héparane sulfate, se lie à Slit pour former un complexe ternaire avec Robo, augmentant ainsi de 10 fois l'affinité entre les protéines Slit et Robo. Toutefois, dans ce cas, l'héparine se lierait au domaine D2 de Slit2 [219].

Ces HSPG peuvent également participer à la fonctionnalité de la voie de signalisation Slit/Robo en jouant un rôle de co-récepteur. Seiradake *et al* ont montré que le domaine D4 de Slit2 induit un effondrement des lamellipodes au niveau du cône de croissance des axones et que cette réponse est inhibée par l'ajout d'HS

exogène [218]. Par ailleurs, des analyses biochimiques ont montré que la suppression de l'activité enzymatique de l'HS, *via* l'utilisation d'héparinases ou par mutation de son site de fixation sur Slit2, résulte en une perte de réponse des neurones à Slit2. Dans ce cas, l'héparine inhibe l'effondrement du cône de croissance des axones induit par la protéine Slit2 entière mais pas celle induite par le domaine D2 de Slit2. Par contre, l'effondrement du cône de croissance, induit par le domaine D2 de Slit2, nécessite la présence à la membrane cellulaire de l'HS ou bien d'héparine exogène [219]. L'héparine semble donc présenter une dualité de fonction dans la voie de signalisation Slit/Robo, reflétant ainsi les diverses propriétés de liaison des différents domaines de Slit2 à l'HS. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que l'interaction HS/Slit2-D4 contribue au mécanisme de signalisation de la voie Slit/Robo.

Deux mécanismes de signalisation de la voie Slit/Robo ont été suggérés. Dans le premier modèle, la liaison de Slit convertirait un monomère inactif de Robo en dimère actif. Dans ce scénario, l'HSPG serait requis pour la formation d'un complexe Slit/Robo 2:2 [210]. Dans le modèle alternatif, la liaison de Slit convertirait un dimère inactif de Robo en monomère actif. Ici, le rôle d'HSPG serait de stabiliser le complexe Slit/Robo 1:1 [219]. Dans les deux cas, la signalisation résulterait d'une modification du statut oligomérique de Robo.

Les protéines Slit ne sont pas les seuls ligands des récepteurs robo. En effet, il a été démontré que les récepteurs Robo pouvaient interagir avec la protéine LRT (LRR Tendon-specific protein), protéine riche en répétitions leucine et spécifique du tendon, favorisant ainsi la migration des cellules musculaires [220]. Le domaine riche en leucine de la LRT est similaire au domaine D2 de Slit, ce qui souligne l'importance de cette région dans l'interaction avec Robo.

Chez *Caenorhabditis elegans*, Slit1 peut se lier à la protéine transmembranaire EVA-1 (Epithelial V like Antigen-1) et contribuer ainsi au signal de guidage axonal [221].

1.3- Robo4 : un récepteur Robo non conventionnel

Robo4 est un membre de la famille des récepteurs Robo qui a été découvert plus tardivement en raison de sa faible homologie structurelle avec les autres membres. Néanmoins, Robo4 est un membre clé de l'axe de signalisation Slit/Robo, en particulier dans la vascularisation. Robo4 est en effet exprimé à la surface des cellules endothéliales et joue un rôle dans la régulation de l'angiogenèse [212]. Robo4 est considéré comme spécifiquement exprimé dans l'endothélium, toutefois une étude récente a également montré son implication au cours du développement du cerveau où il interviendrait dans le contrôle de la migration radiale des neurones nouvellement formés [222]. Robo4 possède donc probablement d'autres fonctions non encore connues.

Robo4 est unique d'un point de vue structurel. De plus, tandis que l'interaction entre les domaines extracellulaires des récepteurs Robo1-3 et le domaine D2 du ligand Slit2 a été démontrée, aucune donnée actuelle ne permet de mettre en évidence une interaction directe entre Robo4 et Slit2. En effet, Morlot *et al* ont identifié les acides aminés cruciaux dans l'ectodomaine des récepteurs Robo requis pour la liaison à Slit2 et Robo4 ne contient pas ces acides aminés [211]. Toutefois, Slit2 et Robo4 ont été coimmunoprécipités à partir de lysats cellulaires [223]. Une explication pour cette apparente association serait que dans un contexte cellulaire, Robo4 ferait parti d'un complexe protéique dans lequel un corécepteur permettrait la transmission du signal induit par la liaison avec Slit2/corecepteur/Robo4. Les protéoglycanes d'héparane sulfate semblent être de bons candidats. En effet, il a été démontré que l'héparane sulfate est nécessaire pour la signalisation Slit/Robo4 [224]. Robo1 et UNC5b pourraient également jouer le rôle de corécepteur. Des interactions Robo1/Robo4 et UNC5b/Robo4 ont en effet été mises en évidence [225] [226].

1.4- Régulation de l'expression des récepteurs Robo

Plusieurs études ont mis en évidence différentes régulations des récepteurs Robo et de leurs ligands Slit, que ce soit au niveau épigénétique, transcriptionnel ou post-traductionnel, suggérant ainsi que la régulation de ces molécules et par

conséquent de la signalisation sous-jacente qu'elles induisent, est bien plus complexe que ce qui était initialement proposé.

1.4.1- Régulations épigénétiques

Dans un contexte cancéreux, le récepteur Robo1 est retrouvé inactivé suite à une hyperméthylation du promoteur de son gène au niveau des îlots CpG. La lignée cellulaire de cancer du sein HTB-19 présente une hyperméthylation complète de ces îlots conduisant à une absence totale de la protéine Dutt1. Cette même région est retrouvée hyperméthylée dans les cancers du rein, du poumon et colorectal. Toutefois, la fréquence de ces méthylations n'est pas très élevée, elle concerne moins de 20% des cancers. Un traitement par un agent de déméthylation, le 5-aza-2'-deoxycytidine réactive le gène *Dutt1* [227] [228] [229].

Toujours dans un contexte cancéreux, le promoteur du gène *Slit2* est fréquemment retrouvé hyperméthylé. Cette hyperméthylation conduit à une inactivation du gène *Slit2*, considéré comme un suppresseur de tumeur. Cette inactivation est retrouvée dans de nombreux cancers solides tels que le cancer du poumon, du sein, colorectal ou les gliomes mais aussi dans les cancers hématologiques tels que la leucémie. La méthylation du promoteur du gène *Slit2* se produit au niveau des îlots CpG et est très conservée entre l'Homme et la souris. L'expression de *Slit2* peut être restaurée par un traitement au 5-aza-2dC. Cette méthylation étant réversible, la réactivation de ces voies par des agents de déméthylation offre donc une potentielle cible thérapeutique dans le traitement de ces cancers [229]. Les promoteurs des gènes *Slit1* et *Slit3* sont également hyperméthylés dans divers cancers [228].

L'hyperméthylation des promoteurs des gènes *Slit2* et *Slit3* peut également entraîner une diminution de l'expression du miRNA-218 ; ce microRNA est donc régulé par les gènes *Slit* (voir partie régulation post-transcriptionnelle ; régulation par miRNA-218).

1.4.2- Régulations transcriptionnelles

- *Régulation par Sox*

Une étude a récemment permis d'identifier les membres de la famille de facteurs de transcription Sox (Sry-related high mobility box) comme des régulateurs de l'expression du gène *Robo4* *in vivo*. En effet, l'expression précoce des transcrits *sox7* et *sox18* dans l'aorte dorsale du zébrafish précède celle de *robo4*. Différentes combinaisons de Robo-Sox semblent être impliquées dans le développement *in vivo* des vaisseaux intersomitiques : le couple Robo4/Sox7 interviendrait dans le développement du sommet des vaisseaux intersomitiques, alors que Robo4/Sox18 participerait à la formation de la base de ces vaisseaux. Ces deux combinaisons permettent de diriger et maintenir la formation de ces vaisseaux. Par ailleurs, les promoteurs murin et humain de Robo4 possèdent tous deux un site de liaison à Sox18. De plus, la distribution polaire des transcrits *sox* régulant celle de *robo4*, dans les vaisseaux intersomitiques, est retrouvée à la fois dans le zébrafish, la souris et l'Homme. Ces régulations sont donc très conservées. Des mutations des sites de liaison Sox sur le promoteur *Robo4* ne résultent pas en une perte complète de l'activité du promoteur dans les cellules endothéliales, ce qui suggère l'implication d'autres facteurs, en plus des protéines Sox, dans cette régulation. Il existe donc un lien entre les protéines Sox et Robo dans le développement de la vascularisation [230].

1.4.3- Régulation post-transcriptionnelles

- *Epissage alternatif*

Les transcrits primaires des gènes *Robo*, à l'exception de Robo4, peuvent être épissés différenciellement dans leur région 5', conduisant à la formation de deux isoformes distincts dans leur région N-terminale (Robo A et Robo B). L'isoforme A mature est prédit pour être plus long d'une trentaine d'acides aminés que l'isoforme B ; l'isoforme B de Robo1 est nommé Dutt1. Pour chaque récepteur Robo, la structure génomique de ces deux isoformes est conservée au cours de l'évolution ;

ces deux isoformes présentent de plus des profils d'expression différents reflétant ainsi probablement des fonctions différentes [231] [232].

- *Régulation par miR-218*

Les microRNAs (miRNA) sont de petits ARN non codants qui inhibent la traduction ou entraînent la dégradation d'ARNm en se liant généralement sur la région 3'UTR (3' Untranslated Region) de l'ARNm cible, résultant en une fine régulation de l'expression des gènes. Le miRNA-218 peut réguler la vascularisation en modulant la voie de signalisation Slit/Robo (Figure 22). Ce miRNA est codé dans un intron des gènes *Slit*. Ainsi, les gènes *Slit2* et *Slit3* codent pour le miRNA-218, qui va pouvoir directement réprimer l'expression des récepteurs Robo1 et Robo2 ainsi que les multiples composants de la voie de la biosynthèse d'HSPG. En effet, un ARN anti-sens inhibant l'activité du miRNA-218 lève la répression de Robo1 et 2 et de la protéine GLCE (HS-modifying enzyme glucuronyl C5-epimerase) responsable, entre autres, de la synthèse du HSPG. Ceci résulte en une altération de la voie de signalisation Slit/Robo et par conséquent de la migration des cellules endothéliales. Le miRNA-218 peut ainsi jouer un rôle dans l'angiogenèse de la rétine en contrôlant la densité des capillaires *via* la promotion des interconnexions vasculaires secondaires [233].

Plusieurs études ont démontré que l'inactivation des gènes *Slit2* et *Slit3* par hyperméthylation entraînait également une diminution de l'expression du miRNA-218. Ceci est le cas notamment dans le cancer gastrique métastatique, pour lequel on observe alors une levée de la répression de l'expression de Robo1, qui peut alors activer la voie de signalisation Slit/Robo1, *via* l'interaction Robo1/Slit2 induisant ainsi des métastases (Figure 22). En effet, la restauration de l'expression du miRNA-218 supprime l'expression de Robo1 et inhibe alors l'invasion des cellules tumorales et ainsi les métastases *in vitro* et *in vivo*. Robo1, en étant négativement régulé par miRNA-218, permet l'établissement d'une boucle de régulation négative entre les gènes *Slit2* et 3, Robo1 et miRNA-218. Cette boucle, lorsqu'elle est perturbée, peut contribuer à la formation de métastases, notamment suite à un cancer gastrique [234].

Une autre étude a mis en évidence un rôle du miRNA-218 dans la suppression de la progression du cancer nasopharyngiale en diminuant l'expression

de la survivine ainsi que de la voie de signalisation Slit2/Robo1 (Figure 22). Ainsi, une sous-expression du miRNA-218, suite à une hyperméthylation des promoteurs des gènes *Slit*, confère un avantage de croissance ainsi qu'une agressivité accrue des cellules NPC (Nasopharyngeal Carcinoma) à travers plusieurs mécanismes. Premièrement, la perte du miRNA-218 conduit à la surexpression d'une protéine anti-apoptotique BIRC5 (Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat-Containing 5), aussi appelée survivine. Deuxièmement, l'interaction du récepteur Robo1, ainsi exprimé par les cellules cancéreuses, avec son ligand Slit2, sécrété par les cellules neuronales, favorise alors l'invasion tumorale du tissu neuronal [6].

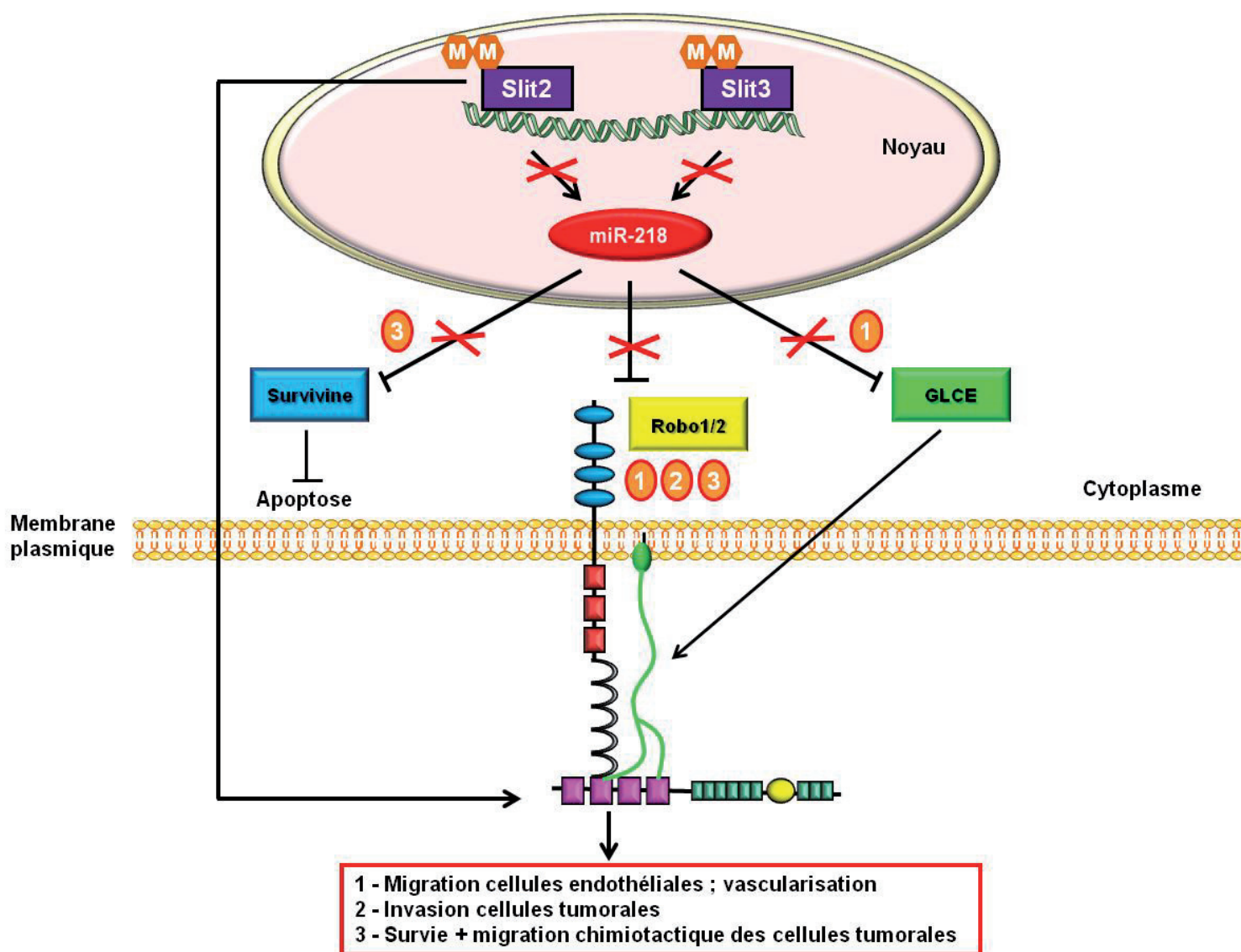


Figure 22. Modèles proposés de l'activité du miRNA-218.

1 - Mécanisme proposé de l'activité du miRNA-218 durant la formation des vaisseaux sanguins. Les gènes *Slit2* et *Slit3* codent à la fois pour un ARNm Slit2 ou 3 et un ARN miR-218. Les protéines Slit sécrétées interagissent avec leurs récepteurs Robo. Le miR-218 inhibe la synthèse des récepteurs Robo1 et 2 et de la protéine GLCE responsable de la biosynthèse du HSPG. L'interaction Slit/Robo est alors réprimée. Lors de l'hyperméthylation des promoteurs des gènes *Slit2* et 3, l'expression du miR-218 est diminuée, permettant ainsi la synthèse des récepteurs Robo1/2 et de la protéine GCLE, qui permet la biosynthèse d'HSPG stabilisant l'interaction Slit2/Robo1/2, ce qui permet alors la migration des cellules endothéliales.

2 - Robo1 est négativement régulée par le miR-218, ce qui établit une boucle de régulation négative. Dans le cancer gastrique, l'expression du miR-218 est réduite par la méthylation du promoteur du gène *Slit3* ; ce qui entraîne une levée de l'inhibition de Robo1, permettant ainsi sa liaison à son ligand Slit2 induisant alors l'invasion des cellules tumorales et par conséquent des métastases.

3 - Mécanisme proposé quant au rôle du miR-218 dans la régulation de la survie et de la migration des cellules NPC. L'hyperméthylation des promoteurs des gènes *Slit2/3* induit une perte de l'expression du miR-218, conférant ainsi un avantage sélectif aux cellules NPC à travers deux mécanismes : une augmentation de la survivine conduisant à l'inhibition de l'apoptose de ces cellules, et une synthèse du récepteur Robo1 qui peut se lier au ligand Slit2 sécrété par les cellules neuronales, favorisant ainsi la migration des cellules NPC dans le tissu neuronal.

1.4.4- Modifications post-traductionnelles

- *Clivage des récepteurs Robo et de leurs ligands Slit*

Il a été mis en évidence dans une lignée de carcinome hépatique que le domaine intracellulaire des récepteurs Robo peut être successivement clivé par des métalloprotéinases et des γ -sécrétases formant ainsi deux fragments intracellulaires distincts Robo1-CTF1 et Robo1-CTF2. De plus, l'identification de séquences signal de localisation nucléaire (NLS), au sein de ces fragments, leur suggère un potentiel rôle de facteurs de transcription, au moins dans les cellules cancéreuses. L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome, dans ces cellules cancéreuses, montre que le fragment Robo1-CTF2 est localisé exclusivement au sein du noyau, tandis que le fragment Robo1-CTF1 est retrouvé à la fois dans le cytosol, le noyau et dans la

membrane plasmique. Le clivage du récepteur Robo1 semble donc être crucial pour sa localisation et probablement pour sa fonction. Cependant, l'ablation des trois séquences NLS n'abolit pas la localisation nucléaire de ces fragments, ce qui suggère que cette localisation repose probablement sur d'autres facteurs non identifiés pour l'instant [235]. D'autres études sont donc nécessaires afin de déterminer les partenaires impliqués dans la liaison à ces fragments Robo1-CTF pour élucider les mécanismes de régulation transcriptionnelle qu'ils pourraient potentiellement induire.

Les récepteurs Robo, comme de nombreux récepteurs impliqués dans le guidage axonal, subissent également des clivages extracellulaires, générant ainsi des fragments protéiques capables de réguler un certain nombre de fonctions cellulaires telles que la migration. Ainsi, il apparaît que le clivage extracellulaire des récepteurs Robo est requis pour son activation suite à sa liaison avec le ligand Slit. En effet, l'expression d'une forme non clivée de Robo n'est pas capable d'inverser un phénotype mutant de Robo. Ce clivage extracellulaire se ferait *via* la métalloprotéinase nommée ADAM10 chez les mammifères, et Kuzbanian chez la drosophile. Ce clivage par la protéase Kuz/ADAM10 est nécessaire pour le recrutement de la protéine Sos (Son Of Sevenless) et d'autres facteurs requis pour induire les signaux de répulsion transmis par la voie de signalisation Slit/Robo à la ligne médiane [236].

Plusieurs études structurales ont montré que les protéines Slits subissaient également des modifications post-traductionnelles. Les protéines Slits sont protéolytiquement clivées au sein du cinquième domaine EGF afin de libérer un fragment N-terminal, de 140kDa, capable de se lier aux récepteurs Robo et d'induire ainsi la signalisation fonctionnelle de la voie Slit/Robo. La fonction du fragment C-terminal, de 60kDa, est pour l'instant inconnue. Il ne semble pas capable de se lier aux récepteurs Robo. La forme non clivée de Slit2, également retrouvée dans les extraits de cerveau, est aussi fonctionnelle [237].

L'ensemble de ces résultats suggère que le clivage des récepteurs Robo et de leurs ligands Slit est un mécanisme important qui régule à la fois l'activation de ces récepteurs mais aussi la transduction du signal. Des études plus précises des mécanismes de régulation induits par ces clivages seront nécessaires pour une

meilleure compréhension des différentes fonctions induites par la voie de signalisation Slit/Robo.

- *Localisation des récepteurs Robo à la membrane*

Il est connu que la protéine Slit peut réguler la migration des neurones mais aussi de cellules non neuronales telles que les leucocytes ou les cellules cancéreuses. Une étude a démontré que la liaison d'USP33 (Ubiquitin-Specific Protease 33), une enzyme de déubiquitination, à Robo1 est requise pour la réponse à Slit des cellules cancéreuses. L'endocytose de nombreux récepteurs est régulée par les enzymes d'ubiquitination : un récepteur ubiquitiné sera dégradé par le protéasome. USP33, comme toutes les enzymes de déubiquitination, protège donc les protéines de la dégradation. Toutefois, l'inhibition d'USP33, *via* un shRNA, n'affecte pas le taux protéique Robo1 dans cette étude, suggérant ainsi qu'USP33 ne régule pas la stabilité de la protéine Robo1. Par ailleurs, les cellules contrôles présentent une forte localisation péri-nucléaire de Robo1 et une faible distribution à la membrane plasmique. Suite à un traitement par Slit, Robo1 est redistribué à la membrane plasmique. L'utilisation d'un shRNA dirigé contre USP33 inhibe cette relocalisation même suite à traitement par Slit. USP33 n'affecte donc pas la stabilité de Robo1 mais sa redistribution à la membrane plasmique.

Dans cette étude, les auteurs montrent également que Slit affecte la direction de la migration des cellules cancéreuses mais pas leur vitesse. Un shRNA dirigé contre USP33 élimine cette activité [238].

L'effet inhibiteur de Slit sur la migration des cellules cancéreuses est donc transduit par Robo1 de façon dépendante d'USP33. La régulation de la localisation de Robo1, *via* une enzyme de déubiquitination USP33, module donc la migration des cellules cancéreuses.

2- Rôles des récepteurs Robo dans le développement

Dans la plupart des organismes, le système nerveux central (SNC) se développe le long d'un axe de symétrie bilatéral localisé au niveau de ligne médiane. Cependant de nombreuses interrogations sur le système nerveux ont été soulevées

durant ces dernières années, notamment comment tant de neurones peuvent être si précisément acheminés dans leurs circuits respectifs. Ce problème peut être découpé en plusieurs axes de recherche tels que la polarisation des neurones, l'initiation de la croissance axonale, la navigation des axones vers leurs régions cibles ou bien le franchissement de la ligne médiane par ces axones. Durant le développement, la ligne médiane ventrale joue un rôle central en sécrétant des protéines diffusibles qui contrôlent la croissance des axones et des dendrites neuronaux et donc la migration des neurones à travers la ligne médiane [5]. De nombreux neurobiologistes ont tenté de comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle du franchissement de la ligne médiane par les neurones. Comment les axones commissuraux, ceux ayant déjà franchi la ligne médiane, sont attirés par la ligne médiane et de quelle façon le cône de croissance des axones reçoit et intègre les signaux libérés par celle-ci ? Quels sont les molécules et les changements de signalisation qui permettent aux axones commissuraux de quitter la ligne médiane ? Ces questions fondamentales dans la guidance axonale ont mené les chercheurs aux protéines Robo qui ont été identifiées initialement chez la drosophile dans le début des années 1990. Il a été montré que l'expression des récepteurs Robo était requise pour la répulsion des axones à partir de la ligne médiane. Ceci est valable à la fois pour les axones ipsilatéraux, qui n'ont jamais franchi la ligne médiane, mais aussi pour les commissuraux, qui l'ont déjà traversée. Des homologues des protéines Robo et Slit ont été découverts dans de nombreuses espèces [4], ce qui suggère que cette conservation évolutive de la voie de signalisation Slit/Robo est très importante dans le développement du système nerveux.

2.1- Evènements intracellulaires liés à l'interaction Slit/Robo

Les domaines cytoplasmiques des récepteurs Robo ne possèdent pas d'activités catalytiques propres, c'est pourquoi ils interagissent avec diverses molécules de signalisation pour exercer leurs différents effets.

2.1.1- Abelson et Enabled

Deux protéines, la tyrosine kinase Abelson (Abl) et Enabled (Ena) peuvent moduler le mécanisme de répulsion des récepteurs Robo en agissant en aval de la voie de signalisation Slit/Robo. Il a été mis en évidence, chez la drosophile, que la protéine Abl peut se lier au domaine CC3 du récepteur Robo et ainsi inhiber cette voie de signalisation en phosphorylant directement le domaine CC1 de Robo. À l'inverse, Ena, qui est le substrat de Abl, interagit directement avec Robo au niveau de ces domaines CC1 et CC2 pour promouvoir le signal de répulsion (Figure 23A) [239].

2.1.2- Rho GTPases

Les petites GTPases de la famille Rho, telles que RhoA, Rac1 et Cdc42, sont des régulateurs clés de la dynamique du cytosquelette d'actine. Ces protéines peuvent passer d'un état inactif, forme GDP, à un état actif, forme GTP, via les protéines GEF (Guanine Exchange Factor). Inversement, le passage de la forme active à inactive se fait par l'intermédiaire des protéines GAP (GTPases-Activating Proteins). Les protéines GAP en aval des récepteurs Robo, telles que les Slit-Robo GAPs (srGAP) et CrossGAP/Vilse contrôlent la dynamique du cytosquelette. Des protéines GEF, telles que Sos (Son Of Sevenless) participent également à cette dynamique.

Il existe trois protéines srGAP (srGAP1-3) capables de lier au domaine CC3 de Robo *via* leur domaine SH3. La liaison du ligand Slit à son récepteur Robo induit le recrutement de srGAP1 au domaine CC3 de Robo1, ce qui conduit à la désactivation des GTPases Cdc42 et RhoA en aval. Cdc42 est responsable de la polymérisation de l'actine et de l'activation de RhoA, elle-même responsable de la dépolymérisation de l'actine. L'inhibition de ces deux protéines conduit donc à un signal de répulsion ainsi qu'à une diminution de la mobilité cellulaire (Figure 23B) [240]. Contrairement à srGAP1, qui ne module pas l'activité de Rac1, srGAP3 peut l'inactiver. Elle joue ainsi un rôle dans la morphogenèse neuronale, la plasticité synaptique et la migration cellulaire. srGAP2, quant à elle, promeut l'extension des neurites durant le développement cortical de la souris, en générant des protusions de la membrane neuronale et en inhibant la migration des neurones [5].

La liaison de Slit à Robo induit également le recrutement la protéine Vilse/CrossGAP qui se lie au domaine CC2 de Robo, inhibant alors l'activité des protéines Cdc42 et Rac1 (Figure 23C). Cependant, la présence de Slit peut aussi induire l'activation de Rac1 (Figure 23C). Dans ce cas, la protéine adaptatrice Dock (Dreadlocks) se lie aux domaines CC2 et CC3 de Robo, recrutant un deuxième adaptateur la protéine PAK (p21-activated protein kinase) ainsi que la protéine GEF Sos ; cette dernière active alors Rac1. Ces partenaires en aval de la voie de signalisation Robo contrôlent la répulsion et la dynamique du cytosquelette [241].

2.1.3- Interaction avec le récepteur à la nétrine : DCC

Les nétrines appartiennent à une famille de molécules extracellulaires dont les récepteurs sont les protéines DCC. Tout comme le couple Slit/Robo, les protéines nétrine et DCC jouent un rôle dans le guidage axonal, notamment dans le franchissement de la ligne médiane. La nétrine 1 attire les axones commissuraux au niveau de la ligne médiane en se fixant à son récepteur DCC, tandis que Robo 1 et Robo2 ont un effet répulsif après leur liaison à Slit [5]. Chez la drosophile, par utilisation de chimères des récepteurs Robo et DCC, il a été démontré que ce sont les parties intracellulaires de ces récepteurs qui sont impliquées dans ses signaux d'attraction et de répulsion. De plus, il a été démontré qu'en présence de Slit, Robo1, *via* son domaine CC1, se lie au domaine intracellulaire P3 du récepteur DCC. Cette interaction inhibe le signal attractif transmis normalement par la nétrine 1 (Figure 23D) [242]. Cependant, le sens de la modulation, attraction ou répulsion, de cette interaction entre Robo et DCC n'est pas encore clairement élucidé.

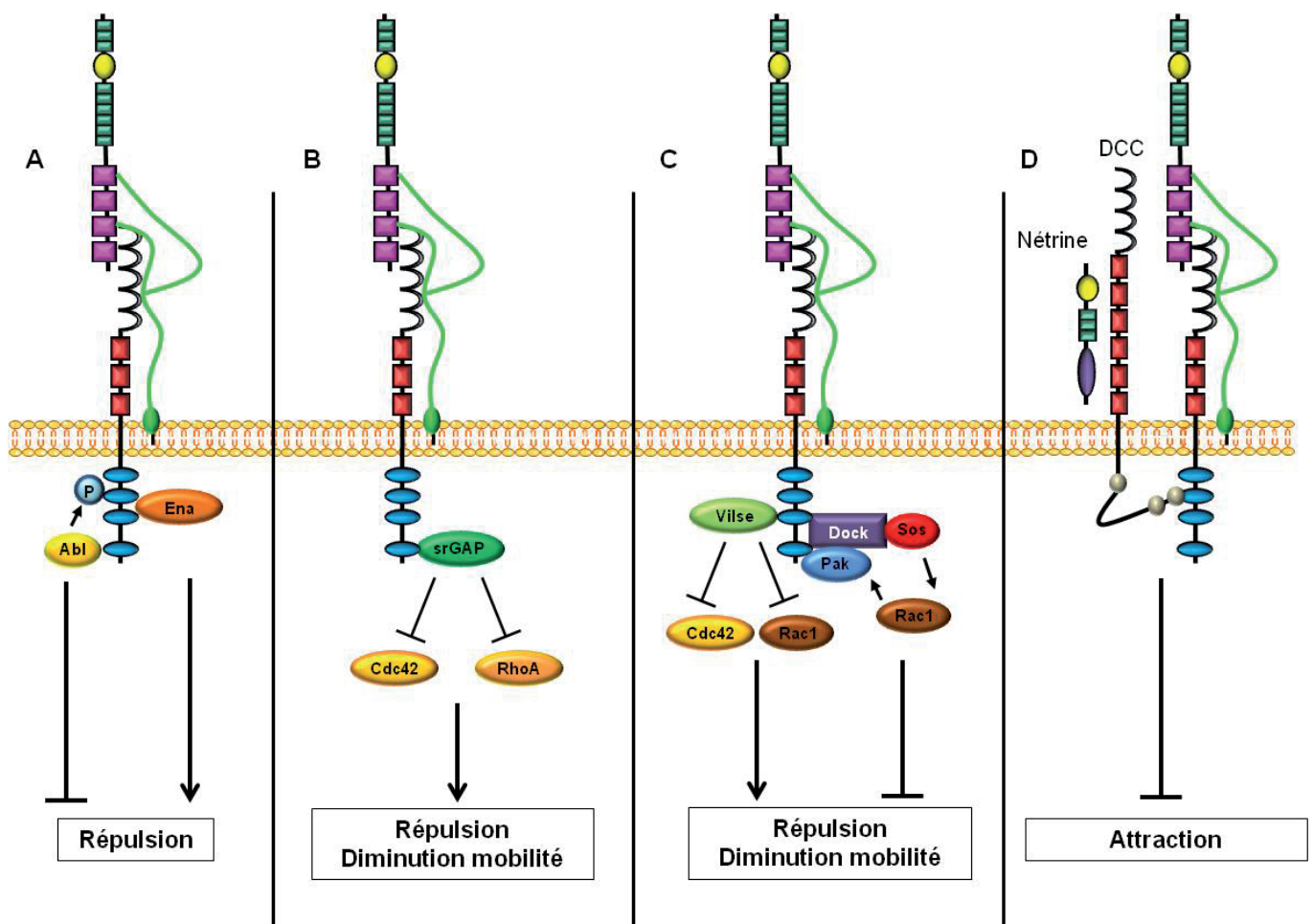


Figure 23. Signalisation intercellulaire de la voie Slit/Robo.

A. La tyrosine kinase Abelson (Abl) se lie au domaine CC3 de Robo et inhibe le signal de répulsion, normalement induit par Robo, en phosphorylant le domaine CC1. A l'inverse, Enabled (Ena) transduit le signal de répulsion en se liant directement aux domaines CC1 et CC2 de Robo.

B. En présence de Slit, srGAP1, en se liant au domaine CC3 de Robo, inactive les protéines Cdc42 et RhoA induisant ainsi un signal de répulsion ainsi qu'une diminution de la mobilité cellulaire.

C. L'interaction Slit/Robo peut également induire la liaison de la protéine Vilse/CrossGAP au domaine CC2 de Robo et inhiber ainsi les protéines Cdc42 et Rac1. Rac1 peut aussi être activée par le recrutement d'une protéine GEF, Son of Sevenless (Sos), via les adaptateurs Dreadlock (Dock), qui se lie aux domaines CC2 et CC3 de Robo, et p21-activated kinase (Pak). Une fois activée Rac1 induit la migration cellulaire, inhibant ainsi le signal de répulsion.

D. En présence de Slit et nétrine 1, les domaines intracellulaires de Robo (CC1) et DCC (P3) interagissent, ce qui inhibe le signal d'attraction normalement transmis par la nétrine 1 [5].

2.1.4- Interaction avec la protéine Commissureless (Comm)

Les récepteurs Robo1 et Robo2 sont fortement exprimés au niveau des axones ipsilatéraux, tandis qu'une plus faible expression est retrouvée dans les axones commissuraux. Toutefois, lorsque ces derniers ont atteint l'autre côté de la ligne médiane, un fort taux de protéines Robo1/2 est à nouveau détectable. A l'inverse, la protéine Comm (Commissureless) est fortement exprimée dans les neurones commissuraux et faiblement dans les ipsilatéraux. Cette protéine transmembranaire Comm a été mise en évidence, chez la drosophile, pour réguler négativement les protéines Robo. Elle est essentiellement localisée dans l'appareil de golgi et les endosomes tardifs et détourne les récepteurs Robo vers ces endosomes pour qu'ils soient ensuite dégradés. La protéine Comm recrute les récepteurs Robo aux endosomes directement à partir de l'appareil de golgi et non par internalisation à partir de la surface cellulaire. La protéine Comm peut donc être qualifiée de « récepteur endosomal sortant » pour Robo. Une fois que les axones commissuraux sont entrés dans la ligne médiane, un mécanisme non connu diminue l'expression de la protéine Comm, libérant ainsi les récepteurs Robo qui peuvent alors envoyer des signaux de répulsion afin d'empêcher les axones de franchir cette ligne (Figure 24) [214].

Aucun homologue de la protéine Comm n'a encore été mis en évidence chez les vertébrés. Le rôle des récepteurs sortants dans la régulation de l'expression des récepteurs Robo chez les vertébrés est resté très longtemps non élucidé. Cependant, des expériences de double-hybride chez la levure ont mis en évidence la protéine USP33 comme partenaire de Robo1 [5]. Comme décrit dans la partie 1.4.3 modifications post-transcriptionnelles, la protéine USP33 peut moduler la redistribution de Robo1 à la membrane plasmique [238].

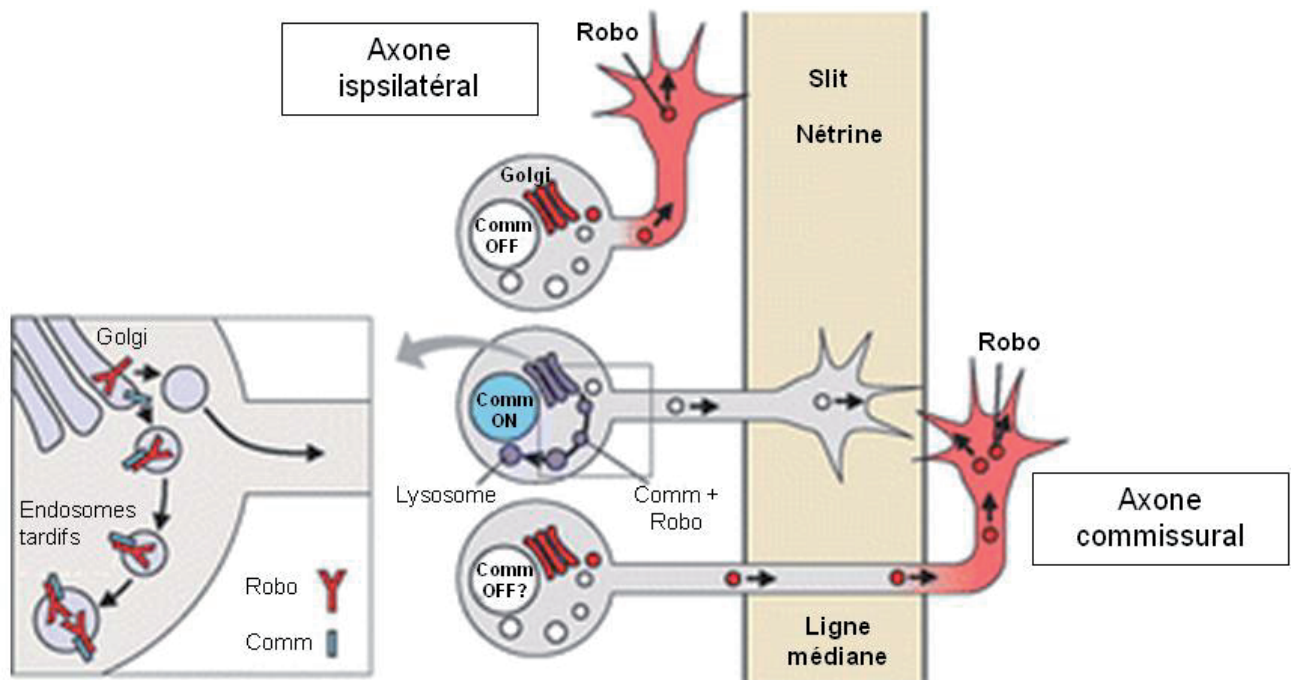


Figure 24. Régulation du trafic intracellulaire du récepteur Robo.

Les axones ipsilatéraux n'expriment pas la protéine Comm, le récepteur Robo est alors présent à la surface cellulaire et peut interagir avec son ligand Slit, sécrété par la ligne médiane, afin d'induire un signal de répulsion : l'axone ne franchit pas la ligne médiane.

L'expression de la protéine Comm est retrouvée dans les axones commissuraux. La protéine Comm détourne alors les récepteurs Robo aux endosomes tardifs afin qu'ils soient dégradés. L'absence de récepteurs Robo entraîne l'inhibition du signal de répulsion transmis suite à l'interaction Slit/Robo : les axones commissuraux peuvent franchir la ligne médiane.

Enfin, lorsque ces axones ont traversé la ligne médiane, un mécanisme inconnu diminue le taux de protéine Comm, permettant ainsi la relocalisation des récepteurs Robo à la surface des axones. Le signal de répulsion étant à nouveau présent, les axones ne peuvent franchir la ligne médiane [214].

2.2- Fonctions de la voie Slit/Robo

Suite à la liaison de leur ligand Slit, les récepteurs Robo interagissent avec différentes protéines cytoplasmiques contrôlant ainsi la migration cellulaire, la guidance axonale ainsi que la formation des dendrites.

2.2.1- Migration cellulaire et guidance axonale

Dans la plupart des tissus en développement, les cellules migrent selon une direction précise, suivant un chemin préexistant et sous l'influence de facteurs d'attraction et de répulsion. Chez les vertébrés, il existe deux types de migration neuronale : la migration tangentielle, durant laquelle les neurones migrent parallèlement à la surface du cerveau, et la migration radiale, où les neurones migrent perpendiculairement. La voie de signalisation Slit/Robo influence la migration tangentielle dans plusieurs systèmes, notamment au niveau du cerveau antérieur mais aussi postérieur de la souris et lors du développement de la moelle épinière [5]. Ces neurones expriment tous les récepteurs Robo, à l'exception de Robo4.

Chez la drosophile et le nématode n'exprimant pas les ligands Slit, les axones qui normalement ne traversent jamais la ligne médiane, la franchissent, tandis que ceux qui normalement ne la traversent qu'une seule fois, la franchissent plusieurs fois. Les protéines Slit empêchent donc les neurones ipsilatéraux de se projeter à travers la ligne médiane. Elles empêchent aussi les axones commissuraux de franchir cette ligne. Cette voie induit donc un signal de répulsion au niveau du cône de croissance axonal pour les guider vers leurs zones cibles [214].

De plus, chez les mammifères, un triple KO des gènes *Slit* démontre aussi leur rôle dans l'expulsion des neurones de la ligne médiane [243]. Ce tournant semble assuré par deux composants. Premièrement, comme décrit précédemment (2.1.4 Interaction avec la protéine Commissureless (Comm)), l'expression des récepteurs Robo est faible dans les axones n'ayant pas encore franchi la ligne médiane, puis surexprimée après le passage de cette ligne. La protéine Comm réprime l'expression de Robo avant que les axones n'atteignent la ligne médiane (Figure 24). Après le franchissement de cette ligne, l'action répressive de la protéine Comm est perdue ; par conséquent, l'expression des récepteurs Robo à la surface axonale est retrouvée, ainsi que la sensibilité des axones à Slit [214].

Deuxièmement, Robo3 (appelé aussi Rig1) a été récemment mis en évidence comme un régulateur négatif des autres récepteurs de la famille Robo (Robo 1 et 2) (Figure 25) [244]. Robo3 est fortement exprimé avant que les axones traversent la ligne médiane et empêche l'activation prématurée du signal de répulsion transmis par les récepteurs Robo1/2 avant le passage de la ligne médiane en inhibant Robo1. En maintenant une expression basse de Robo1, ces deux composants, Comm et

Robo3, assurent le franchissement de la ligne médiane par les axones (Figures 24 et 25). La surexpression des récepteurs Robo et la perte d'expression de Robo3 conduisent à l'initiation du signal de répulsion transmis par Slit seulement une fois que les axones ont traversé la ligne médiane. Cette surexpression des récepteurs Robo, couplée à l'inhibition par Robo1 du signal d'attraction induit par la nétrine 1 (partie 2.1.3 Interaction avec le récepteur à la nétrine : DCC), permettent alors à l'axone de quitter la ligne médiane (Figure 25) [5] [244].

Au niveau de la moelle épinière, deux variants de Robo3 ont été retrouvés : Robo3.1 et Robo3.2 qui exercent des effets opposés sur les axones commissuraux. Robo3.1 est exprimé avant le franchissement de la ligne médiane et semble inhiber la répulsion induite par Robo1/2, tandis que Robo3.2 est exprimée après la ligne et semble alors coopérer avec Robo1/2 pour repousser les axones [245]. Cependant, les mécanismes par lesquels Robo3 bloque la répulsion de Robo1/2 ne sont pas encore connus et son interaction avec Slit2 est encore débattue [245] [5].

Un second modèle suggère que Robo3 posséderait une fonction chemoattractive plutôt qu'anti-répulsive. Il permettrait alors d'attirer les axones commissuraux vers la ligne médiane, plutôt que d'inhiber le signal de répulsion induit par Robo1/2 [244].

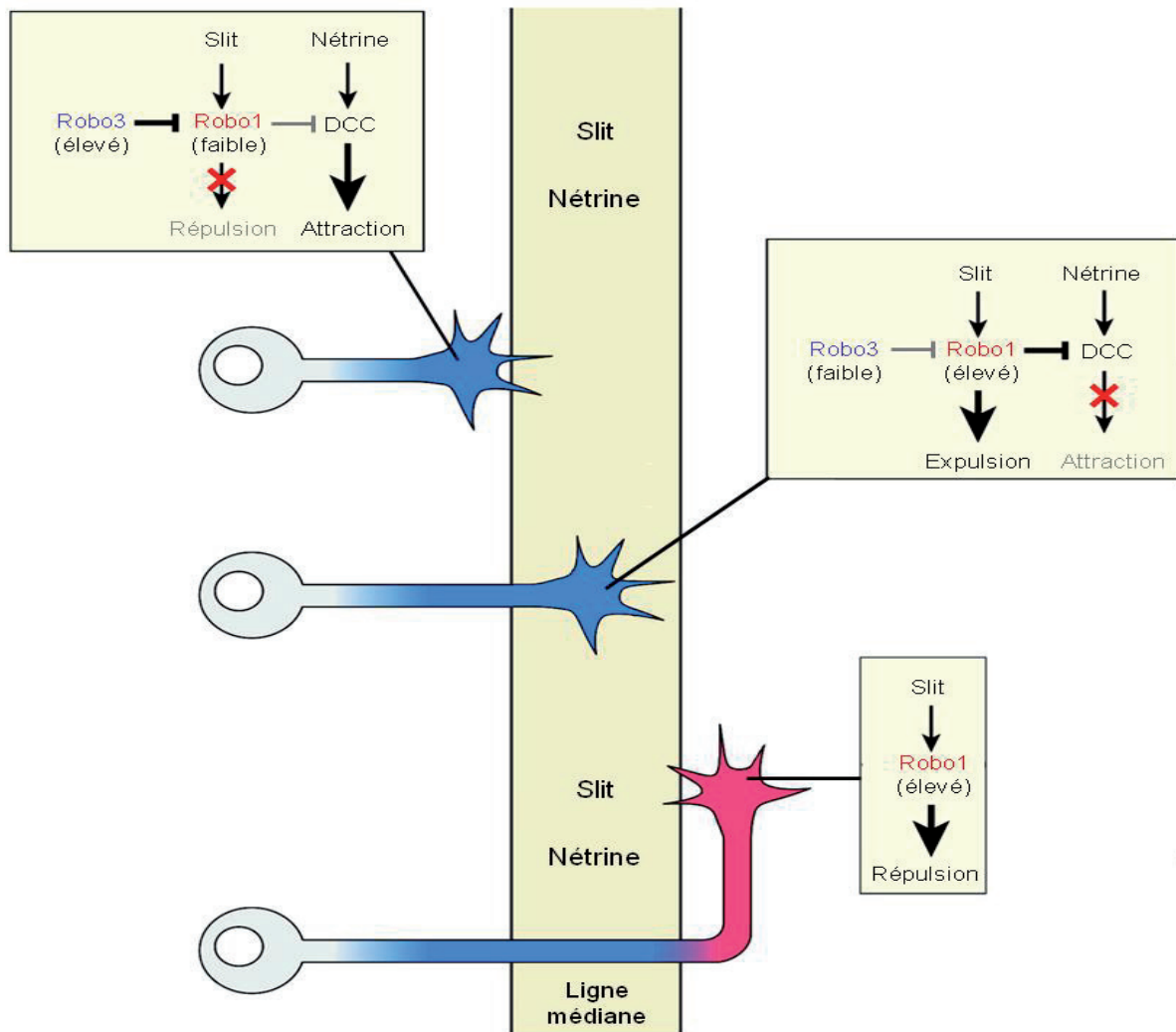


Figure 25. Mécanismes de régulation du guidage axonal impliquant Robo3.

Avant le franchissement de la ligne médiane, la nétrine, présente à ce niveau, attire les axones *via* son interaction avec son récepteur DCC. Parallèlement, Robo3 inhibe les récepteurs Robos et notamment Robo1, ce qui inhibe le signal de répulsion normalement transduit par Robo1. Les axones peuvent alors entrer dans la ligne médiane.

Au niveau de la ligne médiane, l'expression de Robo3 diminue favorisant ainsi celle des récepteurs Robos qui en réponse à leurs ligands Slits, inhibent DCC, induisant ainsi un signal d'expulsion des axones de cette ligne.

Une fois que les axones ont franchi la ligne médiane, un niveau élevé de Robo induit un signal de répulsion les empêchant ainsi de retraverser cette ligne.

Les récepteurs Robo régulent également la migration des leucocytes en modulant l'expression de srGAP1, par exemple lors de l'inflammation du poumon. En effet, les cellules Clara, constituant l'épithélium bronchique, sécrètent du Slit2 qui peut moduler la migration des éosinophiles et neutrophiles qui expriment Robo1. Les

éosinophiles présentent un faible taux de srGAP1, conduisant à une activation de Cdc42 ; les éosinophiles recrutent également la PI3K au récepteur Robo1, induisant ainsi leur migration, ce qui favorise l'inflammation. Inversement, l'interaction Slit2/Robo1 supprime le chimiotactisme des neutrophiles, normalement induit par CXCL12, en inactivant Cdc42. Un traitement à l'ovalbumine permet de recréer un gradient de Slit2, appelé l'axe broncho-alvéolaire, dans lequel se trouve une forte expression de Slit2 dans l'épithélium bronchique et une faible expression au niveau du tissu alvéolaire. Ce gradient induit alors un signal attractif pour les éosinophiles, en recrutant la PI3K, et un signal répulsif pour les neutrophiles, en recrutant la srGAP1 durant l'inflammation du poumon. Slit2 contribue donc à la modulation de la migration des leucocytes [9].

Enfin, les récepteurs Robo, et plus précisément Robo4, peuvent également contrôler la migration des cellules endothéliales. Robo4, dont l'expression est spécifique des vaisseaux sanguins, joue un rôle majeur dans l'angiogenèse [246]. Ce rôle sera développé plus précisément dans la partie « 3.4.1 Expression et rôles des protéines Slit et Robo dans la vascularisation ».

Il est toutefois intéressant de noter que la voie de signalisation Slit/Robo participe à la fois à la formation du réseau neuronal et vasculaire. En effet, en 1543 Andreas Vesalius observait déjà une similarité entre l'arborisation du réseau vasculaire et celui des nerfs (Figure 26). Récemment des analyses par microscopie confocale ont démontré que les nerfs et les vaisseaux suivent le même chemin jusqu'à leurs cibles (Figure 26). Les vaisseaux, qui sont apparus plus tardivement au cours de l'évolution que les nerfs, utilisent donc les mêmes molécules de guidage qui aident les axones à naviguer jusqu'à leurs cibles [246].

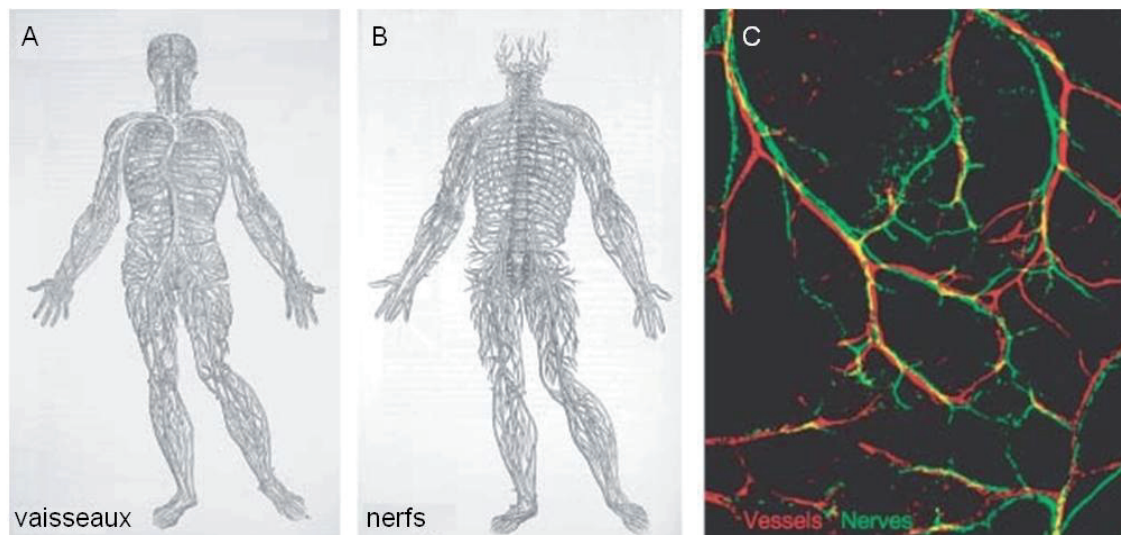


Figure 26. Parallélisme de l'arborisation des vaisseaux et des nerfs.

A, B. Représentation schématique, dessinée par A. Vesalius en 1543, des similarités de l'arborisation des réseaux vasculaires et nerveux. C. Image de microscopie confocale montrant que les vaisseaux (en rouge) et les nerfs (en vert) partagent un chemin commun jusqu'à leurs cibles.

2.2.2- Ramifications axonales et dendritiques

La voie Slit/Robo peut aussi intervenir dans la formation de ramifications axonales. Comme décrit dans la partie « 1.4.3 Modifications post-traductionnelles », la protéine Slit2 peut être clivée et libérer ainsi un fragment N-terminal nommé Slit2-N, et un fragment C-terminal. La forme non clivée de Slit2 est appelée Slit2-U. Ce clivage permet de moduler la fonction de Slit2. Dans le cas des axones des ganglions de la racine dorsale, la forme clivée Slit2-N stimule les ramifications axonales, tandis que la forme non clivée Slit2-U ne présente pas d'activité. Par conséquent, l'activation du clivage local de Slit2 permet d'induire des ramifications axonales. De plus, la forme Slit2-U est capable de contrer l'activité de ramification de Slit2-N, suggérant ainsi que la régulation du clivage de Slit2 peut réguler *in vivo* l'élongation axonale ainsi que le chemin [237].

La voie de signalisation Slit/Robo est connue pour influencer le guidage des axones, mais elle peut également intervenir dans la formation des dendrites qui s'étendent à partir du corps du neurone.

Ainsi, dans les cellules ganglionnaires de la rétine (RGC) de xénope, l'interaction Slit/Robo joue un rôle opposé dans les axones et dendrites. Lors de l'extension de leurs dendrites, les cellules RGC expriment Robo2 et 3, tandis que les ligands Slit1 et 2 sont produits par les cellules avoisinantes. L'utilisation d'antisens ou de dominants négatifs de Robo2 et Robo3 montre que la voie de signalisation Slit/Robo ne possède aucun rôle dans la guidance des dendrites mais intervient plutôt dans la formation de ces derniers *via* l'interaction Robo2/Slit2. Un dominant négatif de Robo3 induit peu d'effets sur le développement des dendrites. Les récepteurs Robo possèdent donc des fonctions distinctes sur les axones et les dendrites d'un même type cellulaire. Cette différence peut s'expliquer par différentes combinaisons des récepteurs Robo. Slit agit *via* Robo2 sur les dendrites comme facteurs de croissance/ « branchement », mais n'intervient pas dans leur guidage, tandis que Robo2 et Robo3 coopèrent, dans les axones, pour répondre aux facteurs de guidage Slits [247].

2.2.3- Projections topographiques

Une fois qu'ils ont atteint leur territoire final, les axones doivent trouver leurs cellules cibles pour former des contacts synaptiques avec elles. Dans la plupart des systèmes neuronaux, les axones ne se projettent pas au hasard sur leurs cellules cibles mais suivent un schéma spatial précis qui souvent reflète leurs origines respectives dans le cerveau, ce qui définit alors les cartes topographiques.

Un rôle pour les protéines Slits et Robos dans le ciblage axonal a été décrit très précisément dans le système olfactif de la souris. Brièvement, dans le système olfactif principal, les neurones sensoriels olfactifs (OSN) s'étendent de l'épithélium olfactif (OE) au bulbe olfactif (OB). Ce système a pour caractéristique d'avoir tous les OSNs, provenant d'un même récepteur olfactif, convergeant vers un seul glomérule du bulbe olfactif [5].

Chez la plupart des mammifères, il existe un système olfactif accessoire, jouant un grand rôle dans la sensibilité aux phéromones. Dans ce système, les neurones sensitifs voméro-nasaux (VNS), partant de l'organe voméro-nasal (VNO), se projettent dans le bulbe olfactif accessoire (AOB) (Figure 27A). Les VNS des zones apicales et basales du VNO se projettent respectivement dans les faces antérieure et postérieure du bulbe olfactif accessoire. Les Slits sont sécrétés en gradient par l'AOB

avec une haute expression dans la région antérieure et une faible expression dans la face postérieure et servent à guider les axones. En effet, la délétion de *Slit1*, *Slit2* ou *Robo2* entraîne un arrêt prématuré des axones, provenant du VNO basal, dans la zone antérieure de l'AOB (Figure 27B) [5].

Ce système de gradient entre les protéines Slits et Robos est également retrouvé dans le bulbe olfactif principal, où un gradient de Robos exprimé par l'épithélium olfactif permet le guidage des axones jusqu'au bulbe olfactif exprimant un gradient de Slits. L'inhibition de *Slit1* ou *Slit2* et de *Robo1* ou 2 dans ce modèle, entraîne un mauvais ciblage des axones qui ne s'orientent alors pas dans les glomérules correspondants (Figure 27C) [5].

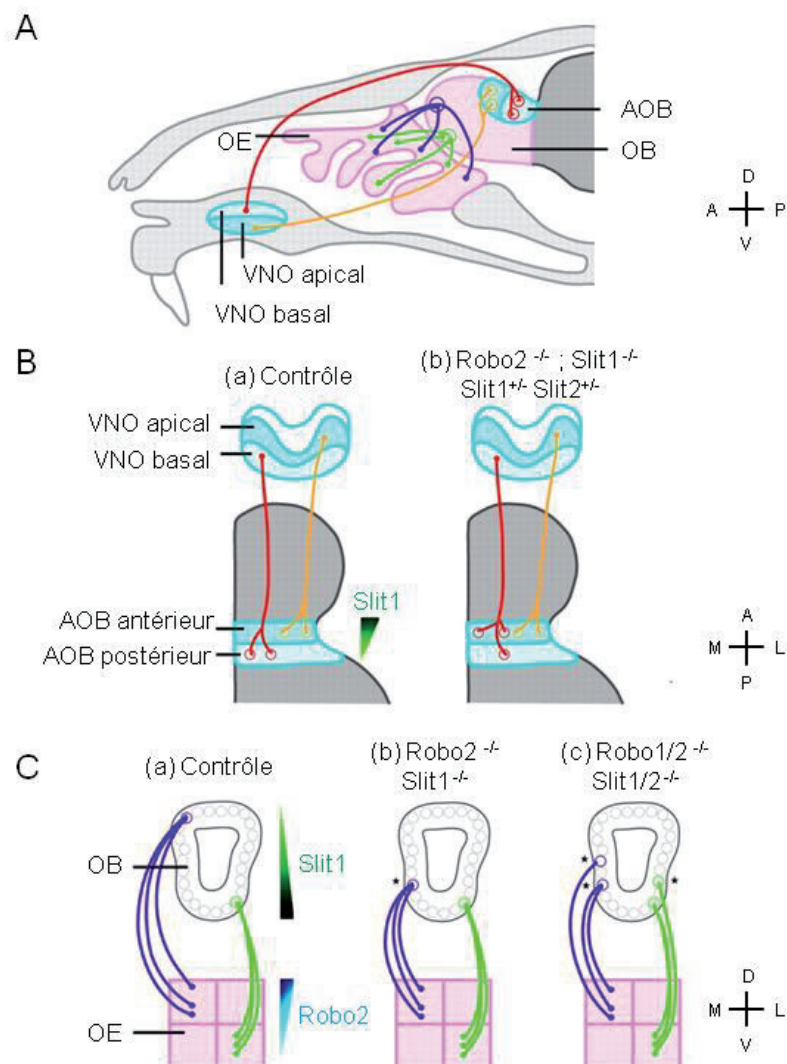


Figure 27. Le système olfactif principal et accessoire chez des souris sauvages ou KO Slit/Robo.

A. Coupe sagittale d'une tête murine représentant la ségrégation axonale des systèmes olfactifs principal et accessoire. Le système olfactif principal (en rose) contient le bulbe olfactif (OB) et l'épithélium olfactif (OE). Les neurones olfactifs sensoriels (OSNs), localisés dans l'OE, se projettent dans des glomérules spécifiques de l'OB. Dans le système olfactif accessoire (en bleu), les neurones sensitifs voméro-nasaux (VSNs) localisés dans l'organe voméro-nasal apical (VNO) (en orange) se projettent dans la partie antérieure du bulbe olfactif accessoire (AOB), et ceux provenant du VNO basal (en rouge) se projettent dans l'AOb postérieur.

B. Représentation du bulbe olfactif accessoire et de l'organe voméro-nasal dans le plan horizontal. Dans l'AOb, il existe un gradient de Slit1, présentant une expression élevée dans la partie antérieure de l'AOb et une plus faible dans l'antérieure. **a)** Chez des souris sauvages, les VSNs, exprimant Robo2, provenant du VNO basal et apical, se projettent dans l'AOb postérieur et antérieur, respectivement. **b)** L'inhibition de Slit/Robo entraîne un arrêt prématuré des neurones, provenant du VNO basal, dans la zone antérieure de l'AOb.

C. Représentation du système olfactif murin principal. Les OSNs (en violet et en vert), provenant de l'OE, se projettent dans les glomérules (cercles gris) localisés au sein de l'OB. **a)** Les OSNs, provenant de l'OE dorso-médian, se projettent normalement dans les glomérules dorsaux. **b)** Chez des souris KO pour Slit1 et Robo2, certains OSNs dorsaux se projettent anormalement dans les glomérules ventraux (signalé par un *). **c)** Chez des souris KO Slit1/2 ou Robo1/2, les OSNs dorsaux et ventraux se projettent anormalement dans plusieurs glomérules (signalé par *).

A : antérieur, D : dorsal, L : latéral, M : médian, P : postérieur, V : ventral [5].

3- Voie de signalisation Slit/Robo dans la progression tumorale

Comme décrit dans la précédente partie, la famille des protéines Slits et de leurs récepteurs Robos, a été découverte dans le système nerveux, dans lequel ils agissent comme des facteurs clés du guidage axonal et du développement des ramifications durant le développement. Depuis leur découverte, de nombreux rôles additionnels leur ont été attribués, notamment dans la régulation de la prolifération, de l'adhésion et de la migration cellulaires dans de nombreux cellules et tissus. Toutefois, ces processus sont souvent dérégulés lors de la progression tumorale, permettant ainsi aux cellules tumorales de passer outre les mécanismes de surveillance afin de proliférer et éventuellement de s'échapper vers de nouveaux

tissus. Les cellules cancéreuses détournent donc les voies de signalisation cellulaires normales afin de survivre et d'envahir, *via* le système vasculaire, des tissus secondaires tels que l'os, formant ainsi des métastases.

Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont démontré l'implication de la voie de signalisation Slit/Robo dans la régulation de ces divers processus cellulaires, soulevant ainsi la possibilité d'un rôle important exercé par cette voie dans l'altération des cellules lors de la transformation tumorale. En effet, l'expression des protéines Slits et Robos est souvent altérée dans de nombreux cancers ; ces protéines peuvent donc être considérées comme de potentielles cibles thérapeutiques. Cependant, de récents travaux suggèrent un rôle double de cette voie dans la progression tumorale : les protéines Slits et Robos fonctionneraient soit comme oncogène, soit comme suppresseur de tumeur, souvent dans le même tissu. Cette dualité de fonctionnement est déjà observée dans leur fonction de guidage axonal dans le système nerveux, au sein duquel elles peuvent à la fois induire un signal de répulsion mais aussi d'attraction. Cette voie de signalisation Slit/Robo possède donc des rôles opposés qui dépendent de circonstances cellulaires précises qui restent à élucider.

3.1- Altération de l'expression de la voie Slit/Robo dans les cancers

La transformation progressive de cellules normales en progéniteurs malins implique une accumulation de changements génétiques, tels que la perte ou l'inhibition d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et l'induction d'oncogènes.

De nombreuses études démontrent que l'expression des récepteurs Robo et de leurs ligands Slit est altérée dans de nombreux cancers (Tableau 6).

	Gène	Mode d'inhibition	Type de cancer	Références
Expression diminuée	Slit2	Délétion allélique	Sein, utérus, poumon	[240, 241, 242]
	Slit2	Hyperméthylation promoteur	Sein, poumon, ovaires, hépatique, colorectal, gliomes	[220, 221, 242, 244]
	Slit1/3	Hyperméthylation promoteur	Sein, colorectal, gliome	[220, 245]
	Robo1	Délétion gène	Poumon à petites cellules	[249]
	Robo1	Hyperméthylation promoteur	Tumeur primaire du sein invasive, rein, poumon	[219]
	Robo1/2	Hyperméthylation promoteur	Lésions dysplasiques et cancer tête et cou	[250]
	Robo4	Inconnu	hépatique	[7]
	Gène	Mode de surexpression	Type de cancer	Références
Expression élevée	Slits	Inconnu	Sein lobulaire et canalaire, prostate	[246, 247, 248]
	Robo1	Inconnu	Hépatique	[7]
	Robo1	Hyperméthylation promoteur Slit2 => sous-expression miR218	Hépatique, nasopharyngial	[6, 226]
	Robo4	Inconnu	Cellules endothéliales tumorales, colorectal	[279, 7]

Tableau 6. Altérations de la voie de signalisation Slit/Robo dans les cancers.

Il est intéressant de noter que ces gènes peuvent être, selon le type tumoral, surexprimés ou sous exprimés (Tableau 6), suggérant ainsi que cette voie de signalisation peut contrôler positivement ou négativement, la survie, la prolifération et la migration des cellules cancéreuses. A l'heure actuelle, les facteurs modulant cette régulation différentielle, par exemple le type de tumeurs ou le stade, n'ont pas encore été mis en évidence.

• *Altération de l'expression des gènes Slit*

L'altération la plus fréquente de l'expression du gène *Slit* est une régulation négative, induite par une délétion allélique, ou par hyperméthylation du promoteur. L'étude de 44 échantillons de carcinomes mammaires montre une perte de

l'hétérozygotie sur plusieurs régions du chromosome 4, dont une correspondant au locus du gène *Slit2* (4q25-26). Des délétions alléliques sur le chromosome 4 sont fréquemment observées dans différents cancers : 63% des carcinomes mammaires, 35% des carcinomes cervicaux et 60% des cancers du poumon à petites cellules et des mésothéliomes malins [248] [249] [250].

L'inhibition de l'expression du gène *Slit2*, via l'hyperméthylation de son promoteur, induit également une altération de la voie de signalisation Slit/Robo. De nombreuses études ont montré que les régions fréquemment hyperméthylées dans les cancers, contenaient les gènes *Slit1-3* et *Robo1* et 3 [228]. Par exemple, l'expression de *Slit2* est inhibée via l'hyperméthylation de son promoteur dans la majorité des cancers tels que le cancer du sein, du poumon à petites cellules, des ovaires, colorectal et les gliomes et leucémies [251] [252] [229]. L'expression de *Slit3* est également inhibée en conséquence d'une hyperméthylation de son promoteur dans 41% des cancers du sein, 33% des cancers colorectaux et 29% des gliomes [253].

L'hyperméthylation des promoteurs des gènes Slit entraîne également une régulation négative du miRNA 218, localisé dans l'intron 15 du gène *Slit2* et 14 du gènes *Slit3*. Comme décrit dans la partie « 1.4.3. Régulations post-transcriptionnelles », le miRNA 218 régule négativement l'expression de *Robo1* dans les cancers gastrique et nasopharyngial [234] [6] ; cette dérégulation, due à l'hyperméthylation du promoteur de *Slit*, permet d'expliquer que *Robo1* ne soit pas toujours sous-exprimé. De plus, il est possible que la perte de cette boucle de régulation négative contribue à la progression tumorale, car l'expression de *Robo1* à la surface des cellules cancéreuses peut leur permettre de migrer en réponse au Slit sécrété par les cellules non tumorales environnantes, ou par les cellules cancéreuses elles-mêmes qui sécrètent encore du Slit car elles n'ont qu'une réduction partielle de l'expression de ce gène [234] [6].

Par conséquent, l'hyperméthylation du gène *Slit*, dans les tumeurs solides, peut contribuer à la progression tumorale, en permettant la signalisation autocrine de Slit/Robo en une signalisation paracrine, favorisant ainsi la migration des cellules tumorales répondant à cette voie dérégulée, ce qui favorise donc la formation de métastases.

Contrairement à la sous-expression de *Slit*, qui est très documentée dans la littérature, peu d'études identifiant une surexpression des gènes *Slits* dans les cancers ont été rapportées. Une surexpression de *Slit* est observée dans les

carcinomes mammaires canalaire mais aussi lobulaires ainsi que dans les cancers de la prostate. Toutefois, les mécanismes par lesquels cette surexpression contribue au développement tumoral ne sont toujours pas élucidés [254] [255] [256].

- *Altération de l'expression des gènes Robo*

L'altération de la voie de signalisation Slit/Robo peut aussi être induite *via* la délétion ou l'hyperméthylation du promoteur des gènes *Robo*. *Robo1*, par exemple, a été retrouvé délété dans plusieurs cancers tels que celui du poumon à petites cellules [257]. 80 % des cancers primaires du sein et 75% du rein présentent également une perte allélique dans la région contenant l'isoforme *Dutt1*, lui suggérant alors un rôle de suppresseur de tumeurs [227]. De plus, le promoteur de *Dutt1* est fréquemment hyperméthylé dans les tumeurs primaires telles que dans les cancers primaires invasifs du sein (19%), dans les cancers rénaux (18%) et dans les cancers du poumons (4%) [227]. L'hyperméthylation des promoteurs de *Robo1* et 2 est également retrouvée dans des lésions dysplasiques de carcinomes « tête et cou » et cervicaux [258] [259].

Bien que *Robo1* semble être considéré comme un gène suppresseur de tumeurs, le pourcentage de tumeurs présentant une expression de Robo réduite ou inhibée est plus faible que pour les gènes *Slits*. En effet, l'expression de Robo1 est fréquemment augmentée dans de nombreux cancers, tels que les carcinomes gastriques et nasopharyngiaux, pour lesquels la sous-expression du miRNA 218 est associée à la surexpression de Robo (comme décrit précédemment) [234] [6].

La voie de signalisation Slit/Robo peut donc jouer un rôle oncogénique suite à cette surexpression de Robo dans les tumeurs. De plus, la complexité de la régulation de cette voie, notamment *via* la boucle de régulation négative de l'expression de Robo1 due à des ARNs non codants, suggère que les ligands et les récepteurs de cette voie doivent être conjointement évalués avant d'attribuer un rôle à cette voie dans la progression tumorale.

De plus, la voie de signalisation Slit/Robo régule de nombreuses voies sous-jacentes, souvent dérégulées dans les cancers, telles que celles transmises par la familles des petites Rho GTPases. Les changements dans la voie de signalisation slit/Robo induisent donc des effets pléiotropes. Comme décrit dans la partie suivante,

cette voie peut affecter d'autres aspects cellulaires impliqués dans les cancers, tels que la survie ou la prolifération cellulaire.

3.2- Slit et Robo induisent la survie et la prolifération des cellules tumorales

Une fois le processus de transformation initié par différentes mutations, l'expansion et la progression des cellules malignes en cellules métastatiques dépendent d'un processus multi-étapes impliquant des signaux anti-apoptotiques, de survie et de prolifération. Par conséquent, les étapes précoces du développement tumoral nécessitent une réponse des cellules cancéreuses naissantes à différents signaux tels que ceux transmis par les protéines Slits. La voie de signalisation Slit/Robo semble donc jouer un rôle dans la formation et le développement des métastases, en modulant notamment la prolifération et la survie cellulaire.

3.2.1- Survie et mort cellulaire tumorale

Une étape clé de la transformation cellulaire est l'immortalité. Les cellules « normales » ont recours à plusieurs mécanismes pour induire l'apoptose afin d'éviter la survie et le développement de cellules malignes.

L'apoptose peut être induit de façon intrinsèque, par exemple *via* p53, ce qui conduit à la libération par les mitochondries du cytochrome c et ainsi à l'activation des caspases *via* l'apoptosome. L'apoptose peut également être initiée extrinsèquement par l'intermédiaire des récepteurs de mort induisant également les caspases [260]. Une voie apoptotique extrinsèque alternative impliquant des récepteurs à dépendance existe également. En l'absence de leurs ligands, ces récepteurs envoient un signal pro-apoptotique ; ce signal est inhibé lors de la liaison de leurs ligands.

Les récepteurs de la Nétrine, DCC et UNC5s, sont des récepteurs à dépendance ; par conséquent, en dehors de son rôle de guidage axonal, la nétrine agit aussi comme un facteur de survie, à la fois pour les axones au cours du développement et pour les cellules cancéreuses lors de la progression tumorale [261] [262]. Les récepteurs Robo n'ont pas été caractérisés comme récepteurs à dépendance,

cependant leurs ligands Slits peuvent lier la Nérine et ainsi la séquestrer. Par conséquent, les protéines Slits agissent comme facteurs pro-apoptotiques en diminuant la concentration de Nérine disponible dans l'environnement, conduisant alors à l'activation de l'apoptose *via* les récepteurs DCC et UNC5s [242]. Cette boucle de régulation suggère donc que Slit joue un rôle de suppresseur de tumeur en induisant l'apoptose *via* l'activation de récepteurs à dépendance. Comme décrit précédemment, *Slit* est fréquemment inactivé dans de nombreux cancers, dérégulant ainsi de nombreuses voies de signalisation dont celle des récepteurs à dépendance et participe alors à la survie des cellules tumorales.

3.2.2- Prolifération cellulaire

Suite à l'acquisition de la survie par quelques cellules transformées, la progression tumorale nécessite la prolifération de ces cellules afin de générer une masse tumorale plus importante. La voie de signalisation Slit/Robo peut réguler à la fois positivement et négativement la prolifération cellulaire ; la dualité de fonction de cette voie, déjà mis en évidence au cours du développement, est à nouveau présente.

Au cours du développement, Slit peut jouer un rôle de suppresseur de prolifération cellulaire, notamment en modulant la localisation subcellulaire de la β -caténine *via* Robo1. En effet, une étude récente a mis en évidence que la voie de signalisation Slit/Robo inhibe la prolifération cellulaire, des cellules basales présentes dans la couche externe de l'épithélium mammaire, en recrutant la β -caténine à la membrane cytoplasmique, inhibant ainsi sa translocation nucléaire. Ce facteur de transcription ne peut alors plus activer les gènes de la voie Wnt. En inhibant la prolifération des cellules basales, la voie Slit/Robo inhibe le développement de ramifications dans la glande mammaire [263].

Dans un contexte tumoral, la voie de signalisation Slit/Robo peut également moduler la prolifération cellulaire. Ainsi, dans des lignées de cancer du sein, une surexpression de Slit inhibe l'activité transcriptionnelle de la β -caténine en activant la GSK-3 β , *via* la voie de signalisation PI3K/Akt. L'interaction Slit/Robo induit alors une diminution de la prolifération. De plus, les cellules surexprimant Slit présentent une augmentation de l'adhésion intercellulaire ainsi qu'une augmentation de la colocalisation de la β -caténine et de l'E-cadhérine renforçant ainsi l'adhésion

cellulaire. Une autre étude a montré que la délétion des gènes *Slit* ou *Robo1* dans la glande mammaire de souris ou dans des carcinomes mammaires humains corrèle avec une augmentation de l'expression de la voie Sdf1/CXCR4. De même, des tissus tumoraux de cancer du sein humain présentent une augmentation de l'expression de CXCR4 lorsque celle de Slit est inhibée. Enfin, à l'aide d'un modèle de xénogreffes, il a été démontré que la surexpression de Slit diminue l'expression de CXCR4 ainsi que la taille tumorale. Les gènes *Slit* sont donc des régulateurs négatifs de la voie Sdf1/CXCR4 et ils peuvent être considérés, par conséquent, comme des suppresseurs de tumeurs [264].

De même, un KO des gènes *Slit*, dans des cellules de cancer du poumon, augmente leur potentiel métastatique en inhibant l'activité de la GSK-3 β , *via* la voie PI3K/Akt. La β -caténine n'étant plus dégradée, est transloquée dans le noyau où elle va induire l'augmentation de l'expression du gène *Snail*, un régulateur crucial de l'EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) ; il résulte alors une diminution de l'expression de la cadhérine, une réduction de l'adhésion ainsi qu'une augmentation de la mobilité cellulaire (Figure 28) [265].

Ces études démontrent donc, au moins dans les cancers du poumon et du sein, que la protéine Slit peut agir comme un suppresseur de tumeur, en favorisant le rôle d'adhésion de la β -caténine au niveau de la membrane, au détriment de son rôle prolifératif dans le noyau.

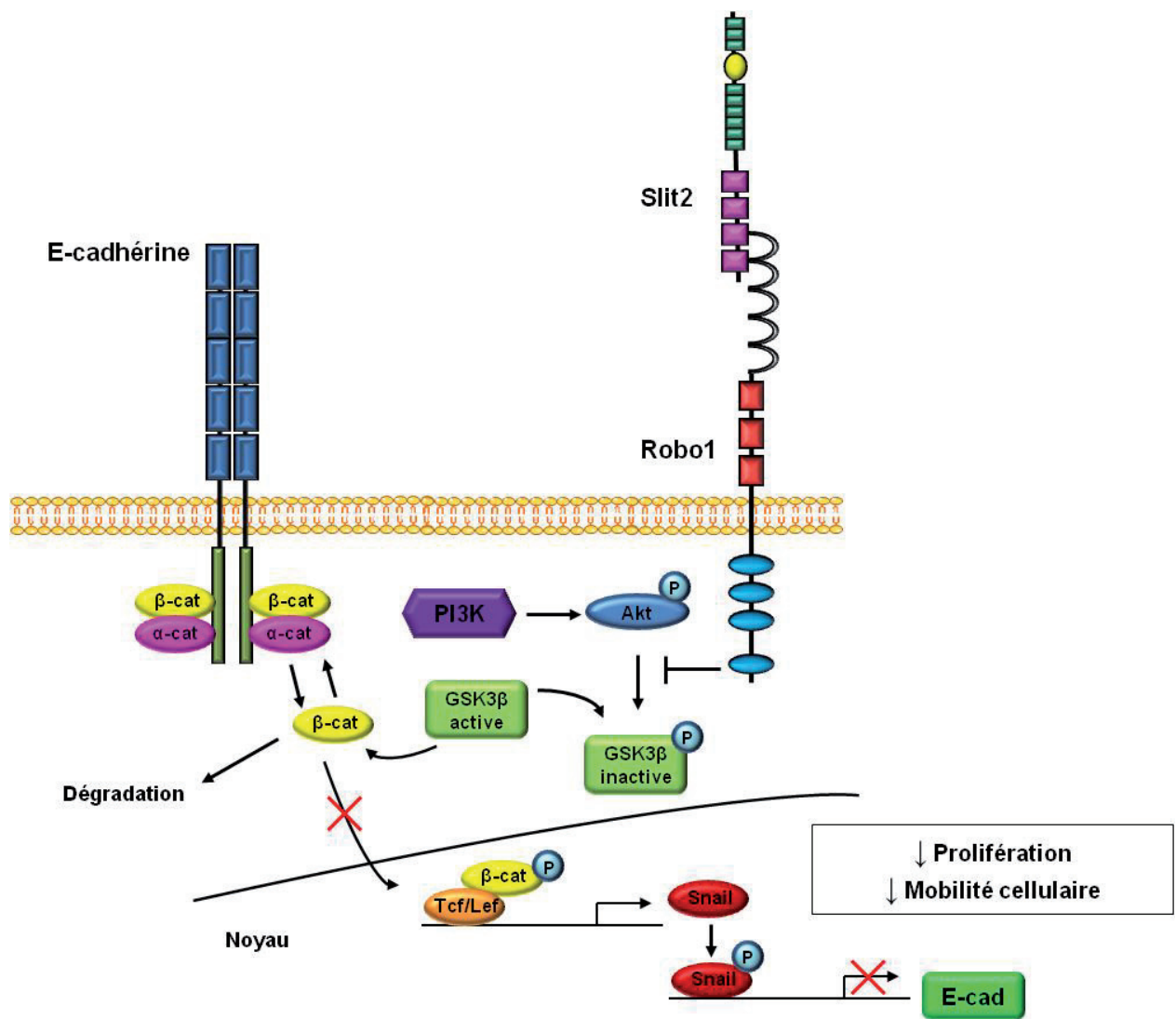


Figure 28. La voie de signalisation Slit/Robo régule la prolifération cellulaire ainsi que le contact cellule-cellule en contrôlant la localisation de la β -caténine.

La liaison de Slit à Robo1 inhibe l'activité de la PI3K. La GSK-3 β reste alors sous sa forme active non phosphorylée et phosphoryle la β -caténine, inhibant sa translocation nucléaire et donc son activité transcriptionnelle. La β -caténine, restant dans le cytoplasme, est soit dégradée, soit transférée à la membrane où elle interagit avec l'E-cadhérine et stabilise alors le contact cellule-cellule et empêche la migration. Enfin, l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine inhibe l'expression du gène *Snail*, levant ainsi la répression du gène de l'*E-cadhérine* et favorisant ainsi le contact entre les cellules.

Inversement, un rôle d'inducteur de la prolifération cellulaire du gène *Slit* a également été décrit dans la littérature. En effet, dans des lignées cellulaires dérivées de carcinomes colorectaux, la signalisation Slit/Robo induit la croissance tumorale ainsi que le développement de métastases en régulant la dégradation de la cadhérine et par conséquent en augmentant la prolifération et la migration cellulaire. Une surexpression de Slit2 ou de Robo1 dans ces cellules permet le recrutement de l'ubiquitine ligase Hakai au niveau de l'E-cadhérine. Cette dernière est alors dégradée suite à son ubiquitination. La dérégulation de l'E-cadhérine dans ces cellules est accompagnée d'une EMT et d'une augmentation de la prolifération et de la migration cellulaire. Dans un modèle de xénogreffe, cette dérégulation est associée à une augmentation de la croissance tumorale ainsi qu'au développement de métastases. Des données cliniques appuient ces observations : des échantillons de carcinome colorectal humain métastatiques présentent une augmentation de Slit et Robo1 qui corrèle inversement avec la survie des patients (Figure 29A).

La voie de signalisation Slit/Robo peut donc, suivant le contexte tumoral, agir de manière oncogénique en induisant la croissance et la migration cellulaire [266].

Un second mécanisme de dérégulation de la cadhérine, *via* la voie Slit/Robo, a été mis en évidence dans des cellules de rétine de poulet. La voie Slit/Robo induit alors le recrutement de la protéine Cables à la tyrosine kinase Abelson, liée à Robo. Cables permet alors la liaison entre les complexes Robo/Abl et N-cadhérine/ β -caténine. Abl peut alors phosphoryler la β -caténine sur sa tyrosine 489, induisant ainsi la dissociation du complexe N-cadhérine/ β -caténine. Ce détachement entraîne une perte d'adhésion cellulaire ainsi que la translocation nucléaire de la β -caténine phosphorylée qui active alors la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Figure 29B) [267].

Slit joue donc également un rôle prolifératif, dans ce modèle cellulaire, en diminuant l'adhésion cellulaire et en augmentant la prolifération cellulaire par différentes voies de signalisation.

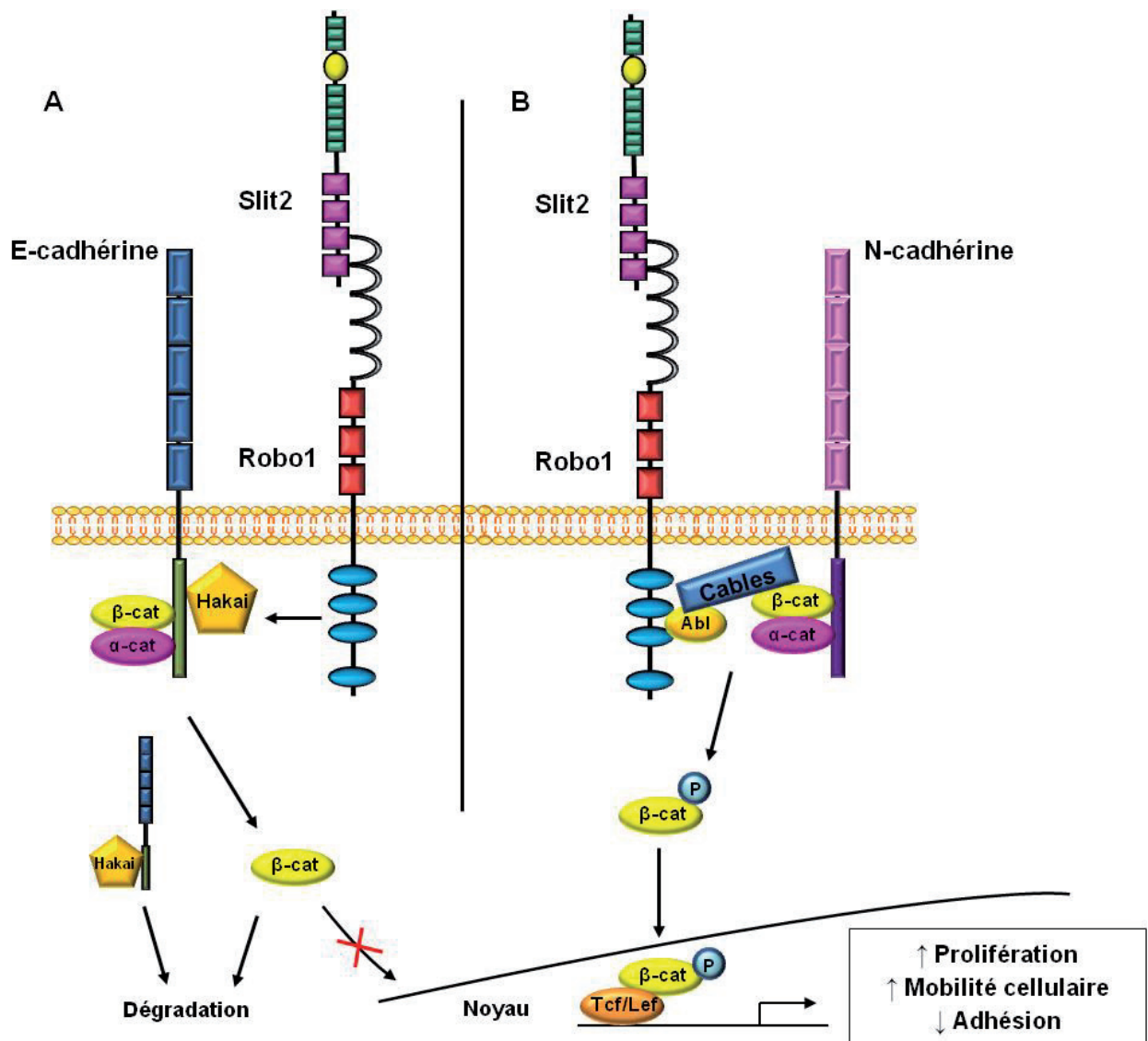


Figure 29. L'axe Slit2/Robo1 régule la prolifération et l'adhésion cellulaire en contrôlant la localisation de la β -caténine.

A. La voie de signalisation Slit/Robo conduit à la migration cellulaire en recrutant l'ubiquitine ligase Hakai à l'E-cadhérine et la β -caténine. Il en résulte une dégradation de ces protéines, diminuant ainsi l'interaction cellule-cellule et favorisant la migration cellulaire. De plus, cette dérégulation est accompagnée d'une augmentation de la prolifération cellulaire, bien que la β -caténine soit inactive transcriptionnellement.

B. Dans un autre contexte cellulaire, l'axe Slit/Robo permet le recrutement de la tyrosine kinase Abelson, qui se lie à l'adaptateur Cables. Cables lie le complexe Robo/Abl au complexe N-cadhérine/ β -caténine, permettant ainsi la phosphorylation de la β -caténine par Abl, induisant alors sa translocation dans le noyau où elle va activer la transcription de gènes responsables de la prolifération.

Ces différentes études suggèrent donc que la voie de signalisation Slit/Robo1 régule la prolifération cellulaire en ciblant à la fois les cadhérines et la β -caténine afin de réguler l'activité transcriptionnelle de la β -caténine.

3.3- Slit et Robo induisent la mobilité des cellules tumorales

Pour leur migration, les cellules métastatiques doivent perdre leur interaction avec les cellules voisines tumorales ou de l'environnement, réarranger leur cytosquelette d'actine afin de former des protusions nécessaires à leur mobilité. Les cellules doivent aussi se sensibiliser aux molécules chimio-attractantes et se désensibiliser aux facteurs inhibant la migration. La voie de signalisation Slit/Robo est impliquée dans chacune de ses étapes clés ; ils agissent à la fois comme suppresseurs de tumeurs et oncogènes, favorisant ou inhibant ainsi l'invasion tumorale, suivant le contexte cellulaire.

3.3.1- Régulation de l'interaction cellule/cellule

Les cadhérines sont exprimées dans les cellules épithéliales et jouent un rôle dans l'établissement des contacts entre les cellules et l'environnement. L'expression de la cadhérine est fréquemment dérégulée dans les cellules cancéreuses, induisant un détachement des cellules et par conséquent un phénotype métastatique. Les cellules tumorales peuvent alors migrer et envahir les vaisseaux sanguins pour disséminer dans un nouvel organe. La voie de signalisation Slit/Robo régule les premières étapes du développement métastatique en modulant l'adhésion cellulaire *via* son action sur la cadhérine et la β -caténine. Comme décrit précédemment, une conséquence de cette régulation est l'altération de la distribution de la β -caténine qui permet d'augmenter la prolifération lorsqu'elle est transloquée dans le noyau. L'interaction Slit/Robo permet également de réguler l'adhésion cellule-cellule médiée par la cadhérine (Figure 28). Une fois de plus, la voie de signalisation Slit/Robo peut réguler positivement ou négativement l'adhésion cellulaire.

Dans un contexte tumoral, il a été montré que la voie Slit/Robo induit la dégradation de l'E-cadhérine *via* le recrutement de la protéine Hakai, favorisant ainsi

la migration des cellules de carcinomes colorectaux (comme décrit ci-dessus) (Figure 29A) [266].

A l'inverse, Slit peut augmenter l'adhésion cellulaire en collaborant avec la P-cadhérine : les protéines Slit et P-cadhérine colocalisent dans les couches de cellules basales de la muqueuse buccale normale. Cette expression est dérégulée dans les cellules squameuses de carcinomes oraux (OSCC). Un complexe P-cadhérine/Robo3 est détecté dans les cellules OSCC surexprimant la P-cadhérine, et un traitement de ces cellules par Slit inhibe de façon dose-dépendante leur migration. L'utilisation d'un ARN interférent dirigé contre l'ARNm de Robo3 rétablit cette migration. La voie Slit/Robo semble donc jouer un rôle suppresseur de tumeur en maintenant l'adhésion cellule-cellule et par conséquent joue un rôle anti-invasif en augmentant l'expression des cadhérines [268].

3.3.2- Régulation du cytosquelette d'actine

Suite au détachement des cellules cancéreuses, le processus de progression tumorale requière une augmentation de la mobilité cellulaire, qui s'accompagne d'une hausse de la polymérisation d'actine ainsi que des protéines impliquées dans son renouvellement. La voie de signalisation Slit/Robo régule la mobilité cellulaire en contrôlant notamment l'activité de plusieurs protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine telles que les petites GTPases de la famille Rho (Rac, Cdc42 et RhoA) et d'autres régulateurs clés comme Abl et Ena.

- *Rho GTPases*

Plusieurs études ont démontré l'importance de la protéine Cdc42 dans la dispersion des cellules tumorales ; de plus, la voie de signalisation Slit/Robo inhibe l'invasion tumorale en diminuant l'activation de Cdc42. En effet, un traitement par Slit2 de cellules de médulloblastomes inhibe leur invasion sans affecter la direction de leur migration et leur prolifération. Les auteurs suggèrent que ces effets sont dus à la réduction de l'activité de Cdc42 [269]. Ces effets sont également observés dans des cellules de gliomes et échantillons primaires humains qui présentent une diminution de l'expression de Slit [270] [271]. Un traitement de ces cellules par du Slit recombinant ou par la surexpression de Slit inhibe la migration et l'invasion cellulaire

en diminuant l'activité de Cdc42. Cet effet est réversible par l'utilisation d'un siRNA dirigé soit contre Slit, soit contre Robo. De plus, des expériences de xénogreffes montrent une diminution de l'infiltration des cellules de gliomes exprimant Slit2 dans le cerveau [270]. Enfin, aucune étude ne démontre que ces effets sont la conséquence d'une régulation de la β -caténine, car ni le taux, ni le statut de phosphorylation de la β -caténine, ni son association avec la N-cadhérine ne sont altérés dans les cellules de gliomes exprimant Slit [270].

Ces études mettent donc en évidence une régulation négative de la petite GTPases Cdc42 par la voie de signalisation Slit/Robo dans les tumeurs neuronales. Avec leur rôle central dans la régulation du cytosquelette d'actine, les Rho GTPases semblent donc être de bons candidats pour réguler la mobilité cellulaire en réponse à Slit (Figure 30A).

Comme décrit précédemment (partie 2.1.2 Rho GTPases), l'activité des protéines de la famille Rho est modulé par des protéines GAP et GEF. La srGAP est un régulateur clé qui inhibe l'activité de Cdc42 en réponse à l'interaction Slit/Robo. La srGAP réduit l'activité de Cdc42 et Rho mais pas de Rac. De plus, un dominant négatif de la srGAP bloque l'inactivation de Cdc42 induit par Slit et par conséquent induit la migration cellulaire (Figure 30A) [240].

Une étude sur des cellules épithéliales tumorales et non transformées a montré que l'interaction Slit2/Robo1 inhibe la migration induite par le HGF (Hepatocyte Growth Factor) en inhibant directement Cdc42, empêchant ainsi la formation de protusions d'actine [272].

L'ensemble de ces études montrent donc que Slit inhibe la mobilité des cellules tumorales en régulant négativement la Rho GTPase Cdc42 ; par conséquent, une perte de l'expression de Slit par les cellules durant la progression tumorale induit de façon inappropriée la migration.

- *Abelson et Enabled*

En dehors de son rôle régulateur de la famille de petites GTPases Rho, la voie de signalisation Slit/Robo conduit aussi au recrutement d'une kinase qui régule à la fois les réarrangements du cytosquelette d'actine et l'activité des Robo. La kinase Abelson et son substrat Enable (Mena chez les mammifères) interagissent directement avec le domaine cytoplasmique de Robo. Comme décrit précédemment (partie 2.1.1- Abelson et Enabled), ces deux protéines jouent un rôle opposé dans le guidage axonal : Abl inhibe le signal répulsif induit par Robo, tandis que Ena l'induit [239]. De plus, Abl peut phosphoryler Robo et ainsi inhiber sa fonction. En effet, une mutation dans une tyrosine conservée présente sur la partie intracellulaire de Robo peut être ciblée par Abl induisant alors une hyper-activation de Robo [239].

Peu d'études dans la littérature décrivent par quels mécanismes Ena et Abl contribuent à la migration de cellules tumorales en réponse à Slit. Cependant, Khusial *et al* ont montré que la transformation de cellules, *via* l'oncogène Src, résulte d'une activation d'Abl, qui stabilise alors Robo1 à la membrane plasmique, conduisant à l'activation de Cdc42 et Rac ainsi qu'à une migration cellulaire indépendante de Slit (Figure 30B) [273]. Par conséquent, Robo1 peut réguler positivement, dans ce contexte tumoral, les Rho GTPases sous-jacentes et induire la migration, tandis que dans le système nerveux ainsi que dans d'autres cellules cancéreuses, Robo1 présente un rôle inhibiteur.

La voie de signalisation Slit/Robo peut donc réguler le réarrangement du cytosquelette d'actine, nécessaire à la mobilité cellulaire, bien que la nature de la réponse dépende du contexte.

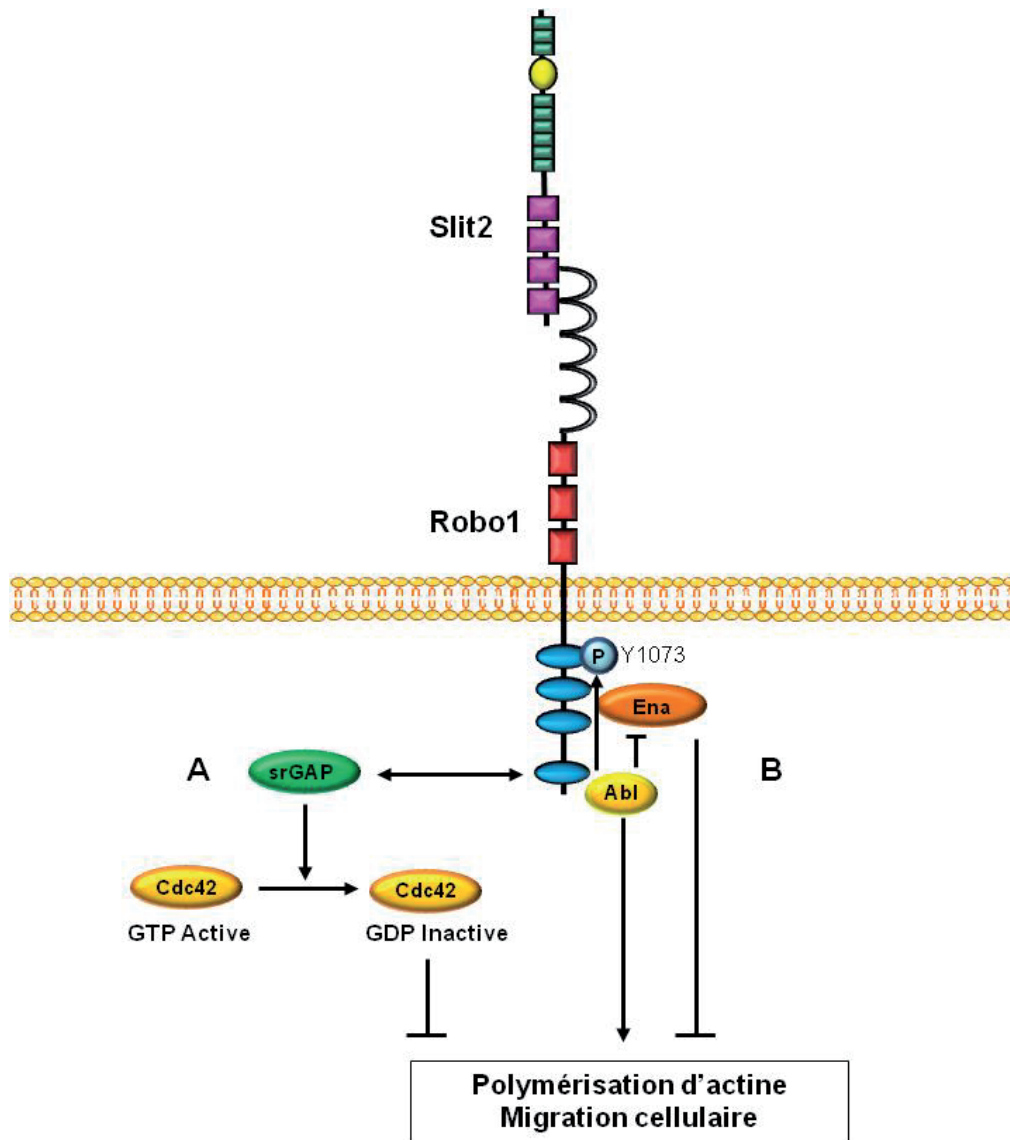


Figure 30. La voie de signalisation Slit/Robo régule la migration cellulaire en contrôlant l'activation de régulateurs du cytosquelette d'actine.

A. La voie de signalisation Slit/Robo régule la polymérisation de l'actine et par conséquent la migration cellulaire en contrôlant le niveau de Rho GTPases actives. L'axe Slit2/Robo1 inhibe la migration en recrutant, au domaine intracellulaire de Robo1, la srGAP qui inactive la petite GTPases Cdc42 responsable de la polymérisation de l'actine.

B. La fonction anti-migratoire de la voie Slit/Robo est régulée par la kinase Abelson, qui inhibe le récepteur Robo1 en phosphorylant la tyrosine 1073, empêchant alors la liaison d'Enabled. Abl peut aussi inhiber directement Ena. En l'absence d'Abl, Ena peut se lier au domaine intracellulaire de Robo1 et inhiber la migration en empêchant la polymérisation de l'actine.

3.3.3- Régulation du chimiotactisme cellulaire

Afin de pouvoir migrer, les cellules doivent répondre à différents signaux. En effet, les cellules, normales ou métastatiques, ne suivent pas un chemin au hasard et ciblent des organes spécifiques. Pour migrer, les cellules répondent à différents facteurs, tels que les facteurs de croissance, PDGF, HGF, des chémokines, comme CXCL12, ou bien des protéines initialement découvertes dans le système nerveux telles que les Slits, qui peuvent elles-mêmes moduler la migration induite par ces différents facteurs [274] [272] [275].

La voie de signalisation Slit/Robo peut inhiber la migration de leucocytes induite par CXCL12. Un test de migration, en chambre de boyden, a été utilisé pour évaluer l'effet de Slit sur la migration des leucocytes en réponse au CXCL12 : Slit, qu'il soit ajouté dans la chambre supérieure, inférieure ou les deux, inhibe la migration des leucocytes, ce qui suggère que Slit diminue la mobilité globale des cellules, plutôt que d'agir en tant que facteur répulsif. De plus, une pré-administration de Slit2, par voie intraveineuse ou en intra-péritonéale, chez des souris, diminue significativement le recrutement de neutrophiles au site de l'inflammation [276]. Un traitement par Slit2 permet donc de diminuer le recrutement de leucocytes ainsi que les dommages tissulaires dus à l'inflammation. Slit2 agit donc comme un anti-inflammatoire.

Enfin, comme décrit précédemment, Ye *et al* ont montré que Slit2 régule le recrutement des éosinophiles et la répulsion des neutrophiles *via* une expression différentielle de srGAP1 durant l'inflammation du poumon [9].

Lors du processus de cancérisation, les tumeurs provoquent des plaies non cicatrisées, caractérisées par une inflammation chronique, qui va promouvoir la croissance tumorale en libérant des facteurs de croissance et survie, en favorisant l'angiogenèse ainsi que le remodelage de la matrice extracellulaire conduisant à l'invasion. Slit peut donc inhiber l'infiltration des leucocytes mais aussi des cellules dendritiques, des lymphocytes T et des monocytes [277] [278]. Slit peut donc être utilisé en thérapie afin de normaliser l'inflammation en inhibant l'infiltration des cellules ayant des propriétés pro-tumorales et en recrutant des cellules aux propriétés anti-tumorales.

Slit est également capable d'inhiber la migration des cellules cancéreuses, ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence la capacité de la voie Slit/Robo à inhiber l'effet pro-migratoire et pro-métastatique de l'axe chimioattractant CXCL12/CXCR4. Muller *et al* ont démontré que le chemin des métastases de cancer du sein est gouverné en partie par cet axe de chimio-attraction [98]. Une autre étude a démontré que CXCR4 est régulé positivement dans des cellules de cancer du sein et les guide vers les organes exprimant un taux de CXCL12, tels que le poumon, le foie ou l'os [279]. L'expression de CXCR4 est également retrouvée dans d'autres types cellulaires, qui répondent aussi à CXCL12, tels que les cellules de carcinome de prostate, de leucémie et les lymphocytes B de lymphomes [280]. Prasad *et al* ont démontré, *via* des tests de migration, que Slit2 inhibe le chimiotactisme, induit par CXCL12, des cellules de cancer du sein exprimant les récepteurs CXCR4 et Robo1. Par son interaction avec Robo1, Slit2 inhibe plusieurs effecteurs sous-jacents activés par CXCR4, tels que la FAK (Focal Adhesion Kinase), la paxilline, PI3K, les MAPK ou bien les MMP2/9 (Figure 31) [8].

L'expression de Slit2 est fréquemment dérégulée dans les cancers du sein et est souvent associée à une surexpression du couple CXCR4/CXCL12, contribuant au développement de lésions hyperplasiques de la glande mammaire chez des souris KO pour *Slit2* ou *Robo1* [264].

Par ailleurs, comme décrit dans la partie « 1.4.3 modifications post-transcriptionnelles », la voie de signalisation Slit/Robo peut également inhiber la migration de cellules de cancer du sein induite par CXCL12, *via* la protéine USP33. Slit inhibe la chimio-attraction des cellules tumorales en induisant la redistribution de Robo1 à la membrane plasmique de façon dépendante d'USP33 [238].

Slit inhibe la migration des cellules métastatiques, induite par CXCL12, il peut donc être considéré comme une cible thérapeutique de choix dans le cas de cancers métastatiques.

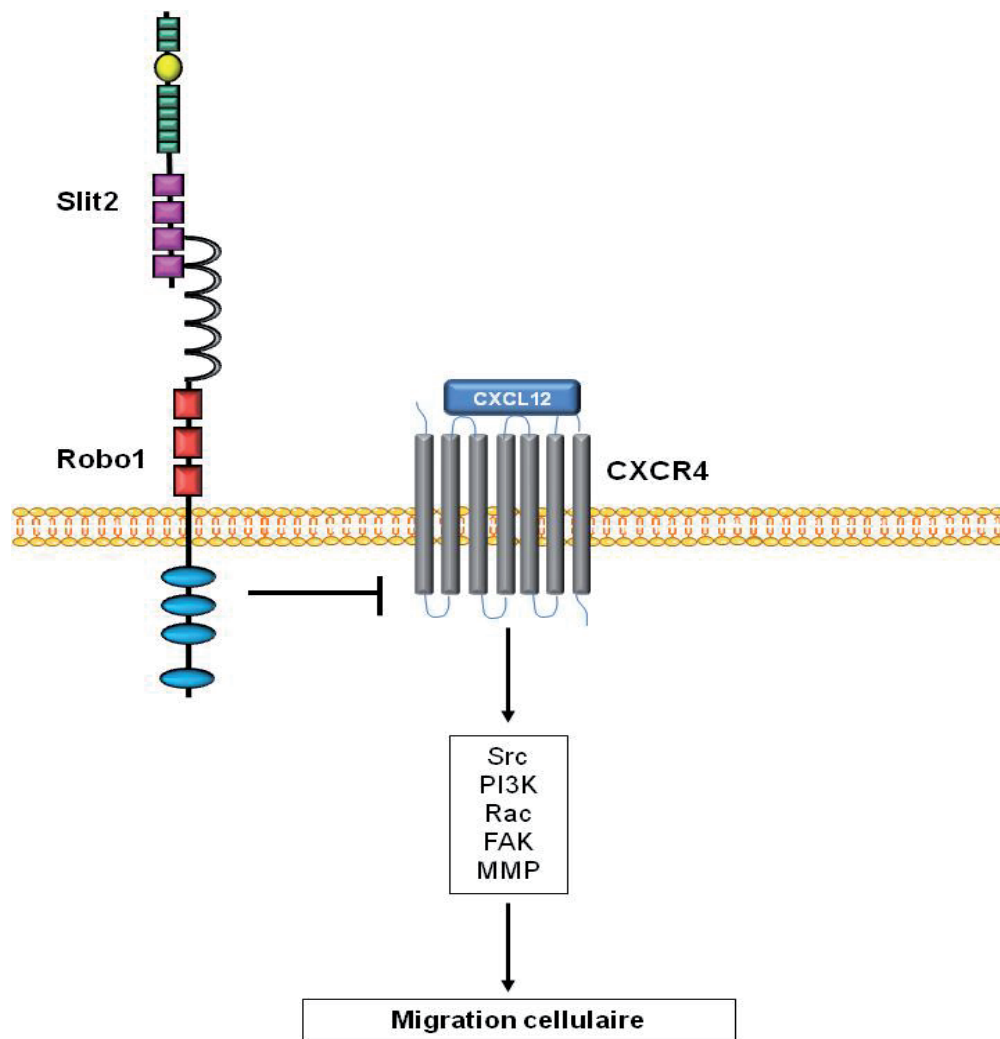


Figure 31. L'interaction Slit2/Robo1 inhibe la migration induite par l'axe CXCL12/CXCR4.

Cependant, une étude a montré que Slit2 peut également induire la migration de cellules tumorales et favoriser ainsi les métastases au cerveau de cellules de cancer du sein. Afin d'évaluer l'effet de Slit2 sur la migration, induite par CXCL12, de cellules cancéreuses exprimant Robo1, des tests de migration ont été réalisés et ont étonnamment montré que Slit2 inhibe cette migration [281].

3.4- Implication de la voie Slit/Robo dans l'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse correspond au processus de formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants matures. Ce processus apparaît naturellement

lors du développement et plus tard dans la vie adulte suite à des blessures ou lors de la grossesse. L'angiogenèse comporte plusieurs étapes : premièrement, les cellules endothéliales migrent vers un stimulus angiogénique, tel que le VEGF ; deuxièmement, les cellules acquièrent une mobilité et migrent vers leur source angiogénique pour former de nouveaux vaisseaux [282].

Les cellules tumorales détournent fréquemment plusieurs aspects de ce processus afin de permettre la croissance tumorale et les métastases ; ces processus requièrent de l'oxygène et d'autres nutriments qui sont apportés par les vaisseaux nouvellement formés. Sans l'angiogenèse, les tumeurs sont limitées dans leur croissance et deviennent nécrotiques. Les cellules tumorales doivent donc induire l'angiogenèse afin de permettre leur croissance ainsi que leur dissémination. Ce processus nécessite donc une communication entre les cellules tumorales et endothéliales [282] et plusieurs études démontrent un rôle important de la voie de signalisation Slit/Robo dans cette communication. Cependant, la façon dont la voie Slit/Robo affecte l'angiogenèse tumorale reste floue. En effet, les études montrent à la fois un rôle pro et anti-angiogénique suivant le contexte pathologique. Toutefois, les protéines Slit et Robo jouent un rôle clé dans le processus d'angiogenèse tumorale.

3.4.1- Expression et rôles des protéines Slit et Robo dans la vascularisation

- *Expression vasculaire*

Plusieurs études ont montré l'expression des protéines Slit1-3 dans le tissu vasculaire normale, les cellules du muscle lisse ainsi que dans les cellules endothéliales [283] [274] [284] [216]. Parmi les récepteurs Robo, Robo4 semble être le plus exprimé et est présent dans toutes les cellules endothéliales, tandis que Robo1 n'est exprimé que dans quelques types cellulaires des vaisseaux sanguins [212] [223] [225].

- *Robo4 induit l'angiogenèse*

L'expression de Robo4 a été initialement mise en évidence par des données bio-informatiques ; une analyse de son expression a permis de révéler sa présence exclusivement aux sites actifs d'angiogenèse, et plus particulièrement dans les vaisseaux tumoraux [212]. Toutefois, nous allons, dans cette partie, nous intéresser au rôle des récepteurs robo dans la vascularisation au cours du développement.

Kaur *et al* ont montré que Robo4 peut induire des mécanismes d'attraction au cours du développement vasculaire. En effet, une surexpression de Robo4 dans des cellules endothéliales porcines ou dans des HEK-293T a permis de montrer, *in vitro*, que Robo4 active les Rho GTPases Cdc42 et Rac1, induisant ainsi la formation de filopodes et lamellipodes dans les cellules endothéliales, favorisant par conséquent la migration cellulaire. La protéine GEF responsable de l'activation de ces Rho GTPases n'est pas encore connue (Figure 32). A l'inverse, des lysats cellulaires, provenant d'embryons de zébrafish KO pour le gène *Robo4*, présentent un taux plus faible de ces Rho GTPases actives. De plus, des angioblastes, isolés de ces embryons, présentent un comportement caractéristique de cellules cherchant leur chemin. Robo4 induit donc des signaux attractifs, *via* l'activation de Rho GTPases, dans le guidage des cellules endothéliales lors de la vascularisation chez les vertébrés [285].

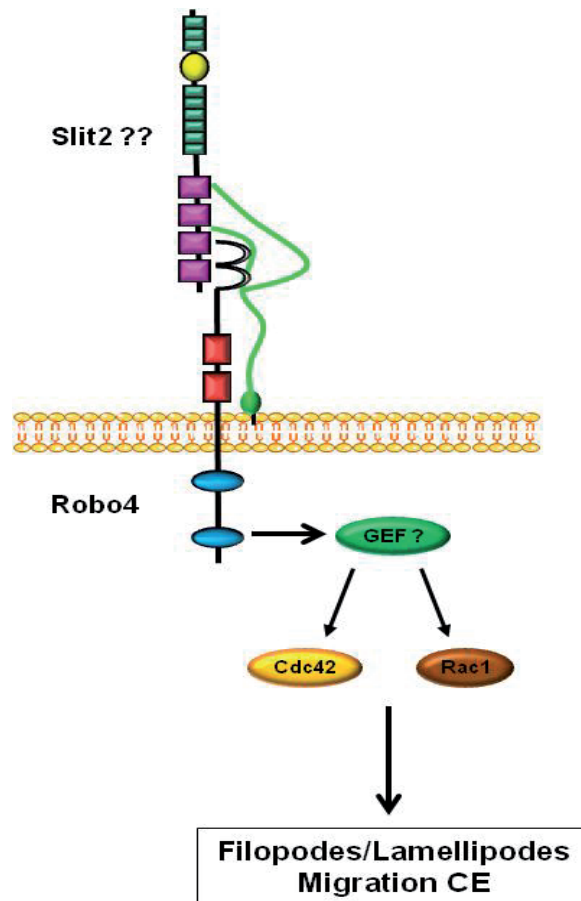


Figure 32. Robo4 induit l'angiogenèse via l'activation de Rho GTPases.

Robo4 active, via une GEF inconnue, les Rho GTPases Cdc42 et Rac1 qui induisent des changements du cytosquelette d'actine pour former des filopodes et lamellipodes. Les cellules endothéliales (CE) peuvent alors migrer.

- *Robo4 stabilise l'angiogenèse*

A l'inverse, plusieurs études montrent l'implication de Robo4 dans la stabilisation du réseau vasculaire et donc dans l'inhibition de la migration de cellules endothéliales. Dans ce cas, Robo4 régule l'angiogenèse en inhibant la voie de signalisation VEGF/VEGFR sous-jacente. En effet, le VEGF est capable d'induire la migration des cellules endothéliales et donc l'angiogenèse en activant Rac par l'intermédiaire de la GTPase Arf6. Toutefois, il a été montré que Robo4 pouvait interagir directement avec la paxilline et la protéine GIT, une ArfGAP (ADP-Ribosylation Factor-directed GAP), pour bloquer l'activation de la protéine Arf6. Ainsi, l'axe Slit2/Robo4/Paxilline/GIT inhibe la formation de protusions cellulaires et donc la

migration des cellules endothéliales, induites par le VEGF, en bloquant l'activité de la protéine Arf6 (Figure 33) [283].

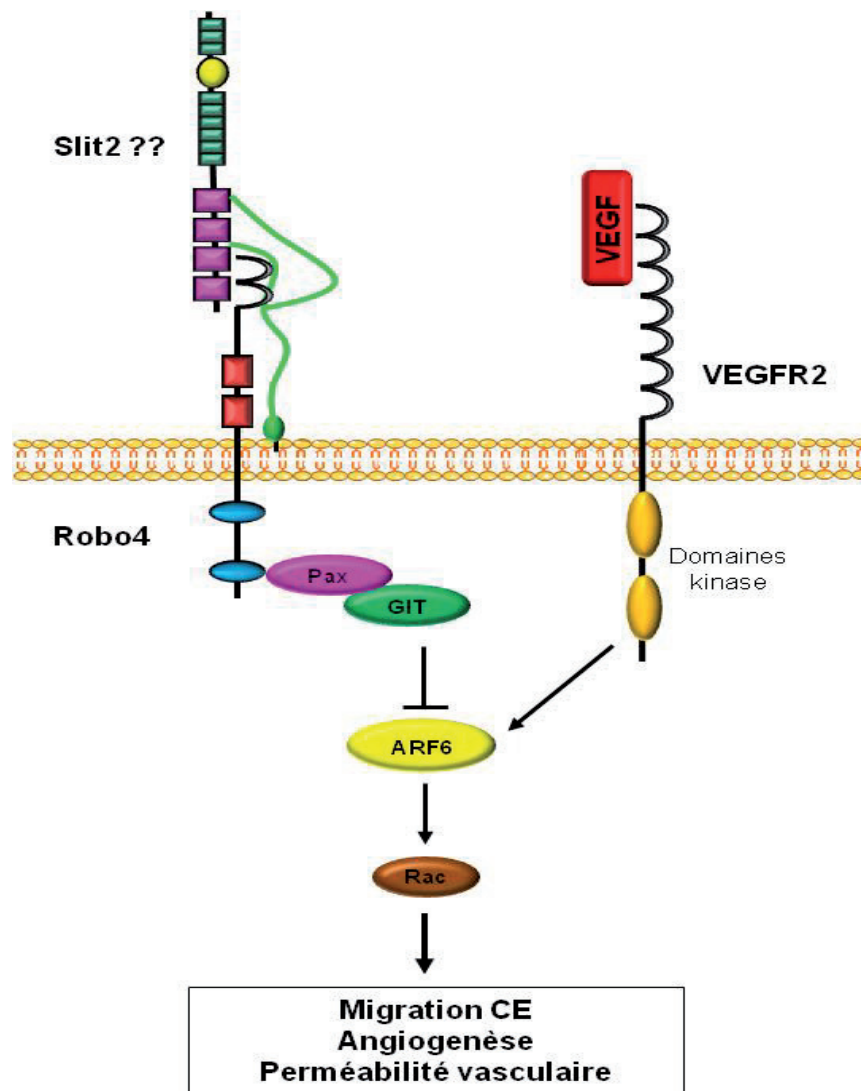


Figure 33. L'interaction Slit2/Robo4 inhibe l'angiogénèse induite par la voie du VEGF.

La voie de signalisation du VEGFR2 induit l'activation séquentielle des protéines Arf6 et Rac, conduisant ainsi à la formation de protusions cellulaires. L'interaction Slit2/Robo4 stimule le recrutement du complexe Paxilline-GIT au domaine CC2 intracellulaire de Robo4. La protéine GIT, qui est une ArfGAP, inactive alors Arf6 et Rac inhibant ainsi l'activité protusive nécessaire à l'angiogénèse.

L'interaction VEGF/VEGFR peut aussi induire l'angiogénèse *via* l'activation des protéines Src et FAK. Dans ce cas, Robo4 peut également inhiber cette voie de signalisation induisant ainsi une stabilisation du réseau vasculaire. En effet, il a été

démontré que le KO de *Robo4* dans l'endothélium de la glande mammaire induit une augmentation de la croissance des vaisseaux en activant le récepteur 2 du VEGF, qui est alors responsable de l'activation des kinases Src et FAK. A l'inverse, la perte d'expression de *Robo1* n'affecte pas la formation des vaisseaux. De plus, les auteurs ont également identifié une source stromale de Slit produit par les cellules entourant les vaisseaux sanguins, dans la glande mammaire. Une perte de l'expression de *Slit* dans ce stroma conduit à une élévation de la densité et de la complexité des vaisseaux sanguins. Il est également intéressant de noter qu'une perte d'expression de Slit dans le compartiment épithélial de la glande mammaire n'affecte pas le réseau vasculaire. Par conséquent, une source stromale, plutôt qu'épithéliale, de Slit inhibe la croissance des vaisseaux sanguins dans la glande mammaire *via* son interaction avec le récepteur endothélial Robo4 qui dérégule alors la voie de signalisation VEGF/VEGFR sous-jacente [284].

En plus de contrôler différentes voies de signalisation intracellulaire, Robo4 peut aussi moduler l'angiogenèse suivant le ligand considéré. L'interaction Slit2/Robo4 reste très controversée, toutefois il a été mis en évidence très récemment que Robo4 pouvait interagir avec le récepteur à dépendance UNC5b. La découverte, par Koch et ses collègues, de la liaison inattendue entre deux récepteurs endothéliaux de guidage, Robo4 et UNC5b, suggère qu'il existe donc des mécanismes alternatifs pour la signalisation de Robo4 notamment dans la vascularisation [226]. La caractérisation de cette interaction révèle de façon surprenante que Robo4 agit comme le ligand et non comme le récepteur. La protéine Robo4 solubilisée restaure l'hyperperméabilité des vaisseaux de souris Robo4^{-/-} et réduit l'hyperperméabilité induite par le VEGF chez des souris sauvages, mais pas chez des souris traitées avec un anticorps anti-UNC5b, suggérant ainsi que Robo4 maintient l'intégrité des vaisseaux en se liant à UNC5b et en induisant sa signalisation sous-jacente. Dans cette étude, la voie Robo/UNC5b inhibe l'activation de la kinase Src normalement induite par le VEGF (Figure 34) [226].

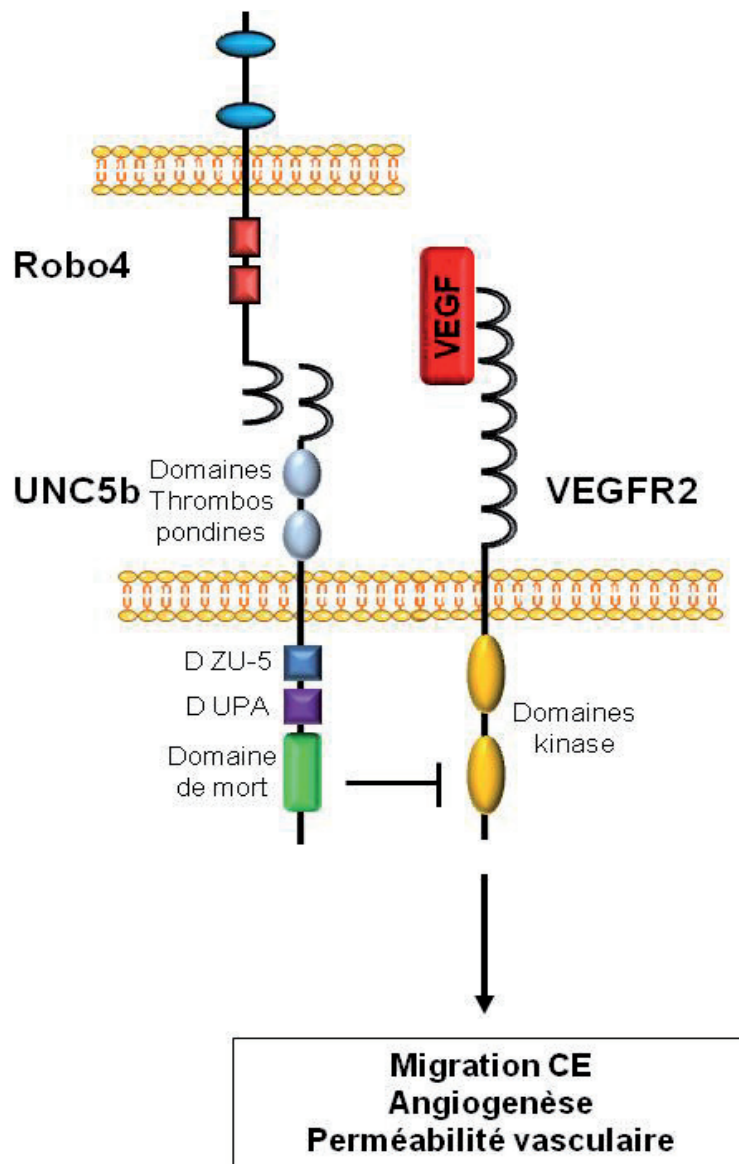


Figure 34. L'interaction Robo4/UNC5b inhibe l'angiogenèse.

Robo4 est capable de se lier à UNC5b et de bloquer ainsi le signal pro-angiogénique transduit par la voie de signalisation sous-jacente à l'axe VEGF/VEGFR2.

- *Robo1 et Robo4 régulent différemment la vascularisation*

Plusieurs études ont donc démontré que Slit pouvait affecter la migration des cellules endothéliales, soit en les attirant, soit en les réprimant. En examinant la littérature, Acedevo et ses collègues proposent un rôle opposé des récepteurs Robo1 et Robo4 dans la vascularisation [286]. En effet, par exemple, Park *et al* ont montré que l'interaction Slit2/Robo4 inhibe la migration des cellules endothéliales

[223], tandis que Wang *et al* ont démontré que la liaison Slit2/Robo1 induit un signal pro-angiogénique [215]. Ainsi Slit2 peut réguler à la fois positivement et négativement l'angiogenèse en se liant à Robo1 ou Robo4, respectivement. Dans cette hypothèse, l'activation de Robo4 par Slit2 contrecarre la signalisation du VEGF, inhibant ainsi l'angiogenèse (Figure 35) [286].

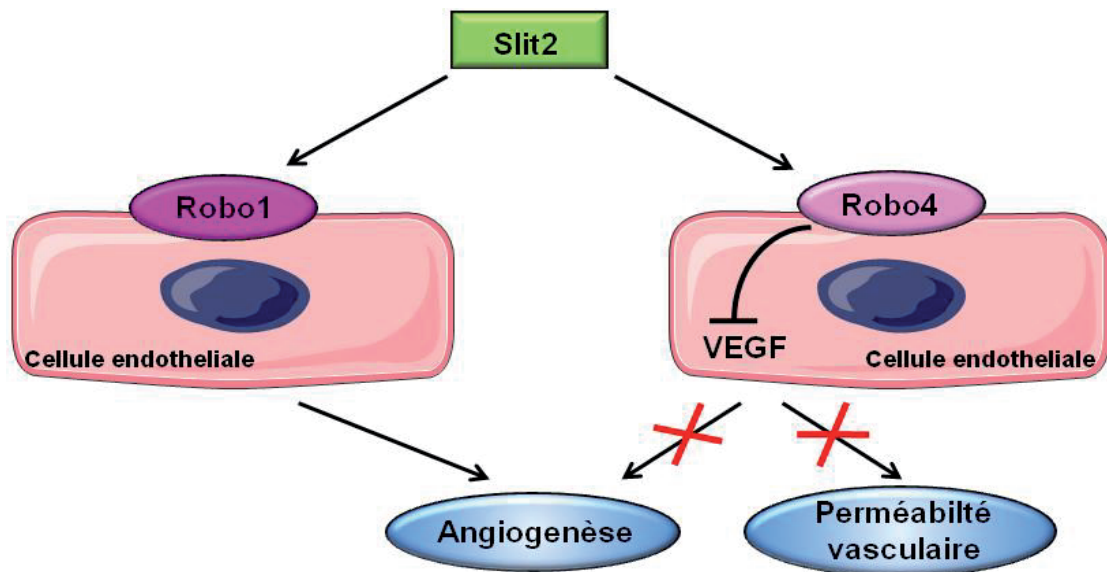


Figure 35. Régulation différentielle de l'angiogenèse par Slit2.

Slit2 peut réguler positivement et négativement l'angiogenèse en se liant à Robo1 et Robo4, respectivement. L'activation de Robo4 restreint la voie de signalisation du VEGF, inhibant ainsi l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire, normalement induites par la liaison du VEGF à son récepteur VEGFR2.

- *Hétérodimérisation Robo1/Robo4 et angiogenèse*

Les différentes études présentées ci-dessus montrent le rôle pro ou anti-angiogénique de Robo4, cependant le rôle de Robo1 pourtant présent dans certaines cellules endothéliales n'est pas très clair. Robo1 ne semble toujours pas être impliqué dans l'angiogenèse [284], cependant l'hétérodimérisation de Robo1 et Robo4 semble parfois nécessaire pour transduire le signal de Slit dans la vascularisation [225]. Comme décrit dans la partie « 1.3 - Robo4 un récepteur non conventionnel », Robo4 ne contient pas les acides aminés nécessaires à la liaison à

Slit2, suggérant une impossibilité d'interaction entre ces deux protéines [211]. Par conséquent, Robo1 peut agir comme co-récepteur pour Robo4 ; dans ce cas, l'hétérodimère Robo1/Robo4 promeut alors la migration des cellules endothéliales ainsi que l'angiogenèse. Sheldon *et al* ont montré qu'un KO de *Robo1* ou *Robo4*, dans les cellules endothéliales HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell), diminue leur mobilité, suggérant que ces deux récepteurs sont nécessaires. De plus, la liaison de Slit2 au complexe Robo1/Robo4 augmente le nombre de filopodes dans les cellules endothéliales et augmente leur migration. Les auteurs ont aussi démontré, par double-hybride, l'interaction entre le récepteur Robo4 et la protéine Wasp (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein), qui est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine. Les auteurs émettent alors l'hypothèse que l'interaction Robo1/Robo4 empêche le recrutement de la srGAP par Robo1, qui ne peut plus inactiver Cdc42. L'activation de Cdc42 ainsi que le recrutement de la protéine Wasp par Robo4 induisent alors la polymérisation d'actine permettant la formation de filopodes nécessaires à la migration des cellules endothéliales (Figure 36) [225].

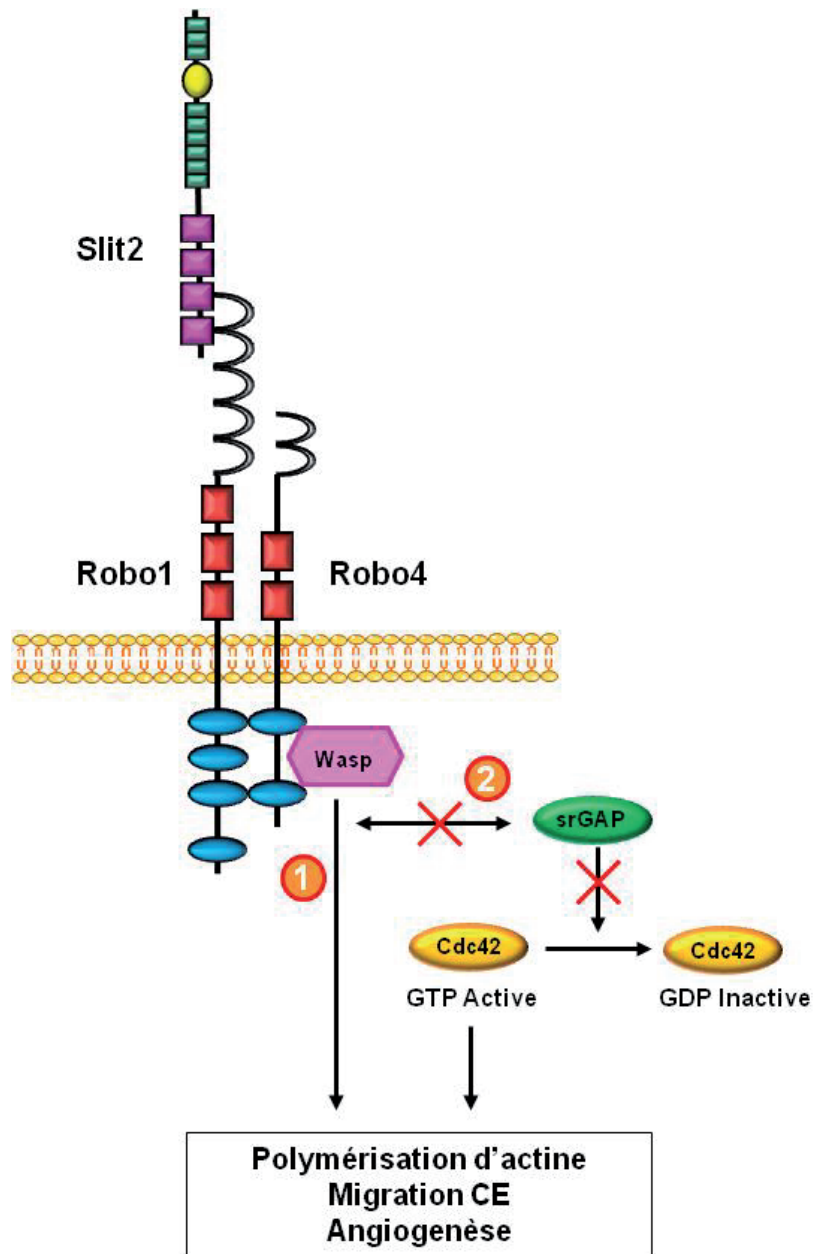


Figure 36. L'hétérodimérisation Robo1/Robo4 favorise l'angiogenèse.

Les récepteurs Robo1 et Robo4 peuvent s'hétérodimériser pour former un complexe dans lequel Robo1, en se liant à Slit2, joue le rôle de co-récepteur pour Robo4. L'interaction de Slit2 avec le complexe Robo1/Robo4 permet alors le recrutement de la protéine, de nucléation de l'actine, Wasp, favorisant ainsi la formation de filopodes et lamellipodes nécessaire à la migration cellulaire. L'hétérodimérisation de Robo4 avec Robo1 empêche également le recrutement de la srGAP à Robo1. Cdc42 reste donc active induisant alors la polymérisation de l'actine et ainsi la migration des cellules endothéliales (CE) et l'angiogenèse.

3.4.2- Implication des protéines Slit et Robo dans la régulation de l'angiogenèse tumorale

- *Altération de la voie de signalisation Slit/Robo dans les cancers*

Une étude a récemment permis d'identifier Robo4 comme étant un nouveau marqueur tumoral endothélial, qui peut être utilisé comme cible thérapeutique anti-angiogénique. En effet, Robo4 est fortement exprimé dans les vaisseaux tumoraux, comparé aux vaisseaux de tissus sains [287]. Cependant, une diminution de l'expression de Robo4 est aussi observée dans des échantillons de carcinomes hépatocellulaires [7]. L'expression de Robo1 et Slit2 peut aussi être altérée dans les cellules endothéliales de tumeurs, agissant alors comme des facteurs pro-angiogéniques [215] [254].

- *Implication de la voie de signalisation Slit/Robo dans les cancers*

La croissance tumorale ainsi que la formation de métastases requièrent une augmentation de l'apport en oxygène et nutriments, réalisable grâce une augmentation de l'angiogenèse de l'environnement vasculaire [282]. Afin d'augmenter l'angiogenèse, les cellules tumorales doivent alors déréguler les signaux anti-angiogéniques et sécréter et/ou induire la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques [288].

Actuellement, aucune étude ne montre directement le rôle de Robo4 dans l'angiogenèse tumorale. Toutefois, Marlow *et al* ont montré qu'une perte de *Robo4*, dans des lésions prénéoplasiques du sein, augmente l'angiogenèse en réponse aux VEGF et CXCL12 [284].

A l'inverse, Wang et ses collègues ont montré que Robo1 est exprimé dans les cellules endothéliales tumorales et joue un rôle dans la formation de nouveaux vaisseaux dans les tumeurs présentant une surexpression de son ligand Slit. Dans cette étude, le domaine extracellulaire de Robo1, ou un anticorps bloquant appelé R5, inhibe la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes capillaires, en réponse au Slit2 sécrété par des cellules humaines de mélanomes A375. L'interaction Slit2/Robo1 inhibe également l'angiogenèse tumorale dans des modèles de xénogreffes. Slit2 fonctionne donc de façon pro-angiogénique dans les tumeurs

qui le surexpriment, *via* Robo1 et non Robo4 [215]. La voie de signalisation Slit/Robo permet donc un dialogue entre les cellules cancéreuses et endothéliales.

La voie de signalisation Slit/Robo semble donc jouer un rôle à la fois pro et anti-angiogénique. Une explication possible de ce rôle apparent a été donnée par Dunaway et ses collègues dans laquelle Slit2 seul induirait l'angiogenèse, alors qu'il l'inhiberait en présence d'éphrine A1 [289]. Une autre étude montre également que Slit2, régulé négativement par le récepteur endothélial EphA2, agit comme un facteur angiocrine suppresseur de tumeur [254]. L'activité de Slit2 est en effet élevée dans l'endothélium déficient en EphA2. De plus, le blocage de Slit2 restaure la mobilité ainsi que la croissance tumorale, tandis que Slit2 les inhibe. L'expression du récepteur EphA2 est inversement corrélée avec celle de Slit2 dans la vascularisation d'échantillons de carcinomes ductaux humains invasifs. De plus, l'analyse de différentes tumeurs du sein a révélé que Slit2 corrèle positivement avec la survie sans rechute métastatique, validant ainsi Slit2 comme un gène suppresseur de tumeur dans le cancer du sein, ce qui en fait une cible thérapeutique judicieuse. Ces résultats démontrent donc un nouveau mécanisme, pertinent cliniquement, à travers lequel le récepteur EphA2 réprime l'expression de Slit2 dans l'endothélium, facilitant ainsi la croissance et la mobilité des cellules endothéliales tumorales, en bloquant un signal suppresseur [254].

En conclusion, depuis leur découverte comme régulateurs clés de la migration des axones dans le système nerveux en développement, les membres de la voie de signalisation Slit/Robo ont été impliqués dans de nombreux processus développementaux et pathologiques. Plus spécifiquement, les protéines Slit et Robo ont un impact significatif sur le comportement cellulaire, régulant ainsi leur adhésion, migration, prolifération, processus impliqués dans la progression tumorale. Une activation aberrante de cette voie peut induire la croissance des cellules tumorales ainsi que leur migration, contribuant ainsi à la formation de métastases et à un mauvais pronostic des patients. Les protéines Slit et Robo sont donc des candidats prometteurs comme agents thérapeutiques anti-cancéreux.

PARTIE III : Travail expérimental

Résumé des travaux expérimentaux

Mon travail de thèse a consisté à étudier l'implication de la protéine Robo4 dans la formation et le développement des métastases osseuses, toutefois les résultats de certaines expériences m'ont conduite à réaliser en parallèle les mêmes expériences sur les cellules déplétées en Robo1 afin de compléter un travail précédemment mené sur la protéine Robo1.

La corrélation entre l'expression de la protéine Robo4 et la rechute métastatique a été évaluée dans une cohorte de patientes présentant des tumeurs primaires du sein. Une forte expression de Robo4 est associée à un mauvais pronostic.

L'étude au niveau de la tumeur primaire de la déplétion de Robo4, par shARN dans les cellules MDA-MD-231/B02, montre une forte diminution du poids des tumeurs primaires implantées en orthotopique. A l'opposé, l'injection en parallèle des cellules déplétées en Robo1 montre une forte augmentation du poids des tumeurs primaires.

L'effet de la déplétion de Robo4 dans la formation et le développement des métastases osseuses induit des lésions ostéolytiques de mêmes étendues que chez les animaux contrôles, malgré une réduction de la charge tumorale osseuse. Une augmentation significative du nombre d'ostéoclastes est également observée, suggérant ainsi qu'une forte activité endogène stimulatrice des ostéoclastes est exercée par les cellules tumorales ShRobo4, ce qui explique probablement pourquoi aucune différence d'ostéolyse n'a été observée. Ces observations sont confirmées par des dosages des sérums des animaux métastatiques, ainsi que des milieux conditionnés des cellules déplétées en Robo4, dans lesquels une augmentation de la production de cytokines pro-ostéoclastiques est observée. Enfin, un test d'ostéoclastogénèse *in vitro* confirme que l'absence de Robo4 augmente de deux fois le nombre d'ostéoclastes.

L'absence de Robo4 entraîne également une forte diminution de la capacité de migration et d'invasion *in vitro* des cellules. Un test d'invasion sur la lignée parentale MDA-MB231/B02 traitée avec un anticorps dirigé contre Robo4 confirme cette observation. A l'opposé, un anticorps dirigé contre Robo1 entraîne une augmentation de l'invasion, ce qui corrèle avec de précédentes observations réalisées avec les cellules déplétées en Robo1.

Enfin, l'analyse de l'effet de ces déplétions dans la colonisation de la moelle osseuse par les cellules tumorales, à des temps précoces, a permis de mettre en évidence que la protéine Robo4 est nécessaire à la colonisation ainsi qu'à l'ancrage de ces cellules dans l'environnement osseux, alors que Robo1 ne présente aucun effet.

L'ensemble de ces travaux montre donc que le récepteur de guidage axonal Robo4 participe à l'invasion et à l'ancrage des cellules tumorales dans l'os et favorise la croissance tumorale. La protéine Robo4 présente donc un rôle antagoniste *in vivo* et *in vitro* de celui Robo1 dans la formation et le développement des métastases osseuses.

Introduction

Les métastases osseuses, dissémination du cancer aux os, surviennent chez plus de 1,5 million de patients atteints de cancer dans le monde et sont le plus souvent associées à des cancers de la prostate, du poumon et du sein, avec une incidence pouvant atteindre jusqu'à 75% des patients métastatiques [1]. Les cellules cancéreuses métastatiques qui résident dans la moelle osseuse altèrent les fonctions des cellules responsables de la résorption et de la formation osseuse, et détournent également les signaux provenant de la matrice osseuse [1]. En perturbant l'équilibre physiologique entre la résorption osseuse et la formation osseuse, les cellules métastatiques favorisent donc la destruction osseuse. L'altération osseuse, ainsi induite, conduit alors à l'apparition d'événements morbides au niveau du squelette, tels que des fractures, des compressions de la moelle épinière et des douleurs osseuses [1].

La découverte de l'implication des cellules métastatiques dans l'altération des fonctions des ostéoclastes et des ostéoblastes, au sein de la moelle osseuse, a conduit à l'élaboration de thérapies inhibant l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes, par utilisation de molécules telles que les bisphosphonates et le denosumab [290]. Ces agents thérapeutiques sont les plus utilisés pour retarder les événements de dégradation osseuse chez des patients atteints de cancers avancés avec métastases osseuses [290]. Cependant, ces traitements ne sont que palliatifs et ne confèrent pas de bénéfices dans la survie des patients ; une proportion importante des patients présentant un cancer avancé rencontrent encore des complications osseuses. Par conséquent, il est essentiel de comprendre les mécanismes moléculaires qui précèdent le développement de ces lésions osseuses afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'étude de profils d'expression génique de xénogreffes de tumeurs mammaires a permis, de mieux comprendre la base génétique conduisant à la formation de métastases, et de mettre ainsi en évidence l'existence de signatures génétiques spécifiques de cellules cancéreuses métastasant dans des organes spécifiques, tels que les os, le cerveau et les poumons [3]. Nous avons ainsi identifié des gènes dont l'expression est spécifiquement associée à des métastases de

cancer du sein humain [291] [292] [293]. Parmi ces gènes, ceux codant les récepteurs transmembranaires Roundabout (Robo) Robo1 et Robo4 ont été retrouvés spécifiquement surexprimés par les cellules du cancer du sein métastatique à l'os (Figure 37). L'implication de ces récepteurs dans la formation de métastases osseuses n'a encore jamais été décrite.

À ce jour, quatre récepteurs Robo (Robo1-4) et trois ligands Slits (Slit1-3) ont été caractérisés chez les mammifères [294]. Les récepteurs Robo1 et 3 et leurs ligands (Slits) ont été initialement identifiés pour leur implication au cours du développement du cerveau [294]. Les récepteurs Robo1 et 3, en réponse au signal Slit, empêchent la migration des axones vers des endroits inappropriés lors de l'assemblage du système nerveux. Robo1 et Robo4 sont également exprimés dans le système vasculaire : l'interaction Slit2/Robo1 inhibe l'angiogenèse ; Slit2/Robo4 participe également au maintien de l'intégrité vasculaire [283] [294]. De plus, les interactions Slit/Robo sont impliquées dans la régulation de la migration et de la mort cellulaire au cours du développement de différents tissus non-neuronaux tels que les poumons, les reins, le foie et les ovaires [295] [5] [208].

Dans les cancers humains, tels que le poumon, le sein, la prostate ou le rein, les gènes *Robo1* et *Slit2* sont souvent inactivés en raison de l'hyperméthylation de leur promoteur, leur conférant un rôle potentiel de gènes suppresseurs de tumeurs [294] [296]. En effet, la surexpression de Slit2 dans les lignées cellulaires humaines de cancer du sein, MCF-7 et MDA-MB-231, réduit la croissance orthotopique de tumeurs primaires chez les animaux [264] [297]. Il a été proposé que Slit2, en se liant à Robo1, exprimé par les cellules de cancer du sein, réduit la croissance des tumeurs en inhibant l'expression de CXCR4 [264] et/ou en bloquant la voie de signalisation PI3K/Akt [298]. À l'opposé, l'expression de Robo1 peut être accrue dans d'autres types de tumeurs telles que le cancer colorectal et les cancers du foie [294]. Sa surexpression est associée à un mauvais pronostic de survie dans les tumeurs du nasopharynx [6]. De plus, l'interaction Slit/Robo1 facilite la croissance, *in vivo*, de tumeurs de mélanome en induisant l'angiogenèse tumorale [294]. Dans la littérature, les interprétations de ces observations, apparemment contradictoires, suggèrent que les interactions Slit/Robo activent des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont différents selon les types cellulaires, impliquant probablement différentes voies de signalisation. Cela pourrait notamment expliquer pourquoi l'interaction Slit/Robo1 inhibe *in vitro* l'invasion de certaines lignées cellulaires cancéreuses (gliome, le

médulloblastome, du poumon, du sein et de cancers de la prostate), alors qu'elle la favorise dans d'autres lignées cellulaires (mésothéliome, cancer gastrique) [294] [296]. Dans les cancers du sein, il existe un consensus général selon lequel l'interaction Slit/Robo1 inhibe la migration des cellules tumorales *in vitro* et freine la croissance de tumeurs primaires *in vivo* [298] [264] [297]. Cependant, il n'a pas été encore déterminé si l'interaction Slit/Robo1 contribue au développement de métastases, de cancer du sein, dans des organes éloignés. Par ailleurs, la question de l'implication de Robo4 dans la formation des métastases osseuses n'a jamais été abordée.

Au cours de mon doctorat j'ai exploré les fonctions de Robo1 et Robo4 dans la formation et le développement expérimental de métastases osseuses humaines de cancer du sein.

Matériels et méthodes

Les patientes

Les caractéristiques cliniques et biologiques de la cohorte de patientes atteintes de cancer du sein ont été décrites par Berthier *et al*, 2010. Le suivi de cette cohorte de patientes des Hospices Civils de Lyon (n = 254) était en moyenne de 54 mois.

RT-PCR en temps réel

L'ARN total de tumeurs mammaires humaines et de la moelle osseuse murine a été extrait en utilisant le réactif Trizol (Sigma). Pour éliminer toute contamination d'ADN génomique, l'ARN total a été traité avec de la RNase-Free DNase I et purifié en utilisant des micro-colonnes RNeasy (Qiagen). La qualité de l'ARN a été évaluée à l'aide d'un Bioanalyser Agilent 2100 (Agilent Technologies). L'ADNc a été synthétisé avec le kit de synthèse d'ADNc iScript (Biorad). Les réactions de PCR ont été effectuées en utilisant un kit de qPCR SYBR® Green (Life technologies) dans des plaques 96 puits sur un système Mastercycler EP (Realplex2, Eppendorf, Hambourg-Eppendorf, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Les amorces spécifiques suivantes ont été utilisées :

La protéine humaine de liaison à la boîte TATA (TBP; ARN de contrôle endogène) : sens 5'-TGGTGTGCACAGGAGCAAG-3', et anti-sens 5'-TTCACATCACAGCTCCCCAC-3' ; Robo1: sens 5'-TCATTgTggTTgTTgCCAgT-3' , anti-sens 5'-ACCTgTgTCACCTgAggAC-3' ; Robo4: sens 5'-AgTggggAACTgTTggCAT-3' , anti-sens 5'-TTCCAgCTCAgACAgCCTCT-3' ; Slit2 murin : sens 5'-CTTgCCTAgAgCgTCAAACC-3', anti-sens 5'-gCACTCCACACCCATTTCT-3' ; protéine de la grande sous-unité ribosomale murine (mL32; ARN de contrôle endogène) : sens 5'-CAAggAgCTggAggTgCTgC-3', anti-sens 5'-CTgCTCTTTCTACAATggC-3'. Les RT-PCR en temps réel ont été réalisées suivant le programme : étape initiale de 2 minutes à 95°C, suivie de 40 cycles de 15 secondes à 95°C, 15 secondes à Tm (mL32 : 58°C, mSlit2 : 64°C, le TBP : 67°C, Robo1 : 63°C, Robo4 : 67°C), et 20 secondes à 72°C. Les expressions de Robo1 et

Robo4 ont été normalisées avec TBP. Celle de Slit2 murin a été normalisée avec mL32.

Lignées cellulaires, culture cellulaire et transfection

La lignée cellulaire de cancer du sein humain MDA-MB-231/B02, une sous-population de la lignée cancéreuse MDA-MB-231, a été sélectionnée pour son fort pouvoir métastatique osseux chez les animaux [299]. Un sous-clone exprimant une cassette Frt (MDA-MB-231/B02-Frt11), produit par Buijs *et al* [300], a été utilisé ici pour des expériences de transfection cellulaire.

De petits ARNs en épingle à cheveux (ShARN) dirigés contre l'ARNm Robo1 humain et leurs séquences contrôles correspondantes (ScARN) ont été conçus avec l'outil Si Designer (Promega). La séquence oligonucléotidique, ciblant l'ARNm Robo1, utilisée par paire est : 5'-CAgTACTAAgggAACAA-3' (site nucléotidique ciblé : 7179-7195).

Les shARN ainsi que les séquences contrôles ont été clonés avec le kit psiSTRIKE puromycine (Promega) sous le contrôle du promoteur U6. Les plasmides ont été transfectés dans des cellules MDA-MB-231/B02-Frt en utilisant le réactif Transfast (Promega). Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 2 semaines en présence de puromycine (2 µg/mL, PAA) et les clones ont été isolés en utilisant des cylindres de clonage.

Deux séquences ShARN ciblant deux régions différentes de l'ARNm Robo4 humain, ainsi que leurs séquences contrôles ScARN, ont été conçues à l'aide de l'outil siRNA Design (GenScript) et clonées dans le vecteur pRNA-U6.1/zeocin (GenScript). La première séquence oligonucléotidique utilisée est : 5'-GAGCAGAGAAGAGTGACGA-3' (site nucléotidique ciblé : 727-745) ; la seconde : 5'-TCTTACACGGCCTTGTTCA-3' (site nucléotidique ciblé : 975-993).

Après transfection, les cellules ont été cultivées pendant 3 semaines en présence de zéocine (800 µg/mL, Life technologies), et les clones ont ensuite été isolés en utilisant des cylindres de clonage. Les clones déplétés pour Robo1 ou Robo4 ainsi que leurs contrôles respectifs ont ensuite été sélectionnés par western blot.

La lignée cellulaire de fibrosarcome HT-1080 a été cultivée dans du milieu complet Eagle (LGC Standard) et complété avec du FBS à 10% (Lonza), et 1% de pénicilline

/ streptomycine (Life technologies). Les cellules ont été maintenues à 37 °C dans un incubateur à 5% de CO₂.

Les milieux conditionnés, obtenus à partir des différentes lignées cellulaires, ont été récupérés après 48 heures d'incubation dans du DMEM supplémenté avec 0,5% de sérum, puis filtrés ; les protéines ont ensuite été quantifiées afin d'utiliser des concentrations égales pour chaque condition.

Western blot

Les extraits protéiques cellulaires ont été soumis à une électrophorèse sur gels SDS-polyacrylamide à gradient 4-12% (Life technologies), puis transférés sur des membranes de nitrocellulose (Millipore, Billerica, MA). Les anticorps dirigés contre Robo1 (Ab7279; Abcam ; dilution 1:300), Robo4 (Ab10547, Abcam ; dilution 1:500), α -tubuline (Sigma ; dilution 1:2000), ont été utilisés pour l'immunoblot, conformément aux instructions du fabricant. Après incubation avec l'anticorps primaire, les membranes ont été incubées avec des anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris couplés au peroxyde de raifort (HRP) (Amersham ; dilution 1: 2000) ; la révélation a ensuite été réalisée avec un kit de détection de chimioluminescence (ECL) (Perkin Elmer).

Tests de migration et d'invasion cellulaire

Les expériences ont été menées dans des plaques 24 puits de culture cellulaire avec des inserts de pores de 8 μ m de diamètre, comme décrit précédemment par Fradet *et al* [301]. Pour les tests d'invasion cellulaire, les inserts ont été préalablement coatés avec 100 μ L de Matrigel (0,3 μ g/ml). Les cellules tumorales parentales ou transfectants ($1,6 \cdot 10^5$ cellules/ml) ont été remises en suspension dans un milieu de culture contenant 0,1% (p/v) d'albumine de sérum bovin et 300 μ L de cette suspension cellulaire ont été chargés dans chaque insert (partie supérieure). Pour les expériences avec les anticorps anti-Robo1 (clone 1F8, Sigma) et anti-Robo4 (ab10547, Abcam), chacun de ces anticorps a été pré-incubé 30 min à 37°C avec les cellules tumorales avant d'être ajouté dans les chambres supérieures des inserts. Le chimio-attractant [10% (v/v) de sérum de veau foetal] a été placé dans la chambre

inférieure (750 µl/puits). Pour les expériences de migration et d'invasion cellulaire, les plaques ont été incubées pendant 6 h et 24 h, respectivement, à 37°C dans un incubateur à CO₂ à 5%. Après incubation, les inserts ont été collectés, les cellules non migrantes ont été retirées ; celles ayant migré à la surface des inserts ont été fixées et colorées au cristal violet. Les cellules ont ensuite été comptées sous microscope (X10).

Animaux

Les souris femelles immunodéprimées, NMRI et Balb/c, âgées de quatre semaines et les souris mâles OF1 ont été achetées chez les laboratoires Charles River (Saint-Germain sur l'Arbresle, France). Toutes les procédures impliquant des animaux, y compris leur logement, les soins, la méthode par laquelle ils ont été sacrifiés, ainsi que les protocoles expérimentaux ont été menées conformément au code de pratique établi par le comité d'éthique local de l'Université de Lyon.

Protocoles animaux

Des expériences de xénogreffes tumorales orthotopiques ont été menées chez des souris immunodéficientes NMRI, comme décrit précédemment [301]. Un pool de deux transfectants indépendants (10^6 cellules dans 20 µl de PBS) a été injecté dans le tissu adipeux de la quatrième glande mammaire, de souris femelles immunodéprimées, âgées de quatre semaines. A la fin des protocoles, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs collectées, pesées, puis préparées pour l'immunohistochimie.

Les expériences de métastases osseuses ont été réalisées chez les femelles immunodéprimées Balb/c, comme décrit précédemment [299] [301]. Les cellules ($5 \cdot 10^5$ cellules dans 100 µl de PBS) ont été injectées dans l'artère de la queue de souris anesthésiées. Les radiographies ont été prises telles que décrites ci-dessus. Les lésions ostéolytiques ont été identifiées par radiographies. La surface des lésions ostéolytiques a été mesurée à l'aide d'un système informatisé d'analyse d'image, et l'étendue de la destruction osseuse par jambe a été exprimée en millimètres carrés.

Des expériences de xénogreffes de tumeurs intra-osseuses ont été menées chez les femelles immunodéprimées Balb/c, comme décrit précédemment [301]. Brièvement, un petit trou a été percé avec une aiguille de calibre 30 stérile à travers le plateau tibial en maintenant le genou en flexion. En utilisant une nouvelle aiguille stérile montée sur une seringue Hamilton stérile de 50µL, une suspension cellulaire (10^5 cellules dans 15 µl de PBS) a été injectée dans la cavité de la moelle osseuse. La progression des lésions ostéolytiques a été suivie par une radiographie des animaux anesthésiés, en utilisant une cabine à rayons X.

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 de souris anti-Ki67 humain (MIB1 clone, DakoCytomation, Glostrup, Danemark) qui reconnaît spécifiquement les cellules proliférantes ou avec un anticorps polyclonal de lapin anti-CD31 de souris (TebuBio, Le Perray-en-Yvelines, France) pour visualiser les vaisseaux sanguins. Les coupes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin HRP. Le marquage a été réalisé par la Plateforme Anipath (Lyon, France). Le nombre de noyaux immunocolorés pour le Ki-67 a été compté sous un microscope (grossissement de 100 x). L'index mitotique a été calculé comme le rapport entre le nombre de noyaux Ki-67 positifs et le nombre total de noyaux par champs et exprimé en pourcentage de noyaux Ki-67 positifs. La densité des micro-vaisseaux tumoraux a également été quantifiée sous un microscope (grossissement 200x) [299] [301].

Les analyses d'histologie osseuse et d'histomorphométrie sur des coupes de tissus osseux, fixées en paraffine, ont été réalisées comme décrit précédemment [299] [301]. Des coupes de 5 mm ont été colorées au trichrome de Golner, puis les mesures histomorphométriques [volume osseux (BV) / volume de tissu (TV) et le volume tumoral (TB) / volume des tissus mous (STV)] ont été effectuées dans une zone standardisée de la métaphyse du tibia, située à 0,5 mm de la plaque de croissance, incluant l'os cortical et trabéculaire. Le rapport BV/TV représente le pourcentage de tissu osseux. Le rapport TB/STV représente le pourcentage de tissu tumoral. La détection *in situ* d'ostéoclastes a été réalisée par marquage de la

phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP), sur des coupes en paraffine longitudinales de la métaphyse du tibia, à l'aide d'un kit commercial (Sigma). La surface de résorption ostéoclastique a été calculée comme le ratio de surface d'os trabéculaire positive pour le TRAP sur la surface totale d'os trabéculaire à l'interface os-tumeur.

Test d'ostéoclastogenèse

Les expériences ont été réalisées comme décrit précédemment [301]. Brièvement, les cellules de la moelle osseuse provenant des membres postérieurs de souris mâles OF1, âgées de six semaines, ont été récoltées, puis cultivées dans du milieu α -MEM contenant 10% (v/v) de sérum de veau foetal supplémenté par du M-CSF (20 ng/ml) et du RANK-L (50 ng/ml), en présence d'un milieu conditionné récolté à partir de cultures de cellules des différentes lignées analysées (20 μ g/ml). Après 7 jours, les ostéoclastes matures ont été dénombrés au microscope sur la base de leur nombre de noyaux (plus de trois noyaux) et de l'activité TRAP. Les résultats ont été exprimés en nombre d'ostéoclastes par puits.

Cytokines array et dosage ELISA

Une membrane commerciale coatée avec des anticorps conçue pour détecter 79 protéines incluant des facteurs de croissance, des cytokines, et chimiokines (RayBio Human Cytokines Array V, RayBiotech) a été utilisée. Les membranes ont été incubées pendant 2h avec le milieu conditionné de cultures de cellules transfectées (150 μ g/ml). Après lavage, les membranes ont été incubées avec un cocktail de 79 anticorps biotinylés, et le reste de la procédure expérimentale a été réalisée en suivant les instructions du fabricant.

Les milieux conditionnés obtenus à partir des cellules MDA-MB-231/B02 Sc/Sh Robo1 ou Robo4 ont été dilués suivant les instructions du fabricant. Les concentrations de TIMP1 et 2, MCP-1 et IL-8 ont été déterminées à l'aide de kits ELISA de RayBiotech (TebuBio). La concentration de PIGF a été déterminée en utilisant un kit ELISA de R&D system (Minneapolis, MN).

Zymographie

Chaque clone cellulaire MDA-MB-231/B02 a été cultivé, sans sérum, sur Matrigel en plaque 6 puits pendant 48h. Les milieux conditionnés ont ensuite été lyophilisés, puis remis en suspension dans 0,5 ml d'eau distillée, et les concentrations de protéines ont été mesurées à l'aide du kit DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Les milieux conditionnés (20 µg/piste) ont été soumis à une électrophorèse sur gel de zymographie 10% gélatine, en condition non dénaturante (Life Technologies) selon les instructions du fabricant. Après électrophorèse, les gels ont été renaturés, puis développés avec les tampons pour zymographie (Life technologies) pendant une nuit à 37°C. Les gels ont ensuite été colorés avec 0,25% (p/v) de bleu de Coomassie brillant et décolorés avec une solution de méthanol-acide acétique-eau (20:7:73, v/v/v). Les bandes blanches indiquent l'activité de la gélatinase. Le milieu conditionné de cellules de fibrosarcome HT-1080, cultivées sans sérum sur Matrigel pendant 48 heures, a été utilisé comme témoin positif afin de visualiser l'activité gélatinolytique des MMP-2 et -9.

Test de micrométastases dans la moelle osseuse Ex-vivo

Les cellules cancéreuses MDA-MB-231/B02, des clones obtenus par transfection avec les différents Sc/ShRobo, ainsi que les cellules de la lignée parentale ont été injectées soit dans l'artère de la queue des animaux, soit directement dans le tibia ; ils ont été sacrifiés 7 et 14 jours, respectivement, après l'inoculation des cellules tumorales. Les membres postérieurs ont été collectés ; les deux extrémités du tibia et du fémur ont été coupées et la moelle osseuse récupérée à l'aide d'une aiguille de calibre 26 remplie de milieu de culture. Les cellules de la moelle osseuse ont ensuite étéensemencées dans des plaques de 6 puits et cultivées en milieu complet. Après 1 jour de culture, les cellules de moelle osseuse ont été placées sous sélection antibiotique pendant 2 semaines, ce qui permet la croissance sélective des cellules tumorales résistantes aux antibiotiques. Des colonies de cellules tumorales ont été fixées, colorées au cristal violet et comptées.

Test de clonogénicité

Les suspensions cellulaires (3000 cellules pour chaque clone) ont été mélangées avec 0,3% d'agar (Agar Select ® ; Life technologies) et déposées sur une plaque 6 puits contenant une couche inférieure d'agarose 0,6% solidifiée. Une fois la couche supérieure solidifiée, 1 ml de milieu complet a été déposé au dessus de la couche cellulaire. Les plaques ont été incubées pendant 3 semaines et les colonies ont été comptées.

Analyse statistique

Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel StatView (version 5.0, SAS Institute Inc, Cary, NC). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ l'écart-type, comme indiqué dans les légendes des figures et tableaux. Pour les études précliniques, les comparaisons par paires ont été réalisées en effectuant un test de Mann-Whitney, U , non paramétrique.

En ce qui concerne les données cliniques, la répartition de l'expression de Robo1 et Robo4, en relation avec les paramètres pronostiques usuels, a été réalisée à l'aide de test de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Les comparaisons entre les courbes de Kaplan-Meier ont été effectuées en utilisant le test du log-rank. Une valeur de p inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

Résultats

Association de l'expression de Robo1/Robo4 avec la rechute clinique du cancer du sein

Lors de précédents travaux du laboratoire, une sous-population de la lignée cellulaire de cancer mammaire humain MDA-MB-231 (dénommée MDA-MB-231/B02) qui métastase fortement et spécifiquement à l'os a été sélectionnée [299]. En utilisant des puces GeneChips Affymetrix A et B U133, nous avons comparé les profils d'expression génique des cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-231/B02 et avons constaté que les cellules MDA-MB-231/B02 expriment une signature génétique spécifique des métastases osseuses [291] [292], qui comprend les gènes de la famille Robo/Slit (Figure 37). Plus précisément, les cellules ostéotropiques MDA-MB-231/B02 présentent une surexpression des récepteurs Robo1 et Robo4, par rapport aux cellules de la lignée cellulaire parentale (Figure 37). Robo2 et Robo3 ne sont pas exprimés par les cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-231/B02 (Figure 37). Les ligands des récepteurs Robo, Slit2, et dans une moindre mesure, Slit1 (mais pas Slit3) sont également exprimés par les cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-231/B02 (Figure 37).

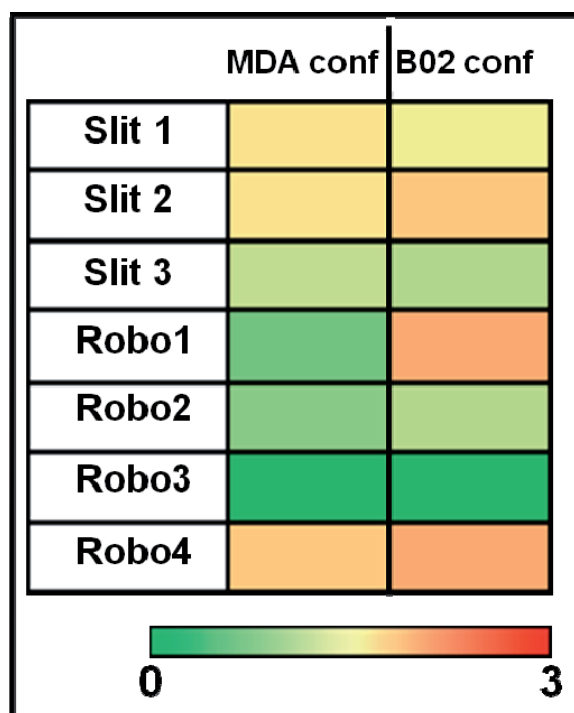


Figure 37. Analyse transcriptomique comparative de l'expression des gènes de la famille Slit/Robo entre la lignée cellulaire parentale MDA-MB-231 et la sous-population ostéotrope MDA-MB-231/B02.

L'analyse comparative de l'expression des gènes de la famille Slit/Robo entre la lignée cellulaire humaine de cancer du sein parentale, les cellules MDA-MB-231, et sa sous-population ostéotrope MDA-MB-231/B02, a été réalisée lorsque ces cellules sont cultivées à confluence (conf). L'expression des gènes est un code couleur allant du vert (faible) à rouge (fort).

Pour étudier l'association de l'expression de Robo1 et Robo4 avec l'issue du cancer du sein, nous avons examiné le niveau d'expression de Robo1 et Robo4 dans une cohorte de 254 patientes qui ne présentaient aucun signe de métastases au moment du diagnostic et pour lesquelles aucun traitement n'était encore commencé [302]. Nous n'avons pas observé de corrélation entre le statut de Robo1 et les caractéristiques cliniques et biologiques chez les patientes du cancer du sein (Tableau 7). A l'inverse, nous avons identifié une corrélation statistiquement significative entre l'expression de Robo4 et le statut ganglionnaire ($p = 0,001$) ; de forts niveaux d'expression de Robo4 dans les tumeurs primaires étant plus fréquemment observés chez les patientes présentant plus de trois ganglions lymphatiques positifs (Tableau 7).

Caractéristiques		Expression de Robo1				Expression de Robo4		
		n	Faible ^(a)	Forte ^(a)	P	Faible ^(a)	Forte ^(a)	P
Statut Ménopausé	Pre	147	77	70	.45	82	65	.08
	Post	107	50	57		47	60	
Taille tumeur	<20 mm	103	60	43	.05	52	51	.99
	>20 mm	143	64	79		73	70	
Grade histologique	1	27	15	12	.74	15	12	.12
	2	110	52	58		52	58	
	3	58	28	30		37	21	
Statut ganglionnaire	négatif	117	66	51	.13	74	43	.001
	1-3	83	35	48		39	44	
	> 3	54	26	28		16	38	
Statut ER	négatif	42	15	27	.06	22	20	.95
	positif	212	112	110		107	105	
Statut PR	négatif	55	26	29	.76	30	25	.63
	positif	199	101	98		99	100	

^(a) Faible : < 50% quartile; Forte : > 50% quartile.

Les valeurs de *P* permettent la comparaison des groupes de faible et forte expression en utilisant le test Chi-2

Tableau 7. Cohorte des Hospices Civils de Lyon (n=254).

Association de l'expression de Robo1 ou Robo4 avec des caractéristiques cliniques et biologiques chez les patientes atteintes d'un cancer du sein.

Pour définir les valeurs pronostiques de l'expression de Robo1 et Robo4 dans le cancer du sein, les courbes de survie ont été estimées en utilisant la méthode de Kaplan-Meier (Figure 38). Les taux de survie sans récurrence ne diffèrent pas significativement entre les groupes exprimant des niveaux élevés ou faibles de Robo1 (Figure 38A). A l'inverse, le nombre de rechutes, à un suivi médian de 54 mois, dans le groupe avec un fort taux d'expression de Robo4 est deux fois plus élevé que dans le groupe à faible niveau de Robo4 (32 rechutes contre 15, respectivement, $p = 0,009$ par le test de log-rang) (Figure 38B). De plus, l'analyse de sous-groupes de la cohorte selon le statut de Robo1 et Robo4 a montré que les rechutes sont plus fréquentes chez les patientes présentant des tumeurs primaires avec de forts taux de Robo4, et ceci indépendamment des niveaux d'expression de Robo1 ($P = 0,058$) (Figure 39). Le fait que l'index d'envahissement ganglionnaire ait déjà été corrélé à un risque élevé de métastases dans la cohorte [302], associé à l'observation d'une corrélation significative entre l'expression de Robo4 et le statut ganglionnaire (Tableau 7), nous a amenés à vérifier si le statut des ganglions pouvait être un facteur confondant. Chez les patientes avec des ganglions non envahis (pN0), l'expression de Robo4 n'est pas liée au risque de métastases (données non montrées). A l'inverse, lorsque l'analyse est limitée aux patientes présentant des ganglions lymphatiques positifs (pN⁺), les niveaux élevés de Robo4 corrélaient avec les rechutes métastatiques en général (Figure 38C ; $p = 0,07$ par test de log-rank) ainsi que les rechutes métastatiques à l'os (Figure 38D, $P = 0,018$ par test de log-rank). Par conséquent, une forte expression de Robo4 corréle avec un pronostic défavorable.

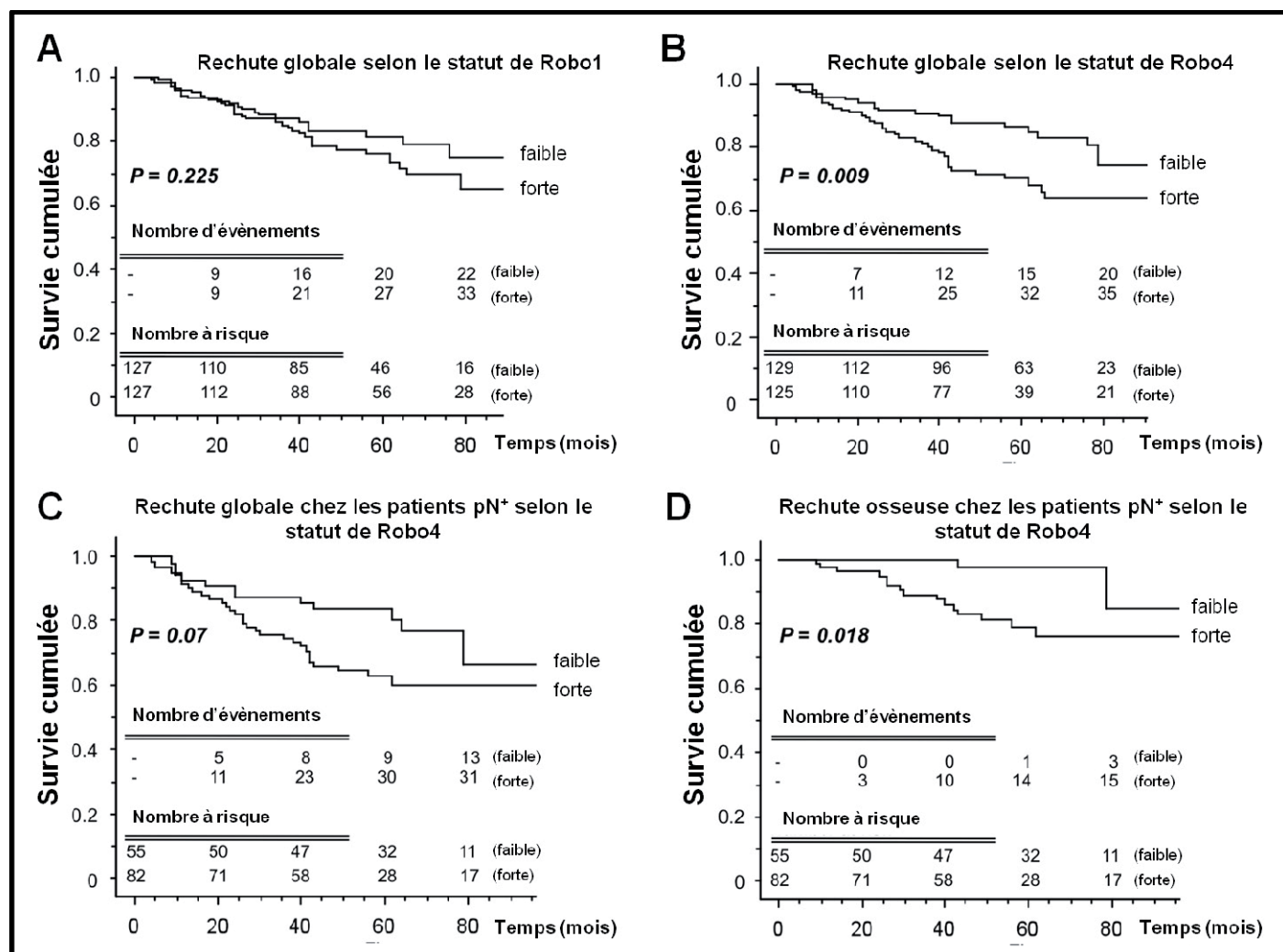


Figure 38. Association de l'expression Robo1 ou Robo4 avec la rechute clinique du cancer du sein.

(A, B) Estimations des taux de survie sans rechute, par tests de Kaplan-Meier, chez 254 patientes atteintes de cancer du sein, selon le statut Robo1 (A) ou Robo4 (B).

(C, D) Taux de survie sans récurrence globale (C) ou osseuse (D) chez 137 patientes atteintes de cancer du sein avec invasion des ganglions lymphatiques (pN⁺), selon le statut de Robo4.

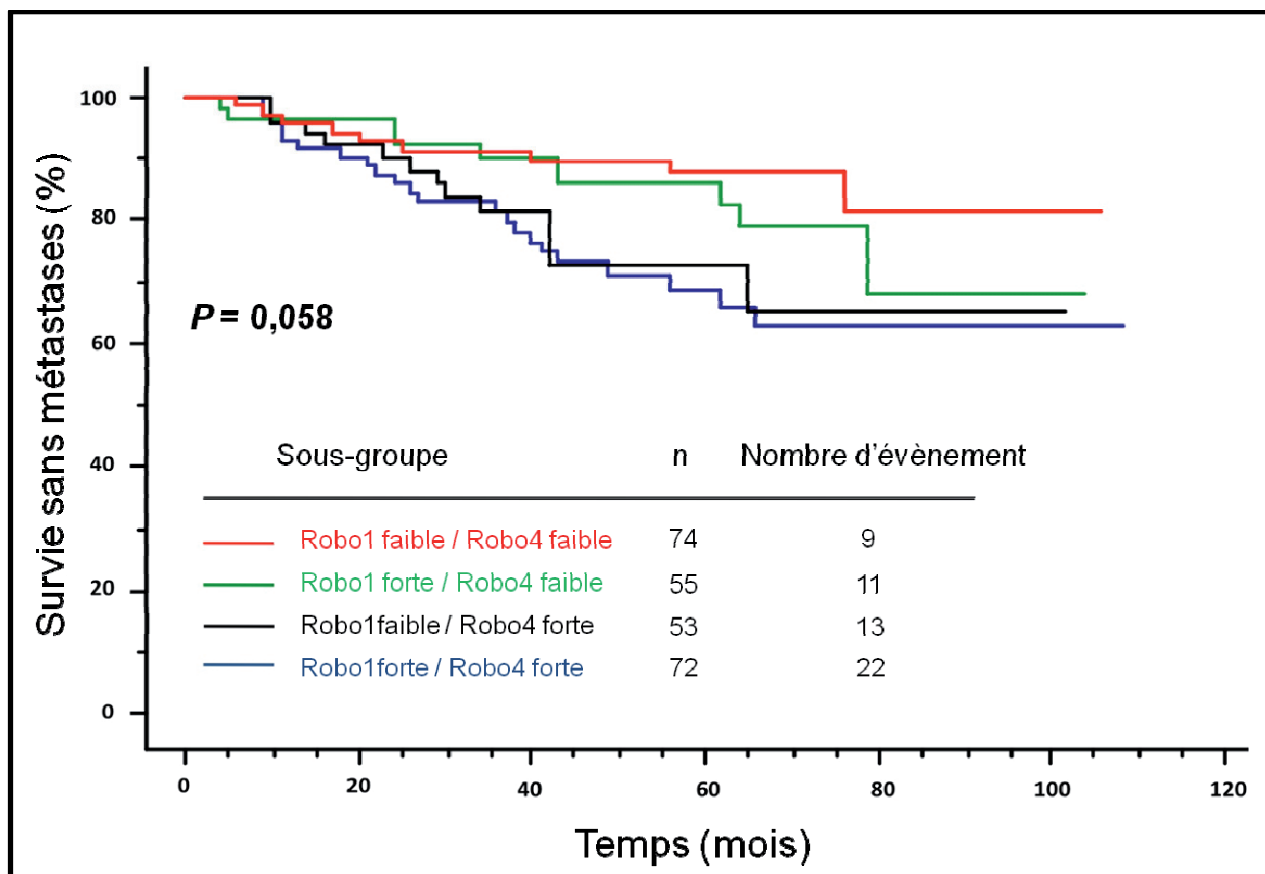


Figure 39. Estimations des taux de survie sans rechute, par tests de Kaplan-Meier, chez 254 patientes atteintes de cancer du sein, selon le statut Robo1 et Robo4.

$P = 0,058$ par test log-rank. Le nombre total de métastases (nombre d'événements) dans chaque sous-groupe est indiqué dans le tableau intégré.

L'inhibition de Robo4 réduit la croissance tumorale primaire, alors que celle de Robo1 l'augmente

Pour déterminer l'existence d'un lien entre l'expression de Robo4 ou Robo1 et la croissance tumorale dans la glande mammaire de la souris, les taux endogènes de Robo4 ou Robo1 dans les cellules cancéreuses humaines du sein, MDA-MB-231/B02, ont été diminués de façon stable, en utilisant la stratégie de l'interférence ARN.

Par transfection de deux séquences Sh ciblant deux régions distinctes de l'ARNm de Robo4, nous avons obtenu une centaine de clones, dont nous avons évalué le niveau d'expression de Robo1 et Robo4 par western blot. Nous avons alors

sélectionné deux clones indépendants (Sh2.6 et Sh4.5) pour lesquels l'expression de Robo4 est réduite de plus de 80%, par rapport à celle observée dans les clones contrôles ScRobo4 (Sc1.2 et Sc2.2) et dans les cellules parentales MDA-MB-231/B02 (Figure 40). Le taux de Robo1 demeure inchangé dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231/B02 ShRobo4 et ScRobo4 sélectionnées (Figure 40).

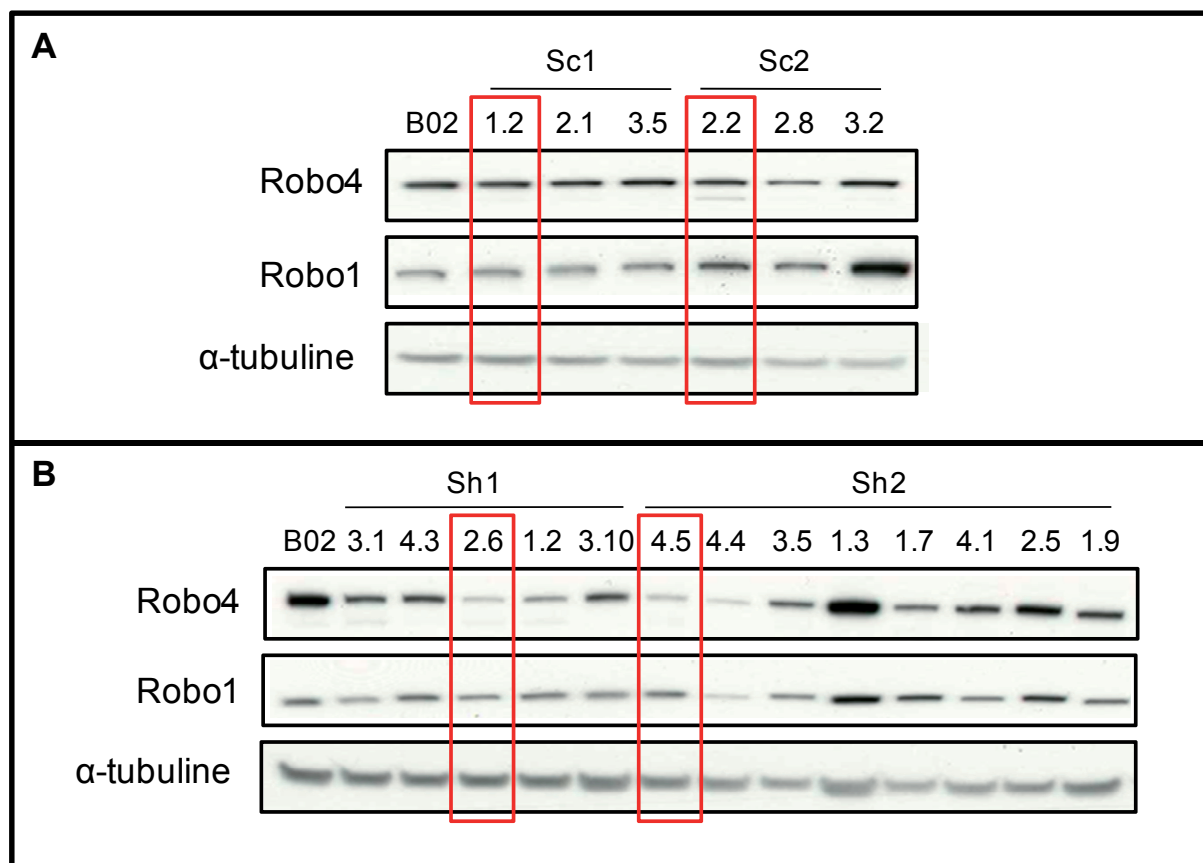


Figure 40. Sélection des cellules MDA-MB-231/B02 inhibées pour l'expression de Robo4.

Inhibition de l'expression de Robo4 dans les cellules cancéreuses humaines mammaires MDA-MB-231/B02 par la stratégie d'ARN interférence. Les cellules contrôles (Sc1.2 et 2.2) (A) et les cellules inhibées pour l'expression de Robo4 (clones Sh2.6 et Sh4.5) (B) ont été sélectionnées par western blot avec des anticorps dirigés contre Robo4, Robo1 et α-tubuline (contrôle de charge).

La stratégie de l'interférence ARN avait également été utilisée dans de précédents travaux afin de réduire le taux protéique de Robo1. Deux clones ShRobo1 (Sh1.32 et Sh1.33) ainsi que deux clones contrôles ScRobo1 (Sc2.1 et Sc2.4) avaient été

sélectionnés. Le taux de Robo4 demeure inchangé dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231/B02 ShRobo1 et ScRobo1 (Thèse de Vincent Gonin).

Un pool de cellules MDA-MB-231/B02 déplétées pour Robo4 (clones Sh2.6 et Sh4.5) ainsi qu'un pool de clones contrôles (Sc1.2 et Sc2.2) ont ensuite été implantés orthotopiquement dans la glande mammaire de souris immunodéficientes. L'analyse des tumeurs ShRobo4 montre alors que la taille tumorale primaire moyenne est diminuée de 3 fois rapport à celle des tumeurs ScRobo4 (Figure 41C). L'analyse immunohistochimique de ces xénogreffes tumorales, avec un anticorps anti-CD31 qui reconnaît spécifiquement les cellules endothéliales murines, a montré que l'inhibition de Robo4 conduit à une diminution de la densité des micro-vaisseaux dans les tumeurs ShRobo4 par rapport à celle ScRobo4 (Figure 42). Les niveaux de VEGF produits par les cellules ShRobo4 et ScRobo4 sont toutefois similaires (Figure 45B). L'index de prolifération, mesuré par marquage du Ki67 qui reconnaît les cellules tumorales humaines en prolifération, est identique entre les tumeurs contrôles et déplétées en Robo4 (Figure 43).

A l'opposé, l'implantation orthotopique, dans la glande mammaire de la souris, de cellules MDA-MB-231/B02 déplétées en Robo1 conduit à une augmentation de la taille moyenne des tumeurs primaires ShRobo1 rapport à celle des tumeurs ScRobo1 (facteur d'augmentation de 2,5) (Figure 41C).

L'analyse immunohistochimique de ces tumeurs, réalisée dans un précédent travail, montre que l'augmentation de la taille des tumeurs ShRobo1 est associée à une augmentation de l'angiogenèse tumorale (Thèse de Vincent Gonin). Il a été également montré précédemment que les niveaux de VEGF produits par les cellules cancéreuses ShRobo1 sont statistiquement significativement augmentés par rapport à ceux des cellules contrôles ScRobo1 et parentales (Thèse de Vincent Gonin).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que Robo4 et Robo1 exprimés dans les cellules tumorales jouent des fonctions antagonistes : Robo4 et Robo1 apparaissent respectivement, comme des régulateurs négatifs et positifs de la croissance tumorale primaire.

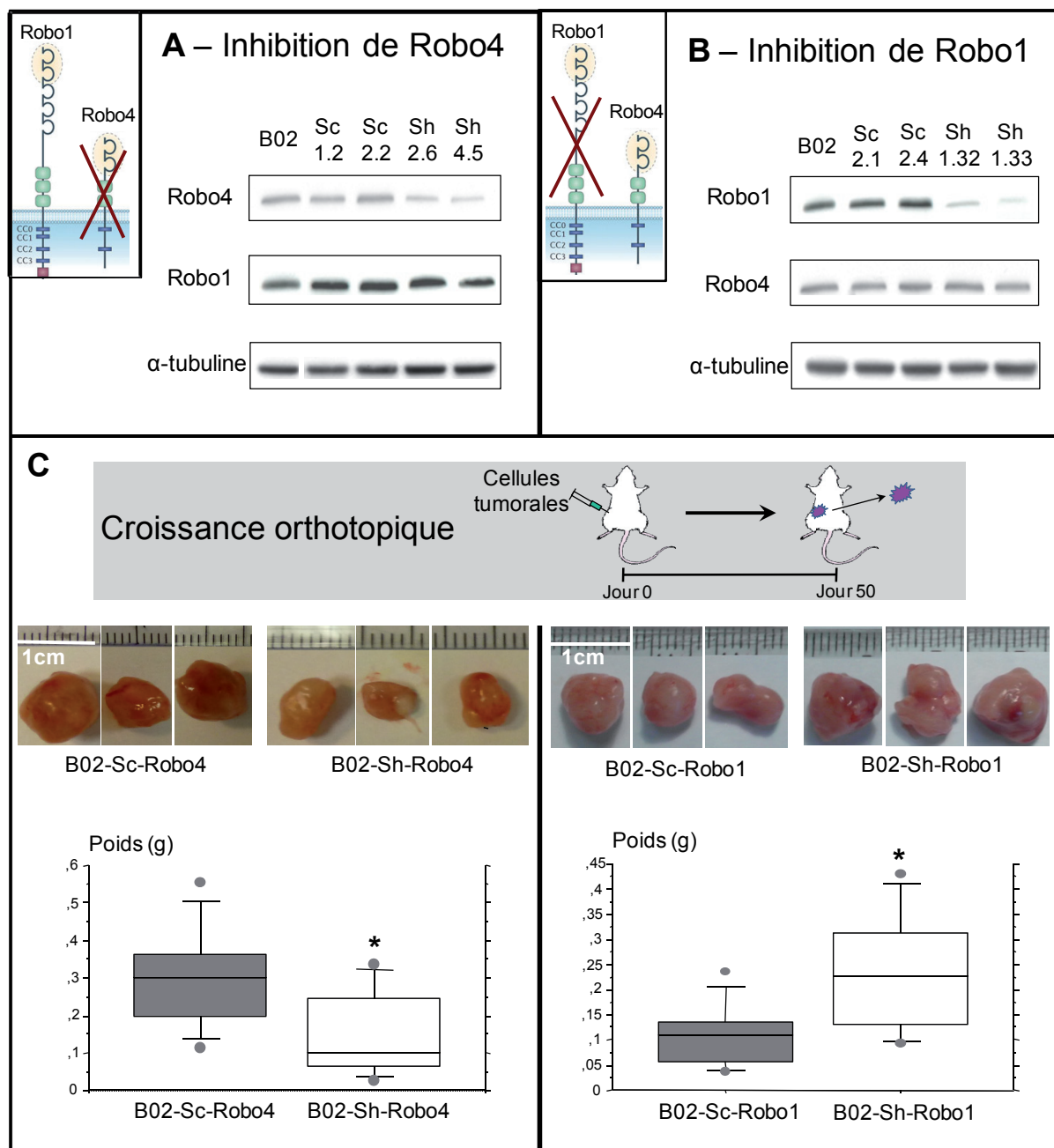


Figure 41. Analyse de l'inhibition de l'expression des récepteurs Robo1 ou Robo4 sur la croissance orthotopique de tumeurs mammaires chez les animaux.

(A, B) Inhibition de l'expression de Robo4 (A) ou Robo1 (B) dans les cellules cancéreuses humaines du sein MDA-MB-231/B02 par la stratégie d'ARN interférence.

(C) L'inactivation de Robo4 inhibe la croissance tumorale *in vivo* (panneau gauche) tandis que celle de Robo1 la favorise (panneau droite). Les cellules MDA-MB-231/B02 Sc/ShRobo4 ou Robo1 ont été inoculées dans la glande mammaire de souris. Les animaux ont été sacrifiés 50 jours après l'injection et les tumeurs pesées. Des images représentatives de tumeurs sont montrées pour chaque groupe.

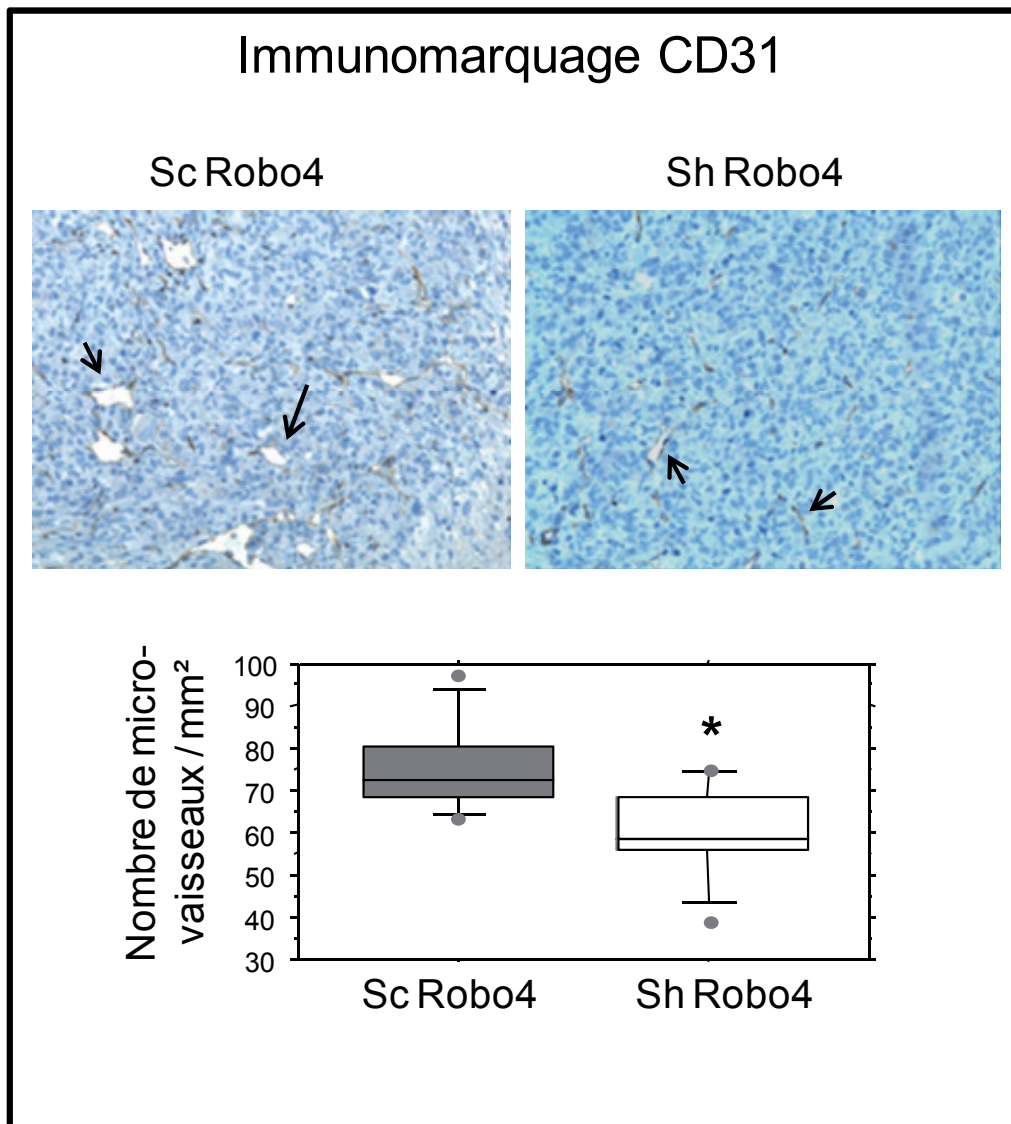


Figure 42. Association entre l'angiogenèse tumorale et l'inhibition de l'expression de Robo4 dans les cellules tumorales de xénogreffes orthotopiques.

Analyse immunohistochimique de xénogreffes tumorales ScRobo4 et ShRobo4, 50 jours après l'inoculation des cellules tumorales, en utilisant un anticorps anti-CD31 murin qui reconnaît spécifiquement les cellules endothéliales. Le nombre de vaisseaux sanguins CD31-positifs au sein des tumeurs a été quantifié. Les flèches indiquent les vaisseaux sanguins. * P < 0,05.

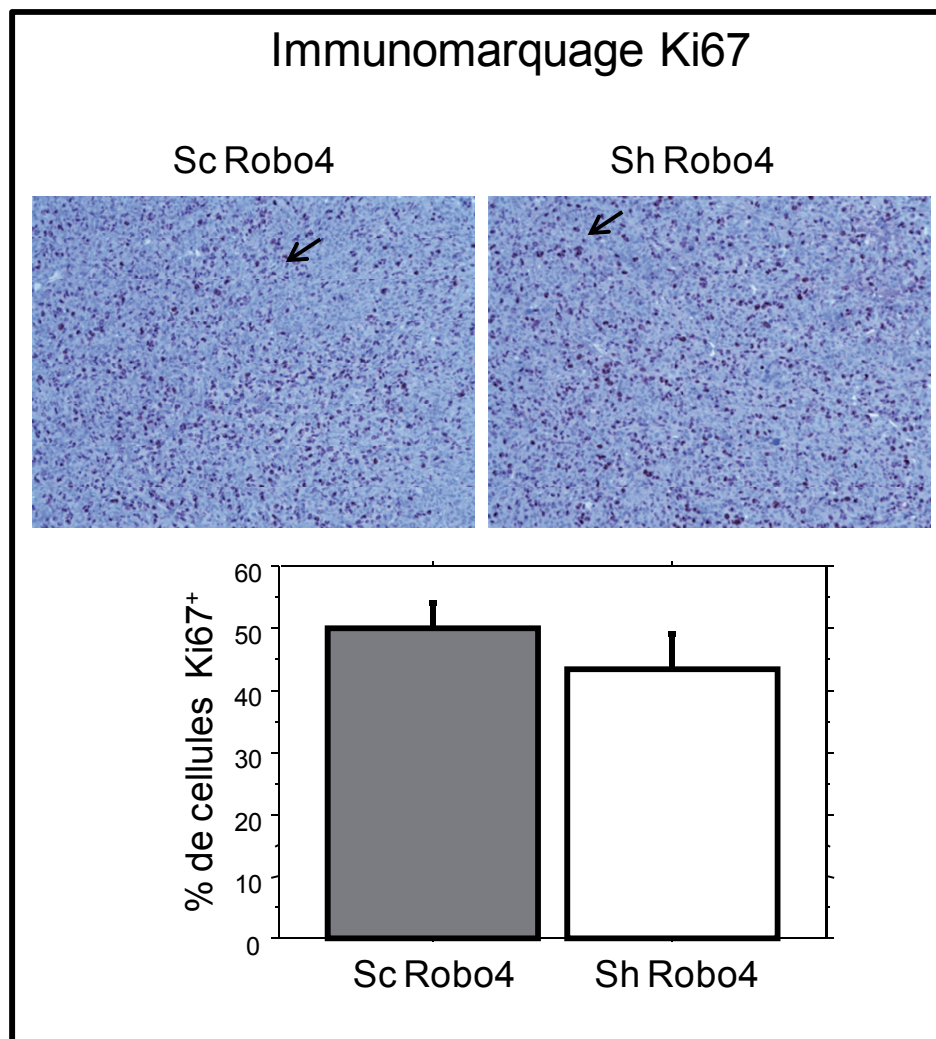


Figure 43. Association entre la prolifération tumorale et l'inhibition de l'expression de Robo4 dans les cellules tumorales de xénogreffes orthotopiques.

Analyse immunohistochimique de xénogreffes tumorales ScRobo4 et ShRobo4, 50 jours après l'inoculation des cellules tumorales, en utilisant un anticorps anti-Ki67 humain qui reconnaît spécifiquement les cellules en prolifération. Le nombre de noyaux immunocolorés pour le Ki-67 a été compté sous un microscope (grossissement de 100 x). L'index mitotique a été calculé comme le rapport entre le nombre de noyaux Ki-67 positifs et le nombre total de noyaux par champs et exprimé en pourcentage de noyaux Ki-67 positifs. Les flèches indiquent les cellules en prolifération.

Robo4 et Robo1 régulent différemment la croissance des cellules de cancer du sein et la formation de lésions ostéolytiques

Pour caractériser le rôle de Robo4 et Robo1 dans la formation des métastases osseuses, un pool de cellules MDA-MB-231/B02 déplétées en Robo4 (clones Sh2.6 et Sh4.5) ou en Robo1 (clones Sh1.32 et Sh1.33) ainsi que des cellules contrôles respectives pour Robo4 (clones Sc1.2 et Sc2.2) et Robo1 (clones Sc2.1 et Sc2.4) ont été injectés dans l'artère de la queue de souris immunodéficientes. En utilisant ce modèle animal, l'analyse radiographique, 28 jours après l'injection des cellules tumorales, révèle que l'étendue des lésions ostéolytiques dans les membres postérieurs des animaux porteurs de tumeurs ShRobo4 est faiblement mais significativement augmentée par rapport aux souris portant les tumeurs contrôles ScRobo4 (Figure 44A). Cependant, l'analyse histomorphométrique des membres postérieurs présentant des métastases montre que les rapports BV/TV, indiquant la destruction osseuse, et TB/STV, mesurant la charge tumorale osseuse, ne diffèrent pas de façon statistiquement significative entre les deux groupes d'animaux (Figure 44B). De manière intéressante, le marquage TRAP (phosphatase acide tartrate-résistante) sur les coupes de tissus osseux de pattes métastatiques de souris porteuses de tumeurs ShRobo4, montre que les surfaces de résorption ostéoclastique active à l'interface tumeur/os sont considérablement augmentées par rapport à celles présentes dans les tumeurs ScRobo4 (Figure 44C).

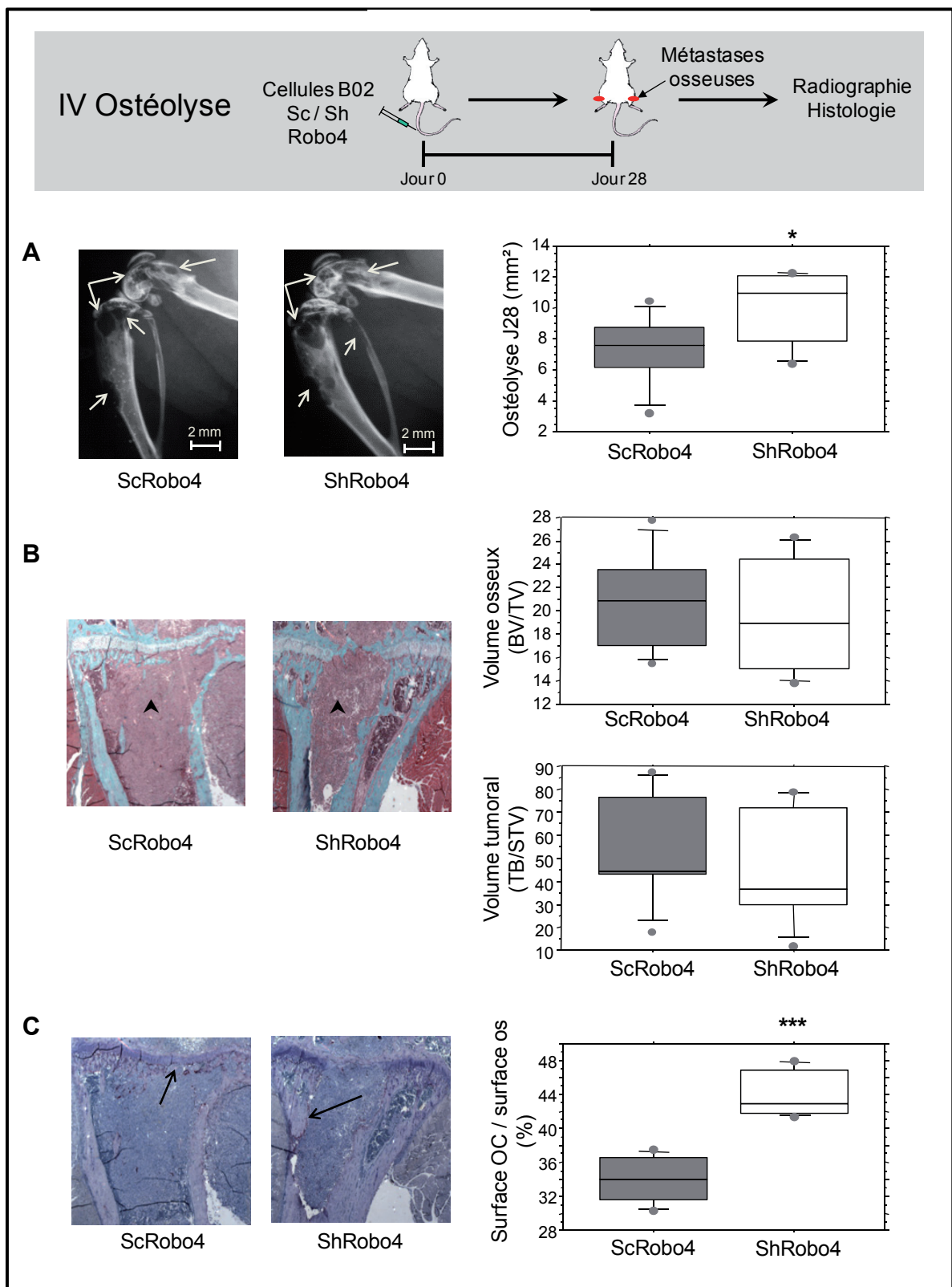


Figure 44. Effet de l'inhibition de l'expression de Robo4 dans les cellules du cancer du sein sur la formation de métastases osseuses.

Les cellules MDA-MB-231/B02 Sc ou ShRobo4 (5.10^5 cellules) ont été inoculées dans l'artère de la queue des animaux. 28 jours après l'inoculation des cellules tumorales, les lésions osseuses, indiquées par des flèches, ont été analysées par radiographie (A), la charge tumorale (flèche) et le volume osseux par histologie (B).

(C) La détection *in situ* des ostéoclastes par coloration TRAP (acide phosphatase résistante au tartrate) colore les ostéoclastes actifs en rouge (flèche). Le rapport de surface des ostéoclastes (OC) sur la surface de l'os est exprimé en pourcentage.

*, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$, comparé au groupe ScRobo4.

Par ailleurs, la même analyse déjà réalisée pour les clones déplétés en Robo1, a montré une augmentation de 40% des lésions ostéolytiques chez les animaux injectés avec les cellules ShRobo1, comparées aux lésions des animaux porteurs des tumeurs ScRobo1. Cette différence s'accompagne d'une forte réduction du rapport BV/TV, indiquant une destruction osseuse plus élevée, ainsi que d'une augmentation de 3 fois du rapport TB/STV par rapport à des souris porteuses de tumeurs ScRobo1, comme déterminée par un examen histomorphométrique. En revanche, les surfaces de résorption ostéoclastique actives, mises en évidence par un marquage TRAP, dans les pattes métastatiques de souris porteuses de tumeurs ShRobo1 ou ScRobo1 sont similaires (Thèse de Vincent Gonin).

Ces observations soulignent donc le rôle spécifique de Robo4, exprimé par les cellules cancéreuses, dans la régulation de la destruction osseuse médiée par les ostéoclastes, tandis que l'expression de Robo1 est associée à la croissance métastatique dans le squelette.

Afin d'évaluer l'effet de la déplétion de Robo4 ou de Robo1 dans les cellules tumorales sur la formation des ostéoclastes, nous avons traité des cultures cellulaires primaires de moelle osseuse de souris par du RANKL et du M-CSF, deux facteurs hématopoïétiques à la fois nécessaires et suffisants pour induire l'ostéoclastogénèse. L'ajout de « milieux conditionnés » (surnageants issus de la culture des différentes lignées cellulaires transfectées), dans les cultures de moelle osseuse, a permis d'évaluer l'effet des molécules sécrétées par les cellules tumorales sur la formation des ostéoclastes. Conformément aux données *in vivo* (Figure 44), le milieu conditionné de cellules MDA-MB-231/B02 ShRobo4 induit une augmentation de 2 fois de la formation d'ostéoclastes par rapport à celui des cellules ScRobo4 (Figure 45A). Nous avons ensuite utilisé une membrane « coatée » avec des anticorps dirigés contre plusieurs cytokines humaines afin d'analyser la nature et la concentration des cytokines présentes dans le milieu conditionné des cellules transfectées. Plusieurs cytokines et interleukines connues pour stimuler l'activité des ostéoclastes (MCP-1, le GM-CSF, le PIGF, VEGF, IL-6, IL-8) sont produites par les cellules transfectées Sc et ShRobo4 (Figures 45B). De plus, une augmentation de la production de PIGF, MCP-1 et IL-8 par les cellules ShRobo4 en comparaison avec les cellules ScRobo4 est observée ; ces observations sont confirmées par dosage ELISA (Figures 45C). Ces cytokines sont également détectées *in vivo* (Figure 46).

De plus, les concentrations de PIGF et d'IL-8 (mais pas de MCP-1) sont plus élevées dans le sérum des animaux porteurs de tumeurs ShRobo4 que dans celui du groupe témoin (Figure 46).

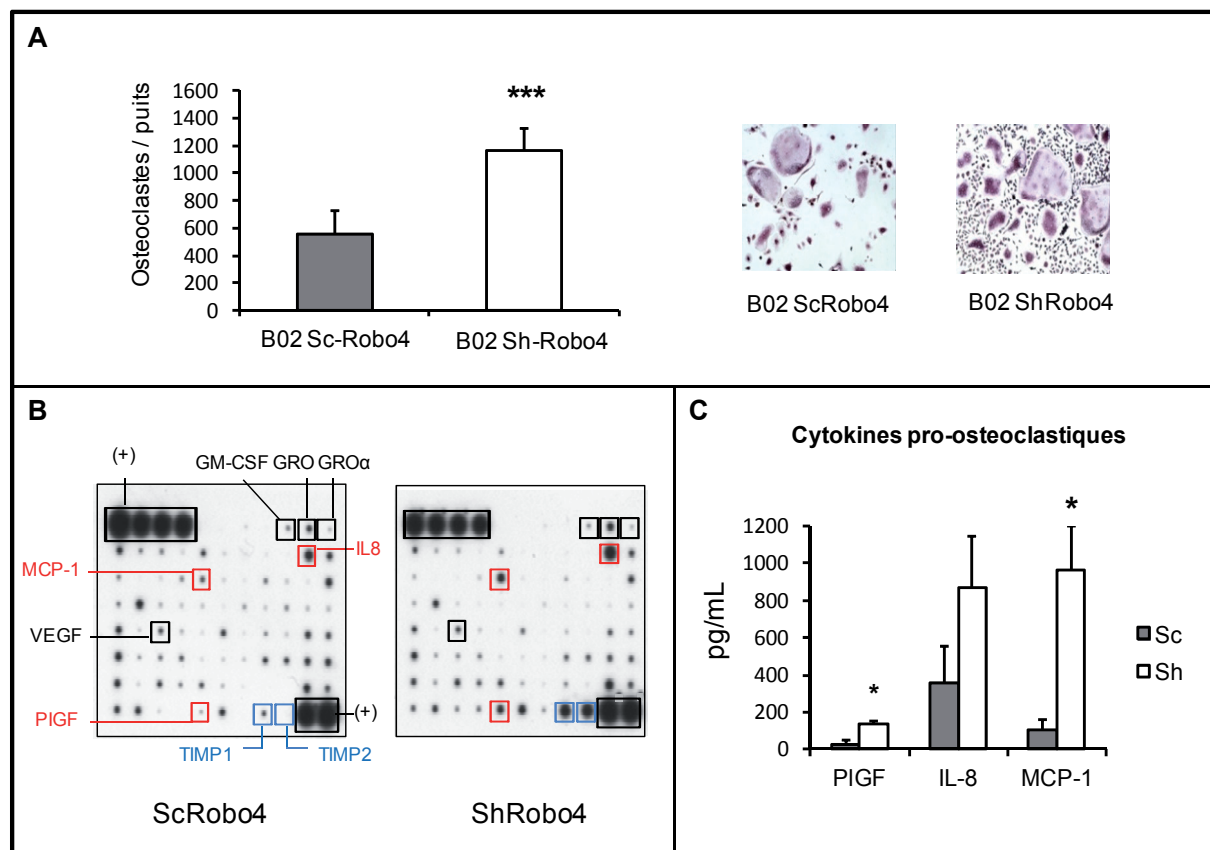


Figure 45. Effet de l'inhibition de l'expression de Robo4 dans les cellules MDA-MB-231/B02 sur l'ostéoclastogénèse.

(A) Formation d'ostéoclastes *in vitro* à partir de cellules de moelle osseuse murines traitées avec du M-CSF et du RANKL ainsi que le milieu conditionné provenant de cellules cancéreuses MDA-MB-231/B02 déplétées pour Robo4. Les ostéoclastes matures ont été quantifiés comme des cellules multinucléées et TRAP positives. Des images représentatives des ostéoclastes matures sont montrées pour chaque groupe.

(B) Détection de cytokines produites dans le milieu conditionné de cellules de cancer du sein, dont l'expression de Robo4 est inhibée, en utilisant une membrane « coatée » d'anticorps anti-cytokines.

(C) Dosage de la sécrétion de PIGF, IL-8 et MCP-1, des cellules du cancer du sein inhibées pour Robo4, par ELISA.

*, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$, comparé au groupe ScRobo4.

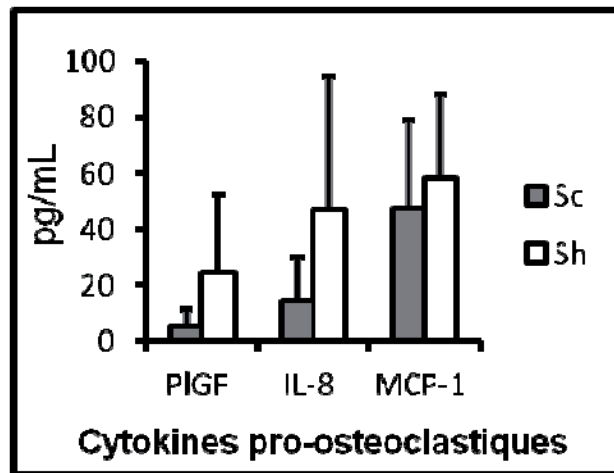


Figure 46. Dosage ELISA de cytokines pro-ostéoclastiques *in vivo*.

Dosage ELISA des cytokines PIGF, IL-8 et MCP-1 dans le sérum des animaux métastatiques, après l'inoculation intra-artérielle des cellules transfectées Sh ou ScRobo4.

Par ailleurs, l'effet de l'inhibition de Robo1 sur la formation d'ostéoclastes a également été évalué dans une précédente étude. Conformément aux données obtenues *in vivo*, concernant l'ostéolyse dans les pattes des souris après injection par voie sanguine des clones, les milieux conditionnés des cellules MDA-MB-231/B02 ShRobo1 et ScRobo1 stimulent similairement la formation d'ostéoclastes multinucléés TRAP positifs (Thèse de Vincent Gonin). Une membrane « coatée » avec des anticorps dirigés contre différentes cytokines et interleukines avait été utilisée pour évaluer la production de ces molécules par les clones cellulaires Sc et ShRobo1. Comme les clones Sc et ShRobo4, ces cellules transfectées Sc/ShRobo1 produisent plusieurs cytokines et interleukines connues pour stimuler l'activité des ostéoclastes (MCP-1, le GM-CSF, le PIGF, VEGF, IL-6, IL-8). Cependant, les profils de cytokines sont similaires pour les cellules Sc et Sh Robo1 (Thèse de Vincent Gonin). Nous avons confirmé ces résultats par des dosages ELISA (Figure 47).

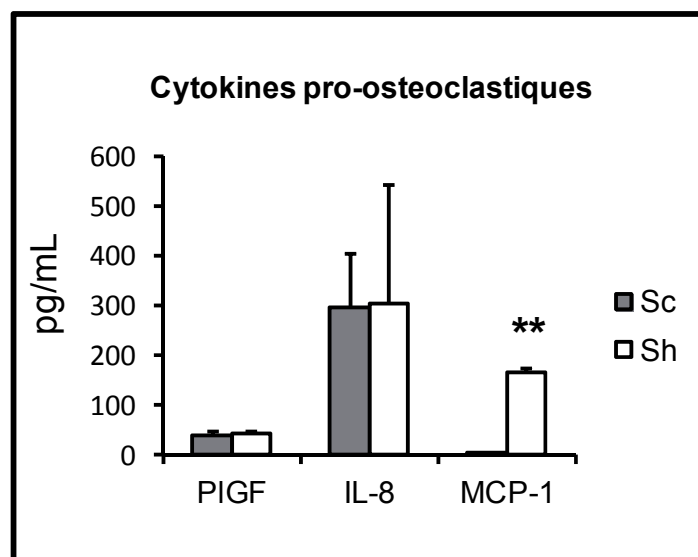


Figure 47. Dosage ELISA de cytokines pro-ostéoclastiques *in vitro*.

Dosage, par ELISA, de la sécrétion de PIGF, IL-8 et MCP-1, des cellules du cancer du sein dont l'expression de Robo1 est inhibée.

**, $P < 0.01$, comparé au groupe ScRobo1.

Par conséquent, l'augmentation des surfaces de résorption ostéoclastique active dans les pattes métastatiques, provenant d'animaux porteurs de tumeurs ShRobo4, est probablement le résultat d'une augmentation de la production de cytokines pro-ostéoclastiques par les cellules tumorales *in vivo*. A l'inverse, les lésions ostéolytiques plus importantes dans les animaux porteurs de tumeurs déficientes pour Robo1 ne résultent pas d'une modification de la production des cytokines pro-ostéoclastiques mais sont la conséquence indirecte du plus grand nombre de cellules tumorales ShRobo1 résidant dans la moelle osseuse qui, à leur tour, stimulent la destruction osseuse médiée par les ostéoclastes.

Effets de l'inhibition de Robo4 et Robo1 ou de leur ciblage par des anticorps sur la migration et l'invasion de cellules du cancer du sein

Les différences observées au niveau de l'étendue de l'ostéolyse induite par les cellules déplétées en Robo1, nous ont conduites à émettre l'hypothèse que la déplétion de Robo1 pourrait entraîner une colonisation plus rapide de l'os par les cellules tumorales ShRobo1. En effet, dans la littérature, de nombreuses

observations de régulation de la migration des cellules cancéreuses par la voie Slit/Robo1 ont été décrites [294]. Nous avons donc étudié le rôle de Robo1 et/ou Robo4 sur la migration/invasion des cellules cancéreuses MDA-MB-231/B02, en utilisant un test en chambre de Boyden modifiée.

Dans une précédente étude, l'analyse de l'effet de l'inhibition de Robo1, sur la réponse chimiotactique des cellules au sérum, a révélé une hausse (de 1,5 à 2 fois) de la migration des cellules ShRobo1 (pool de clones Sh1.32 et Sh 1,33) par rapport à celle des cellules contrôles ScRobo1 (pool de clones Sc2.1 et Sc2.4). De même, un gain significatif de l'invasion des cellules ShRobo1 a été observé par rapport aux cellules ScRobo1 (Thèse de Vincent Gonin).

En revanche, l'inhibition de Robo4 conduit à une diminution statistiquement significative de la migration des cellules ShRobo4 (pool de clones Sh2.6 et Sh4.5) comparée à celle des cellules contrôles (pool de clones Sc1.2 et Sc2.2) (Figure 48A). De plus, l'invasion des cellules ShRobo4 diminue d'un facteur 4 comparée à celle de cellules ScRobo4 (Figure 48B).

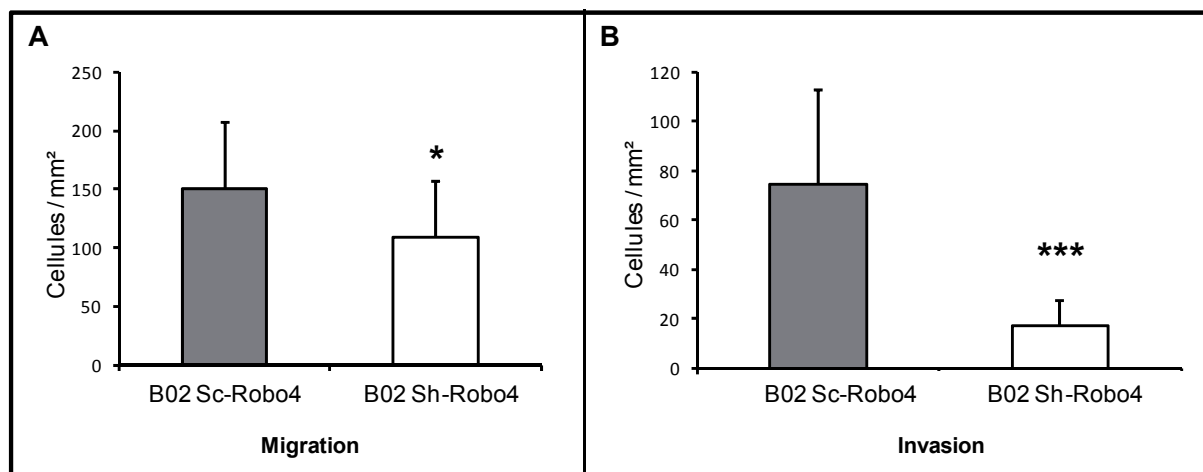


Figure 48. Effets de l'inhibition de l'expression de Robo4 sur la migration et l'invasion de cellules du cancer du sein.

(A) Test de migration cellulaire. Les cellules MDA-MB-231/B02, dont l'expression de Robo4 est inhibée, ont été ensemencées dans des inserts à membrane poreuse (chambre haute). Le facteur chimiotactique (sérum) a été placé dans les puits d'une plaque p24 (chambre basse). Après 6h d'incubation à 37°C, les cellules non migrantes sont éliminées par lavage et les cellules qui ont migré à la surface des inserts sont fixées et colorées au cristal violet et comptées sous microscope.

(B) Test d'invasion cellulaire. Pour l'invasion des cellules, les inserts ont été préalablement coâtés avec du matrigel. Après 24h d'incubation à 37°C, les cellules non migrantes sont éliminées par lavage et les cellules restantes, fixées et colorées au cristal violet, sont comptées au microscope.

*, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$, comparé au groupe ScRobo4.

Nous avons ensuite évalué les conséquences du ciblage de Robo1 ou Robo4 avec des anticorps sur l'invasion des cellules cancéreuses parentales MDA-MB-231/B02 (Figure 49). Comparé au traitement par des anticorps isotypiques contrôles, le traitement des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231/B02 avec un anticorps monoclonal anti-Robo1 favorise l'invasion, tandis que l'invasion des cellules MDA-MB-231/B02 est inhibée de façon dose-dépendante en présence de concentrations croissantes d'un anticorps anti-Robo4 (Figure 49).

L'ensemble de ces résultats, nous permet de conclure que Robo1 et Robo4, dans les cellules tumorales, ont des propriétés anti-invasives et pro-invasives, respectivement.

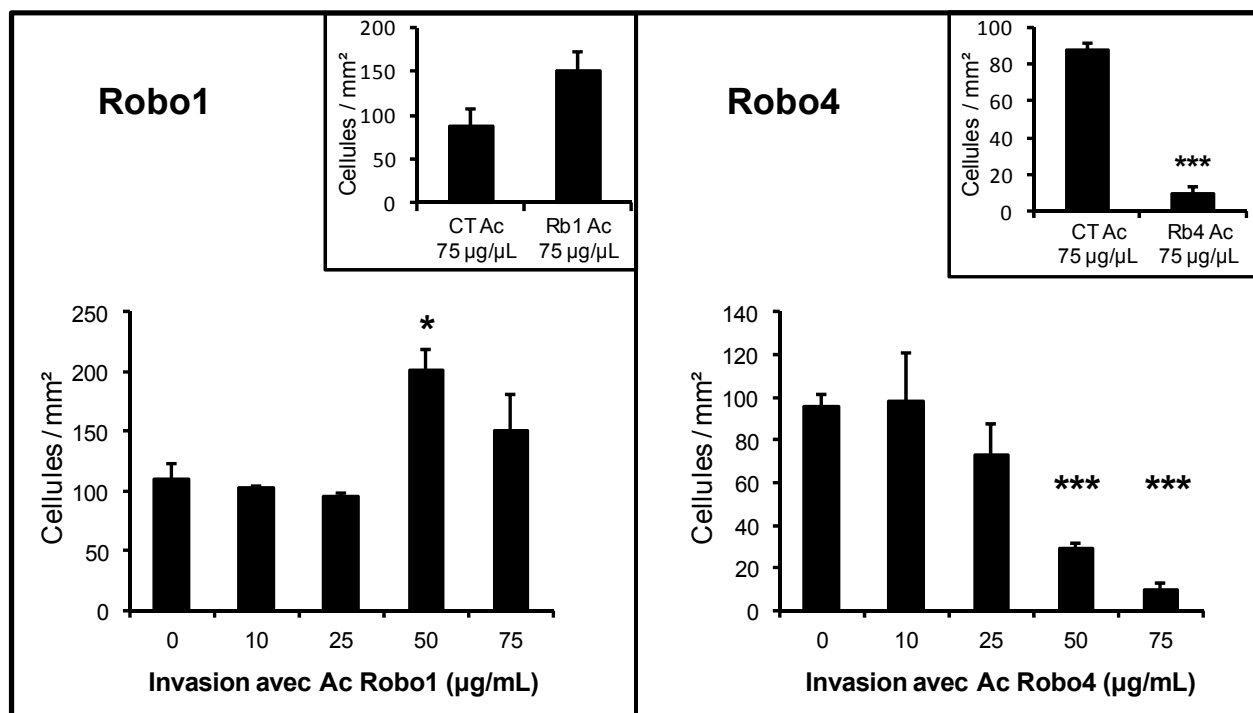


Figure 49. Effets du ciblage par des anticorps anti-Robo1 ou anti-Robo4 sur l'invasion de cellules du cancer du sein.

Effets de concentrations croissantes d'anticorps anti-Robo1 (à gauche) ou anti-Robo4 (à droite) sur l'invasion des cellules cancéreuses ostéotropiques MDA-MB-231/B02. *Encarts* : effets des plus fortes concentrations d'anticorps anti-Robo1 et anti-Robo4 comparé aux anticorps isotypiques contrôles. *, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$.

De nombreuses études montrent que les protéinases extracellulaires, telles que les MMPs, induisent des changements du micro-environnement durant la progression tumorale. Les MMPs dégradent la matrice extracellulaire, permettant ainsi l'invasion des cellules tumorales et par conséquent la formation de métastases [303].

La diminution de la capacité d'invasion des clones ShRobo4 pourrait être corrélée à une baisse d'activité des MMPs, notamment les MMP2 et 9. En effet, l'analyse, par cytokine array, des milieux conditionnés des cellules ShRobo4 montre une augmentation de la production des protéines TIMP1 et 2, inhibiteurs des MMPs (Figure 45B). Un dosage ELISA confirme cette augmentation (données non montrées). Ces observations nous permettent d'émettre l'hypothèse que l'activité des MMPs sécrétées par les cellules ShRobo4 peut être altérée. L'analyse de l'activité des MMP2 et 9, par zymographie, ne montre aucune différence d'activité entre les MMPs produites par les cellules ShRobo4 et ScRobo4 (Figure 50). L'altération de

l'invasion des cellules déplétées en Robo4 ne résulte donc pas d'une diminution de l'activité des MMPs.

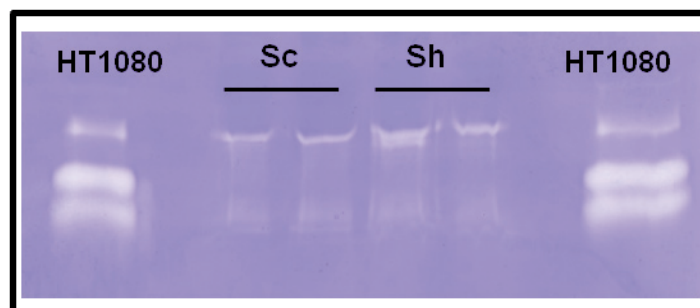


Figure 50. Analyse de l'activité des MMP2 et 9 produites par les cellules Sc/ShRobo4.

Les cellules MDA-MB-231/B02 Sc/ShRobo4 ont été cultivées, en l'absence de sérum, pendant 48h sur matrigel, puis leurs milieux conditionnés ont été récoltés et lyophilisés. 20µg de protéines sont déposées par puits. Les bandes blanches indiquent la dégradation de la gélatine et donc l'activité des MMPs.

Les cellules de fibrosarcomes HT1080 ont été utilisées comme contrôle positif. Aucune différence d'activité des MMPs produites par les cellules ShRobo4 et ScRobo4 n'est observée.

Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition de Robo1 pourrait conduire les cellules de cancer du sein à coloniser plus rapidement l'os, lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse, ce qui explique l'augmentation de la charge tumorale dans les pattes des animaux portant des tumeurs déficientes en Robo1 (Thèse de Vincent Gonin). Cette hypothèse a en effet été confirmée par l'observation que, lorsque les cellules transfectées ScRobo1 et ShRobo1 ont été directement inoculées dans la cavité de la moelle osseuse du tibia, les souris porteuses de tumeurs contrôle ou déplétées en Robo1 présentent un degré similaire de destruction de l'os et de la charge tumorale, déterminées par radiographie et examen histomorphométrique (Thèse de Vincent Gonin). Ainsi, les cellules tumorales déplétées pour Robo1 sont dotées d'une grande capacité invasive *in vitro* et *in vivo*.

Une expérience identique a été réalisée avec les cellules déplétées en Robo4 : des cellules transfectées ScRobo4 et ShRobo4 ont été directement inoculées dans la cavité de la moelle osseuse du tibia. Les lésions ostéolytiques formées par les cellules tumorales ShRobo4 sont comparables à celles observées dans les pattes

métastatiques d'animaux porteurs de tumeurs ScRobo4 (Figure 51A). Cette observation inattendue s'explique par le fait que l'inhibition de Robo4 diminue la charge tumorale osseuse chez les animaux métastatiques, par rapport à ceux avec des tumeurs ScRobo4 (Figure 51B). Cependant, une forte augmentation d'ostéoclastes TRAP positifs à l'interface tumeur/os est aussi observée (Figure 51C) ainsi que des niveaux plus élevés de la cytokine pro-ostéoclastique IL-8 dans le sérum des animaux porteurs de tumeurs ShRobo4 (Figure 52), par rapport à ceux avec des tumeurs ScRobo4. Par conséquent, une forte activité endogène stimulatrice des ostéoclastes est exercée par les cellules tumorales ShRobo4, ce qui explique probablement pourquoi les animaux porteurs de tumeurs ShRobo4 présentent des lésions ostéolytiques, de même étendue que chez les animaux contrôles, malgré une réduction de la charge tumorale osseuse (Figure 51).

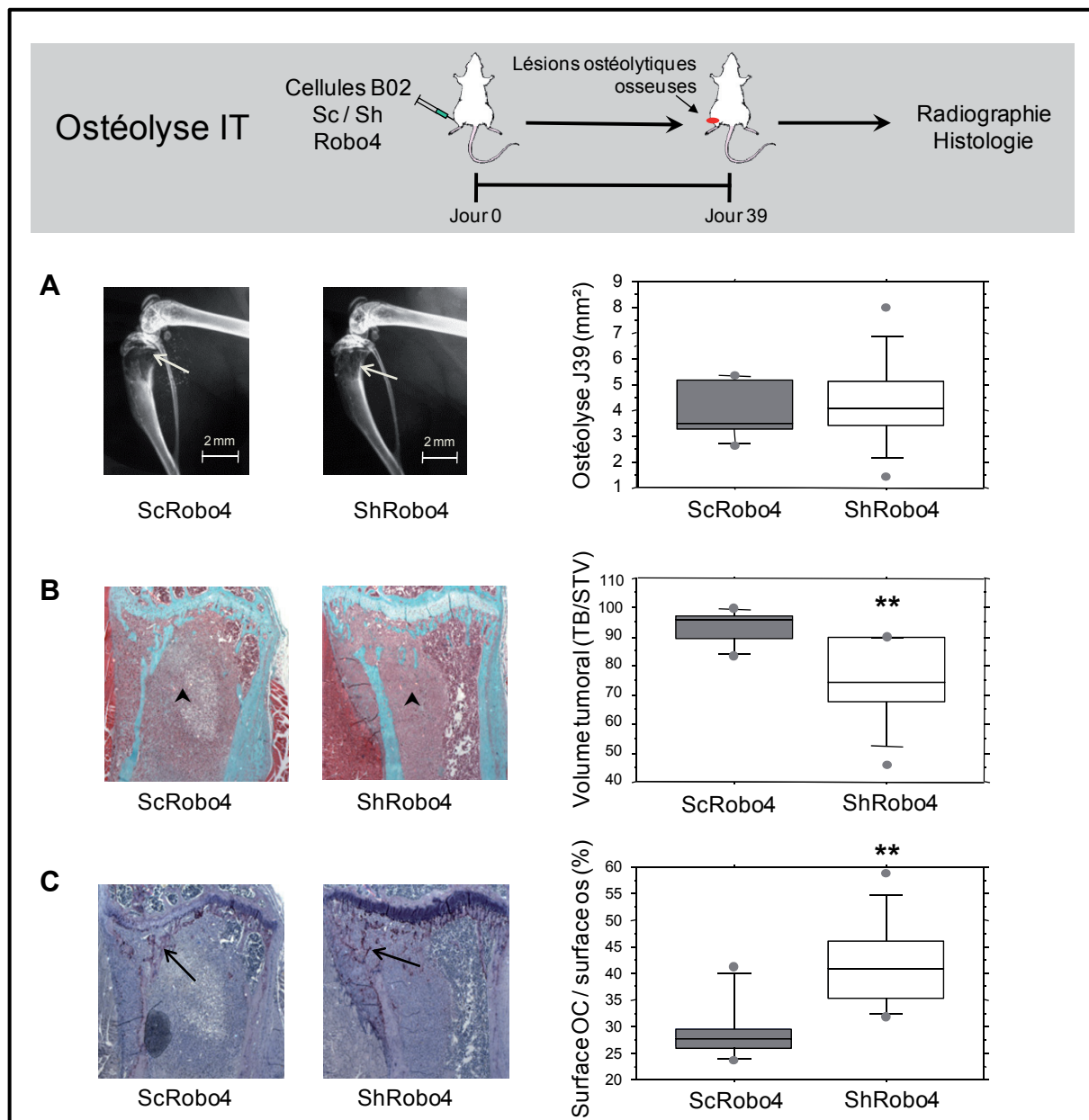


Figure 51. Effet de l'inhibition de l'expression de Robo4 dans les cellules du cancer du sein sur la croissance tumorale intra-osseuse.

Croissance intra-osseuse des cellules tumorales transfectées avec les Sc ou ShRobo4. Les suspensions cellulaires (1.10^5 cellules) ont été injectées directement dans le tibia des animaux. Sept semaines après l'inoculation des cellules tumorales, les surfaces de destruction osseuse, indiquées par des flèches, et de charge tumorale (flèches) ont été mesurées par radiographie (A) et histomorphométrie (B).

(C) La détection *in situ* des ostéoclastes par coloration TRAP (acide phosphatase résistante au tartrate) colore les ostéoclastes actifs en rouge (flèche). Le rapport de surface des ostéoclastes (OC) sur la surface de l'os est exprimé en pourcentage.

******, P <0,01 comparé au groupe ScRobo4.

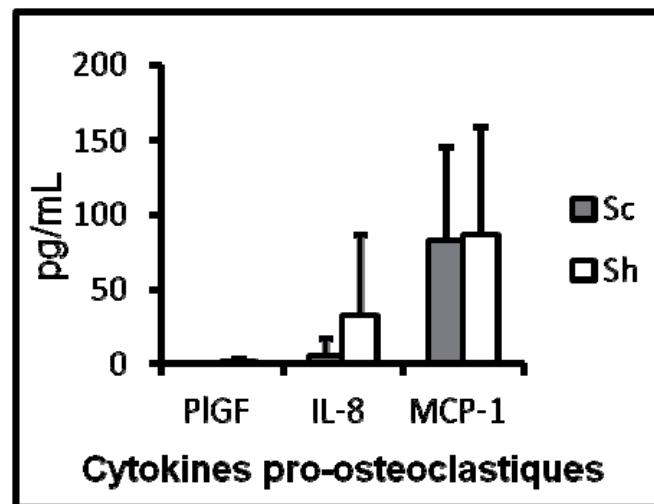


Figure 52. Dosage ELISA de cytokines pro-ostéoclastiques *in vivo*.

Dosage ELISA des cytokines PIGF, IL-8 et MCP-1 dans le sérum des animaux métastatiques, après l'inoculation intra-tibiale des cellules transfectées Sh ou ScRobo4.

L'inhibition de Robo4 réduit la survie et la prolifération des cellules cancéreuses dans la moelle osseuse

L'invasion des cellules tumorales se produit à un stade très précoce au cours du processus de formation des métastases osseuses, ce qui permet aux cellules tumorales de s'ancrer et de prospérer dans la moelle osseuse [1]. Les récepteurs Robo4 et Robo1 étant capables de réguler l'invasion des cellules de cancer du sein *in vitro* ainsi que la formation de métastases osseuses *in vivo*, nous avons donc émis l'hypothèse que ces récepteurs pourraient faciliter la prise de greffe de cellules tumorales dans le micro-environnement de la moelle osseuse. Pour répondre à cette question, les cellules cancéreuses MDA-MB-231/B02 ShRobo, ainsi que les cellules parentales MDA-MB-231/B02, ont été injectées par voie sanguine chez la souris. Les animaux ont ensuite été sacrifiés 7 jours après l'inoculation des cellules tumorales, date à laquelle aucune métastase n'est encore détectée par radiographie ou imagerie par bioluminescence et histologie [292]. La moelle osseuse des membres postérieurs de ces animaux a ensuite été récupérée et mise en culture sous sélection antibiotique, ce qui permet la croissance sélective des cellules tumorales résistantes aux antibiotiques. En comparaison avec les souris inoculées avec des cellules parentales MDA-MB-231/B02, le nombre de colonies de cellules tumorales dans la

moelle osseuse de souris inoculées avec des cellules ShRobo4 a été réduit de 75 à 80% (Figure 53A). Par contre, aucune différence n'est observée entre les cellules parentales MDA-MB-231/B02 et les cellules déplétées en Robo1. De plus, lorsque les cellules tumorales sont directement inoculées dans la cavité de la moelle osseuse du tibia, le nombre de colonies ShRobo4 présentes dans la moelle osseuse a été réduit de 78% par rapport à celui observé pour les cellules ScRobo4 (Figure 53B). Un effet similaire a été observé lorsque les cellules tumorales ont été cultivées de façon indépendante de l'ancrage dans de l'agar mou. Par rapport aux cellules MDA-MB-231/B02 ScRobo4 et parentales, le nombre et la taille des colonies formées par les cellules ShRobo4 sont diminués significativement (Figure 53C). Ainsi, Robo4 semble nécessaire à la nidation et peut-être à la survie des cellules cancéreuses du sein dans la moelle osseuse.

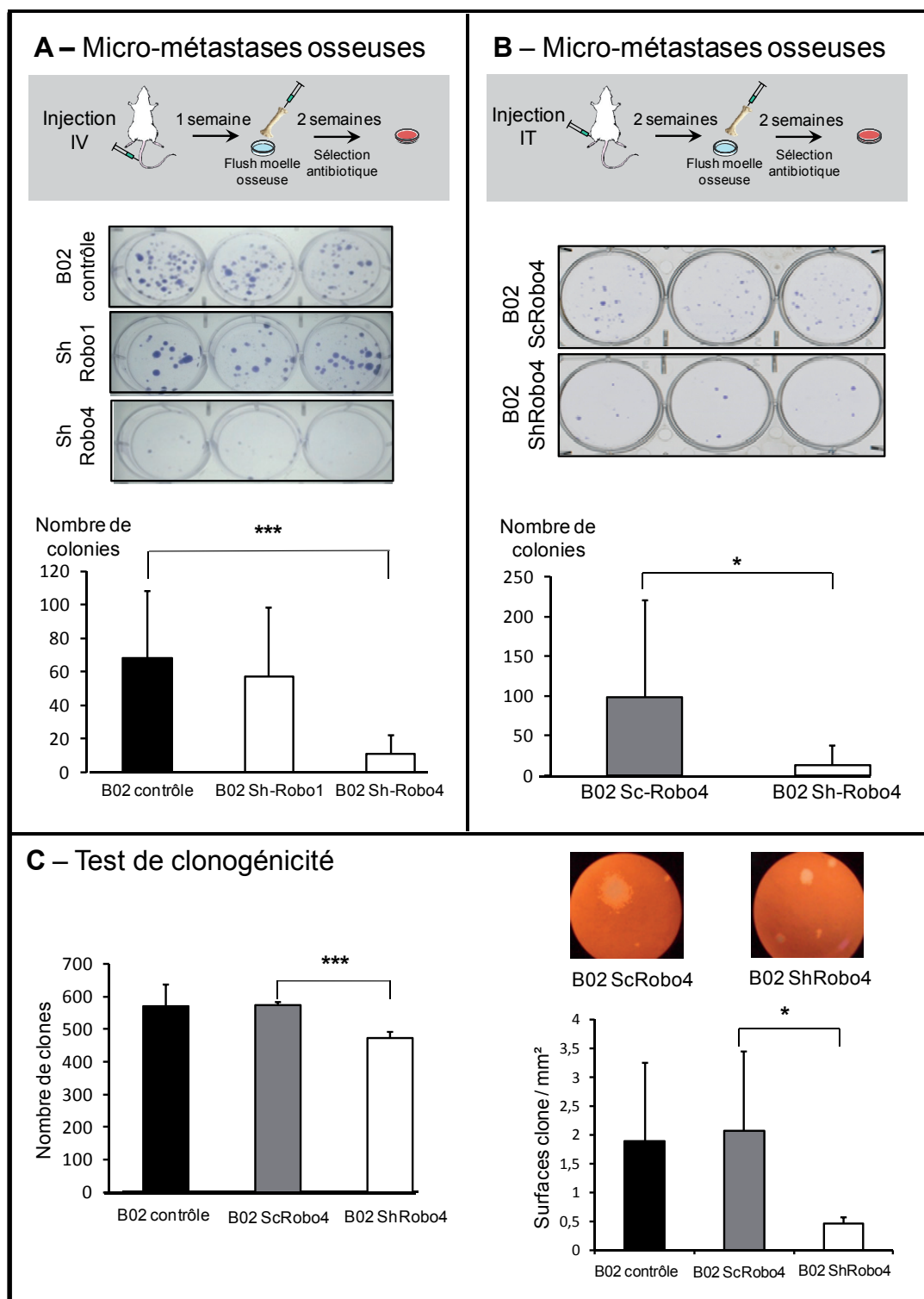


Figure 53. Colonisation de la moelle osseuse par les cellules MDA-MB-231/B02.

(A) Sept jours après l'inoculation intra-artérielle de cellules cancéreuses MDA-MB-231/B02 ShRobo1/4 ou parentales, les animaux sont sacrifiés et les membres postérieurs sont collectés ainsi que la moelle osseuse. Les cultures de cellules de moelle osseuse ont été placées sous sélection antibiotique, ce qui permet la croissance sélective des cellules tumorales résistantes aux antibiotiques. Les colonies de cellules tumorales, ainsi obtenues, sont fixées et colorées au cristal violet, puis comptées. Des images représentatives de chaque groupe sont présentées.

(B) idem que (A), mais pour l'inoculation intratibiale de cellules tumorales transfectées avec les cellules Sc ou Sh Robo4.

(C) Test de clonogénicité en agar mou. L'inhibition de l'expression de Robo4 diminue le nombre et la taille des colonies. *, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$.

Slit2 est produit par le microenvironnement de moelle osseuse métastatique

Il a été précédemment montré que Slit2 régule la différenciation des ostéoblastes *in vitro* [208]. Il a été également montré précédemment au laboratoire, une augmentation de 100 fois des niveaux d'ARNm murins Slit2 dans la moelle osseuse des animaux métastatiques injectés avec des cellules humaines de cancer du sein comparé à des animaux non injectés (Thèse de Vincent Gonin). De plus, nous avons également montré, par RT-PCR, que l'ARNm Slit2 est exprimé par les ostéoblastes mais pas par les ostéoclastes (Figure 54), ce qui suggère que les ostéoblastes sont la principale source de Slit2 dans les lésions métastatiques osseuses.

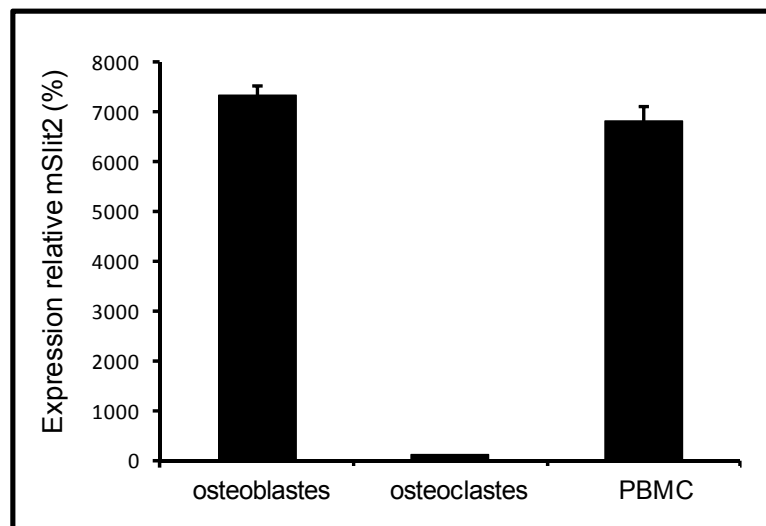


Figure 54. Analyse du taux d'expression des transcrits de Slit2 dans l'environnement osseux et les cellules osseuses.

Expression des ARNm Slit2 dans les ostéoblastes et les ostéoclastes de souris. Les niveaux d'expression relatifs de Slit2 sont exprimés en pourcentage de ceux exprimés dans les ostéoclastes.

Travaux supplémentaires

Obtention de clones stables déplétés en Robo1 et Robo4 dans des lignées de cancers du sein humaines et murines par une technique d'infection lentivirale

Nous avons également tenté d'inhiber l'expression de Robo1 ou Robo4 à l'aide d'un kit d'expression lentiviral. Nous avons utilisé pour cela, un sous clone de la lignée cellulaire de cancer du sein MDA-MB-231, les cellules MDA-MB-231/B02 TTA, décrite par Peyruchaud *et al* [299] ; l'utilisation du sous clone MDA-MB-231/B02-Frt11 n'étant pas possible car ces cellules sont déjà résistantes à la blasticidine, antibiotique qui permet également la sélection du Sh dans le kit utilisé ici. Toutefois, le sous clone MDA-MB-231/B02 TTA n'exprime pas le gène de la luciférase nécessaire à leur suivi *in vivo*. Nous avons donc co-transfecté (Lipofectamine 2000, Invitrogen ou Transfast, Promega) les plasmides pSV-puro et pBiL dans ces cellules MDA-MB-231/B02 TTA. Nous avons ainsi obtenu 3 clones MDA-MB-231/B02 luciférase ; seuls les clones L1.2 et L4.1 (issus d'une transfection par Lipofectamine 2000) ont été utilisés par la suite. Le clone T4.1 (transfection *via* l'agent Transfast) proliférant très difficilement *in vitro* a été écarté. Les cellules murines de cancer mammaire 4T1 1V luc frt utilisées contiennent déjà ce gène.

• Obtention des clones déplétés pour Robo1 ou Robo4

Nous avons donc ensuite transduit les différentes lignées cellulaires, MDA-MB-231/B02 L1.2, L1.4 et 4T1 1V luc frt à l'aide du kit « The BLOCK-iT™ HiPerform™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System with EmGFP » (Invitrogen).

Ce kit comporte trois grandes étapes :

- La formation du plasmide lentiviral, dans lequel nous avons cloné des séquences oligonucléotidiques, humaines ou murines, codant pour des shARNs dirigés soit contre Robo 1, soit contre Robo 4.
- La production des lentivirus.
- La transduction de nos cellules cibles par les lentivirus.

La sélection des clones ainsi obtenus a été réalisée par western blot (Figure 55). Parmi les 180 clones MDA-MB-231/B02 récoltés, transfectés soit par un ShARN dirigé contre l'ARNm de Robo1, soit contre celui de Robo4, nous avons sélectionné 3 clones MDA-MB-231/B02 TTA luciférase déplétés à 90% pour Robo1 (clones 4.2, 4.3 et 4.9) (Figure 55A) et 4 pour Robo4 (clones 4.2, 4.5, 4.7 et 9.10) (Figure 55B) déplétés entre 80 et 95%. Les niveaux de Robo4 et Robo1, respectivement, ne sont pas affectés après la déplétion.

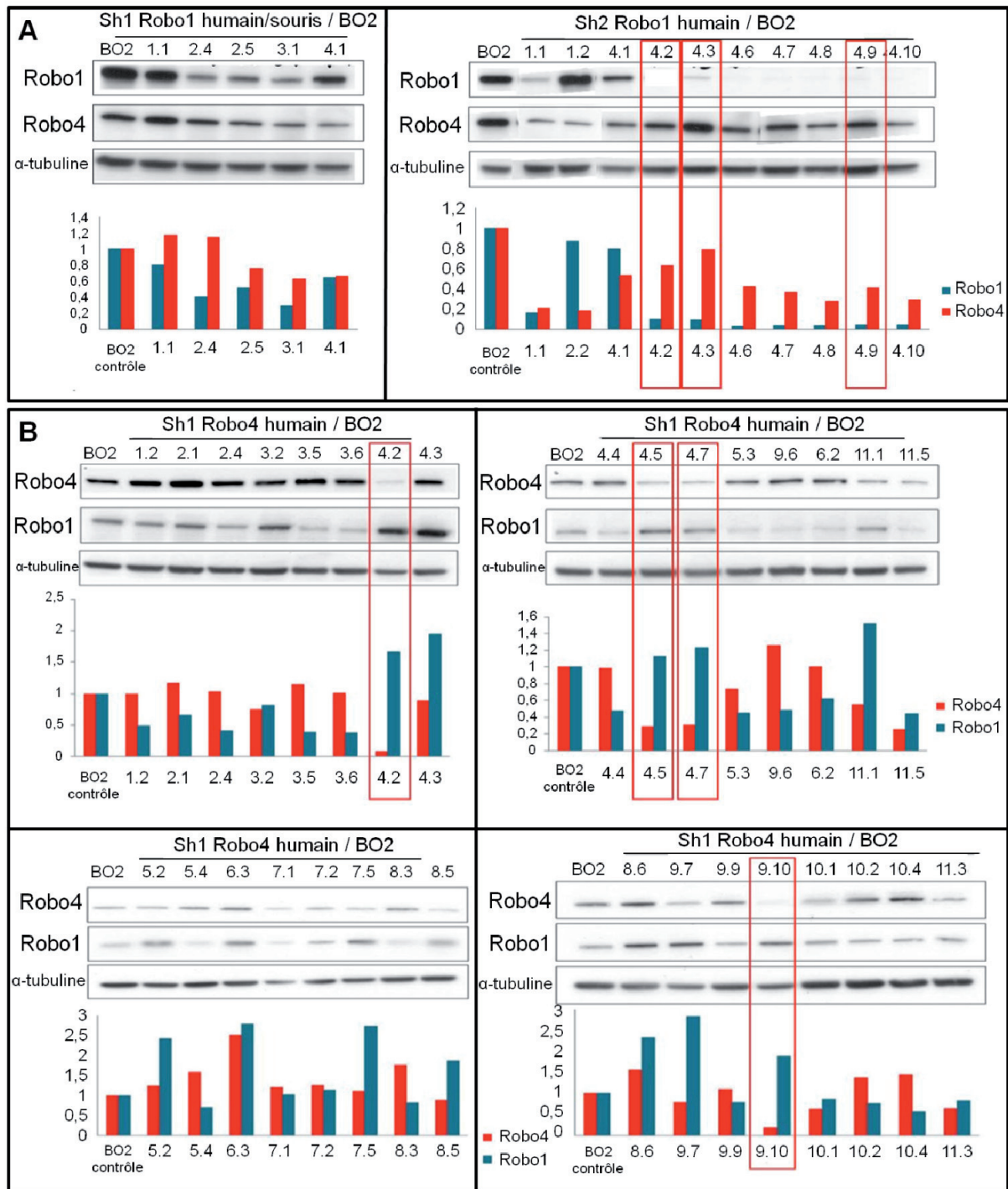


Figure 55. Sélection, par western blot, des clones MDA-MB-231/B02 transduits.

Evaluation de l'expression de Robo1/4 par Western blot dans les cellules cancéreuses humaines MDA-MB-231/B02 ainsi que dans les clones invalidés pour Robo1 (Sh 4.2, 4.3 et 4.9) (A) et pour Robo4 (Sh 4.2, 4.5, 4.7 et 9.10) (B). La quantification des niveaux de Robo1 et 4 a été réalisée par utilisation du logiciel photoshop.

Nous avons également obtenu un clone partiellement déplété en Robo4 dans la lignée cellulaire murine 4T1 1V luc frt (clone 3.4) (Figure 56).

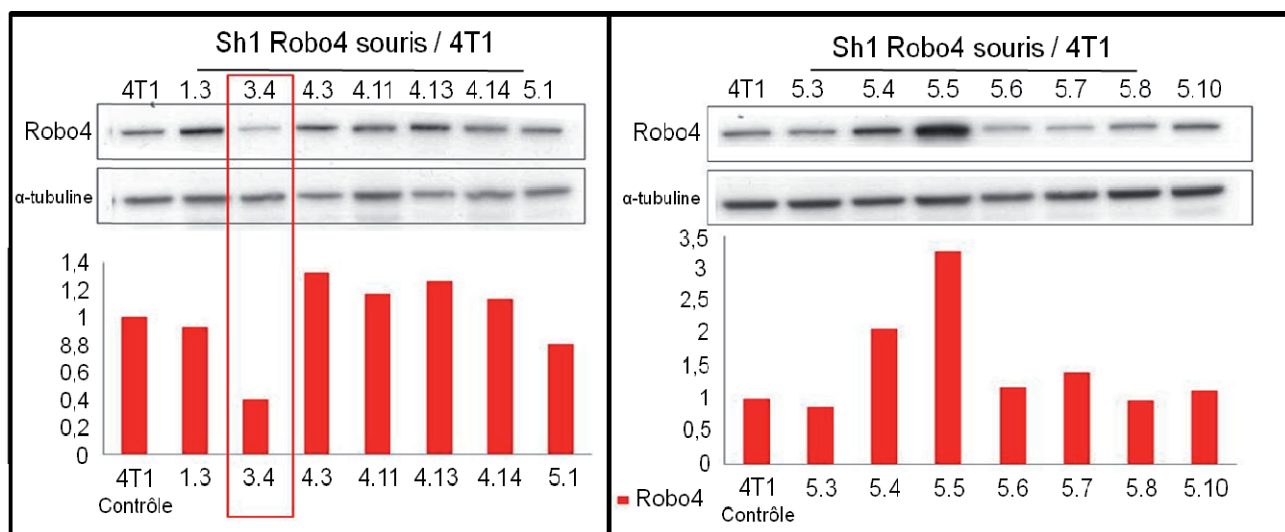


Figure 56. Sélection des clones cellulaires 4T1 transduits par western blot.

Evaluation de l'expression de Robo4 par Western blot dans les cellules cancéreuses murines 4T1 1V luc frt, ainsi que dans les clones invalidés pour Robo4 (Sh 3.4). La quantification des niveaux de Robo4 a été réalisée par utilisation du logiciel photoshop.

• *Expériences in vivo*

Afin d'analyser l'effet de la déplétion de Robo1 dans les clones de cellules, sur la formation de métastases osseuses *in vivo*, nous avons injecté un pool de ces clones, par voie intraveineuse, à des souris Balb/c immunodéficientes âgées de quatre semaines. Les lignées parentales MDA-MB-231/B02 TTA luciférase L1.2 et L4.1 ont également été injectées en parallèle. Les animaux ont été suivis de façon hebdomadaire par bioluminescence et radiographie pendant toute la durée du protocole.

Nous avons alors observé une apparition tardive de plage d'ostéolyse (seulement 21 jours après l'inoculation des cellules), aussi bien chez les souris injectées avec les lignées parentales L1.2 et L4.1, que les lignées déplétées en Robo1 (Figure 57). Cependant, les cellules MDA-MB-231/B02 utilisées en routine au laboratoire induisent d'importantes plages de lyse en 28 jours seulement, contre 56 jours pour les clones L1.2 et L4.1 (Figure 57B). Nous observons donc un décalage de la

cinétique d'apparition des lésions ostéolytiques, suggérant que le pouvoir métastatique des cellules contrôles MDA-MB-231/B02 TTA luciférase a été modifié, lors des manipulations génétiques de ces cellules et de la sélection des clones.

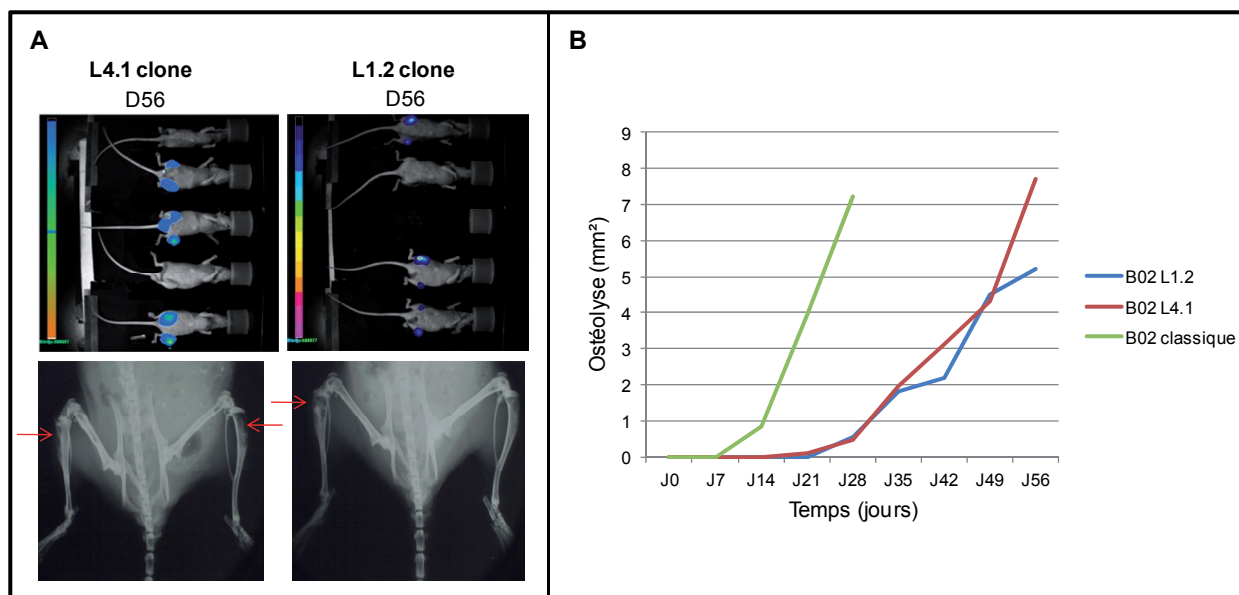


Figure 57. Suivi du potentiel métastatique des clones luciférase MDA-MB-231/B02 L1.2 et L4.1.

(A) Formation de lésions ostéolytiques chez les animaux ; en haut : bioluminescence des métastases à J58 pour les clones L4.1 et à J60 pour les L1.2. En bas : radiographies des pattes arrière. Les flèches indiquent les lésions ostéolytiques.

(B) Cinétique de l'apparition des plages d'ostéolyse, après injection par voie intraveineuse, des clones L4.1 et L1.2 ainsi que des cellules MDA-MB-231/B02 parentales utilisées en routine au laboratoire (n= 5 souris pour chaque clone). Les clones luciférase L1.2 et L4.1 induisent des lésions ostéolytiques deux fois plus tardivement que les cellules MDA-MB-231/B02 parentales.

Grâce au système lentiviral, des clones MDA-MB-231/B02 déplétés pour la protéine Robo1 ou 4, ainsi que des clones 4T1 déplétés pour Robo4, ont été obtenus. Le suivi des lésions ostéolytiques chez des animaux injectés avec les cellules MDA-MB-231/B02 TTA luciférase L1.2 et L4.1, ou avec les cellules déplétées en Robo1, montre un retard dans l'apparition des lésions comparé à des MDA-MB-231/B02 parentales utilisées en routine au laboratoire. Le clonage des cellules MDA-MB-231/B02 TTA luciférase, avant transduction, a donc induit une

sélection de cellules présentant des capacités réduites à former des métastases osseuses ; c'est pourquoi, nous n'avons pas utilisé ces clones.

Toutefois, les outils lentiviraux construits avec les différentes séquences ciblant les ARNm de Robo1 ou 4 murins et humains restent disponibles au laboratoire pour d'éventuelles transductions dans d'autres lignées cellulaires.

PARTIE IV : Discussion et perspectives

La famille des protéines Slits et de leurs récepteurs Robos, a initialement été découverte dans le système nerveux, dans lequel ils agissent comme des facteurs clés du guidage axonal et du développement des ramifications durant le développement [5]. Depuis leur découverte, de nombreux rôles additionnels leur ont été attribués, notamment dans la régulation de la prolifération, de l'adhésion et de la migration cellulaires ainsi que de l'angiogenèse, dans de nombreux cellules et tissus.

Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont démontré l'implication de la voie de signalisation Slit/Robo dans la régulation de ces divers processus cellulaires, soulevant ainsi la possibilité d'un rôle important exercé par cette voie dans l'altération des cellules lors de la transformation tumorale [242] [264] [267] [268] [269] [240] [273] [279] [285] [283]. En effet, l'expression des protéines Slits et Robos est souvent altérée dans de nombreux cancers (Tableau 6) ; ces protéines peuvent donc être considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles.

A l'heure actuelle, aucune étude ne démontre l'implication des récepteurs Robo et de leurs ligands Slit dans les métastases osseuses.

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse, associés aux travaux précédemment réalisés au laboratoire par Vincent Gonin sur le récepteur Robo1, ont permis de montrer des rôles antagonistes des récepteurs Robo1 et Robo4 dans la formation et le développement des métastases osseuses.

Au laboratoire, une analyse transcriptomique comparative entre une lignée humaine de cancer du sein, les MDA-MB-231, et leur sous-population ostéotrope, les MDA-MB-231/B02, a montré une surexpression de composants de la voie de signalisation Slit/Robo dans les cellules MDA-MB-231/B02 (Figure 37). Ces observations nous ont conduits à étudier, en particulier, l'implication des récepteurs Robo1 et Robo4 dans la dissémination métastatique à l'os des cellules de cancer du sein.

Afin de définir une valeur pronostique de l'expression de Robo1 et Robo4 chez des patientes atteintes de cancer du sein, nous avons analysé l'expression de ces récepteurs dans une cohorte de 254 patientes : l'expression de Robo4 dans les tumeurs primaires du sein est associée à un mauvais pronostic de rechute métastatique (Figure 38, 39 et Tableau 7). Les taux de survie sans récurrence ne diffèrent pas selon les niveaux d'expression de Robo1 (Figure 38).

L'étude *in vivo* des conséquences de la déplétion de Robo4 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231/B02 (cellules shRobo4) nous a permis d'observer une légère augmentation de l'étendue de l'ostéolyse chez les animaux injectés avec les cellules ShRobo4, comparée aux animaux contrôles. La charge tumorale présente dans les membres postérieurs métastatiques restant similaire dans les deux groupes (Figure 44). En revanche, la déplétion de Robo1, dans les cellules MDA-MB-231/B02, conduit à une forte augmentation de l'ostéolyse ainsi que de la charge tumorale chez les animaux injectés, comparées à celles observées chez les animaux injectés avec les cellules ScRobo1. De plus, une analyse de l'activité ostéoclastique mesurée dans ces tumeurs a mis en évidence une forte augmentation de cette activité chez les animaux présentant des tumeurs déplétées pour Robo4 (Figure 44), alors que chez les animaux porteurs de tumeurs ShRobo1 aucune modification de l'activité ostéoclastique dans les tumeurs n'a été mesurée.

Ces observations corrélerent avec les résultats des études *in vitro* réalisées pour évaluer la capacité de migration et d'invasion des cellules ainsi modifiées. L'inhibition de Robo1 induit une augmentation de la capacité invasive des cellules tumorales *in vitro*, expliquant ainsi l'augmentation de la charge tumorale observée *in vivo* alors que l'inhibition de Robo4 diminue cette propriété. (Figures 48 et 49). Robo1 et Robo4, dans les cellules tumorales, présentent donc des propriétés anti-invasives et pro-invasives, respectivement.

A ce jour, dans la littérature, aucune étude ne décrit l'implication de Robo4 dans la migration ou l'invasion dans des modèles de cellules tumorales. Les résultats des expériences de migration et d'invasion réalisées avec les cellules déplétées en Robo4 établissent clairement un rôle de ce récepteur dans la migration et l'invasion des cellules MDA-MB-231/B02.

Bien que dans la littérature, Robo1 soit décrit comme présentant un rôle à la fois pro et anti-invasif, il existe néanmoins, dans le cas des cancers du sein, un consensus général selon lequel, l'interaction Slit/Robo1 inhibe la migration des cellules tumorales *in vitro* [294] [296]. Les résultats que nous observons lors de la déplétion en Robo1 sont donc conformes à ces observations.

L'augmentation de l'étendue de l'ostéolyse pouvant résulter soit d'un accroissement du nombre d'ostéoclastes soit d'une augmentation de l'activité de

résorption des ostéoclastes, nous avons réalisé des expériences d'ostéoclastogenèse *in vitro* en présence des milieux conditionnés produits par les cellules des différentes lignées étudiées. La formation d'ostéoclastes matures est multipliée par deux lors de l'expérience réalisée avec le milieu conditionné provenant de cellules ShRobo4, comparée à celle observée pour les cellules contrôles. (Figure 45). Cette observation complète les données précédemment obtenues lors de l'analyse *in vivo* de l'activité ostéoclastique mesurée par un marquage TRAP dans les tumeurs des animaux injectés avec les cellules ShRobo4. Ces résultats sont également confirmés par des analyses par cytokines array et dosages ELISA, qui montrent une augmentation de la production de cytokines pro-ostéoclastiques (PIGF, MCP-1 et IL8) par les cellules déplétées en Robo4 *in vitro* (Figure 45). Enfin, l'augmentation de la production des cytokines pro-ostéoclastiques est également observée *in vivo*, lors du dosage de ces cytokines dans les sérums des animaux porteurs de tumeurs ostéolytiques ShRobo4 (Figure 46).

L'augmentation des surfaces de résorption ostéoclastique active dans les pattes métastatiques, provenant d'animaux porteurs de tumeurs ShRobo4, est probablement le résultat d'une augmentation de la production de cytokines pro-ostéoclastiques par les cellules tumorales *in vivo*.

Ces observations sont à mettre en relation avec les résultats d'une étude montrant l'implication du PIGF, cytokine produite par les cellules stromales de la moelle osseuse, dans l'établissement des métastases osseuses. Les auteurs montrent que l'inhibition du PIGF, par un anticorps, induit une diminution de l'incidence ainsi que de la taille des métastases osseuses, en réduisant la formation et l'activité des ostéoclastes. L'inhibition du PIGF induisant également une diminution de l'ancrage des cellules tumorales dans l'environnement osseux [304].

Les résultats de l'expérience d'ostéoclastogenèse *in vitro* réalisée avec les milieux conditionnés de cellules déplétées en Robo1, confirment les observations réalisées *in vivo* qui n'ont permis de mettre en évidence aucune différence d'activité ostéoclastique mesurée par un marquage TRAP des tumeurs.

Les lésions ostéolytiques plus importantes observées dans les animaux porteurs de tumeurs déficientes en Robo1 ne résultent donc pas d'une modification de la production des cytokines pro-ostéoclastiques mais sont la conséquence indirecte du plus grand nombre de cellules tumorales ShRobo1 résidant dans la moelle osseuse qui, à leur tour, stimulent la destruction osseuse médiée par les ostéoclastes.

Les résultats des expériences d'injections intra-tibiales des cellules MDA-MB-231/B02 apportent des informations complémentaires. En effet, l'injection des cellules ShRobo1 conduit à une étendue des lésions ostéolytiques identique à celle observée chez les animaux injectés avec les cellules contrôles. De même, l'injection intra-tibiale des cellules Sc ou ShRobo4 n'induit pas de différence d'ostéolyse entre les deux groupes alors qu'une diminution de la charge tumorale et une augmentation de l'activité ostéoclastique, dans les tumeurs ShRobo4 ont été observées (Figure 51). Une augmentation de la production de la cytokine pro-ostéoclastique IL8 a été également observée dans le sérum des animaux injectés en intra-tibial avec les cellules ShRobo4 (Figure 52).

Par conséquent, une forte activité endogène stimulatrice des ostéoclastes est exercée par les cellules tumorales ShRobo4, ce qui explique probablement pourquoi les animaux porteurs de tumeurs ShRobo4 présentent des lésions ostéolytiques, de même étendue que les animaux contrôles, malgré une réduction de la charge tumorale osseuse.

L'étude de la déplétion de Robo1 sur la croissance de xénogreffes après injection orthotopique montre une augmentation significative de la taille tumorale (Figure 41), conséquence probable d'une augmentation du nombre de vaisseaux dans ces tumeurs. En effet, les clones déplétés en Robo1 produisent plus de VEGF, molécule connue pour son implication dans l'angiogenèse [305]. Toutefois, le volume tumoral mesuré suite à l'injection de ces clones directement en intra-tibial est identique dans les animaux porteurs de tumeurs ShRobo1 et ScRobo1. Cette divergence s'explique par le fait que les niveaux de VEGF n'influencent pas l'ostéolyse, c'est pourquoi la déplétion en Robo1 favorise la croissance tumorale dans la glande mammaire, mais pas dans les expériences de xénogreffes intra-tibiales. En effet, d'autres travaux réalisés au laboratoire ont démontré que l'inhibition de l'expression du VEGF, par ShARN ou par utilisation d'un anticorps anti-VEGF tel que le bevacizumab, dans les cellules MDA-MB-231/B02 ne diminuait pas la formation et le développement des métastases osseuses (Travaux de Richard Bachelier et Philippe Clézardin, en cours de soumission). Il est ainsi suggéré que les taux de VEGF, déjà très élevés dans l'os, rendent insignifiants ceux produits par les cellules métastatiques. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Lu *et al* concernant HIF1, un gène contrôlé par l'hypoxie qui entraîne une production de VEGF [306] [305]. Dans cette étude, les auteurs montrent que HIF1 régule

positivement les cellules de cancer du sein, augmentant ainsi la taille des tumeurs primaires et des métastases pulmonaires, mais n'induit aucun effet sur la formation des métastases osseuses [306].

Au laboratoire, il avait également été démontré par RT-PCR que l'environnement métastatique favorisait la production de Slit2 dans l'os (Thèse de Vincent Gonin), et plus précisément par les ostéoblastes (Figure 54). Slit2 est un ligand très controversé pour le récepteur Robo4, mais formellement identifié pour Robo1. Ces résultats nous permettent donc d'émettre l'hypothèse que l'interaction Robo1/Slit2 favoriserait également l'arrêt de ces cellules dans l'environnement osseux. En effet, des tests de migration en présence de Slit2, montrent un ralentissement des cellules tumorales contrôles, tandis que Slit2 n'induit aucun effet sur la migration des cellules déplétées en Robo1 (Thèse de Vincent Gonin).

Bien que Robo1 soit souvent considéré comme un suppresseur de tumeur, il agirait ici, négativement, comme un frein pour les cellules tumorales dans l'environnement osseux. Toutefois, la présence de Robo1 diminue la capacité invasive des cellules tumorales et donc le nombre de cellules tumorales métastatiques présentes dans l'os, réduisant ainsi l'étendue de l'ostéolyse. En diminuant la charge tumorale, Robo1 réduit le nombre d'ostéoclastes actifs et donc l'étendue des lésions osseuses. L'expression de Robo1 est donc inversement associée à une croissance métastatique dans le squelette. Cette observation corrèle avec la littérature qui tend à démontrer, dans le cas des cancers du sein, un consensus général selon lequel l'interaction Slit/Robo1 freine la croissance de tumeurs primaires *in vivo* [298] [264] [297].

A l'inverse, les tumeurs obtenues après une injection orthotopique de cellules déplétées en Robo4 sont 3 fois plus petites en moyenne que les tumeurs ScRobo4 contrôles (Figure 41). Cette diminution est corrélée à la réduction de l'angiogenèse tumorale (Figure 42). Toutefois, les niveaux d'expression du VEGF sont similaires entre les clones Sc et ShRobo4 (Figure 45).

Nous avons alors émis l'hypothèse que la diminution de la taille tumorale, observée pour cette croissance orthotopique, ainsi que dans les pattes métastatiques d'animaux injectés avec des cellules ShRobo4, par voie intraveineuse ou directement dans la cavité de la moelle osseuse du tibia, peut être due à un problème d'ancrage de ces cellules déplétées en Robo4. Des expériences d'analyse de colonisation de la moelle osseuse ont donc été réalisées (Figure 53). Les animaux

ont été injectés, par voie intraveineuse, avec des cellules parentales MDA-MB-231/B02 ou déplétées en Robo1 ou en Robo4. Ces résultats montrent que l'absence de Robo4 induit une diminution de 80% de la colonisation de la moelle osseuse, tandis que la déplétion de Robo1 ne modifie pas cette colonisation (Figure 53A). Les cellules déplétées en Robo4 ont ensuite été injectées directement dans la cavité osseuse. On observe alors une diminution de 78% de la formation de colonies (Figure 53B), suggérant ainsi que Robo4 est également nécessaire à la nidation des cellules tumorales dans l'environnement osseux. Enfin, un test de clonogénicité *in vitro*, permettant la croissance des cellules tumorales de façon indépendante de l'ancrage, montre une diminution du nombre et de la taille des colonies formées par les cellules ShRobo4 en comparaison aux colonies formées par les cellules contrôles ScRobo4 (Figure 53C).

Ainsi, la présence du récepteur Robo4 semble nécessaire pour la nidation, l'ancrage et probablement la survie des cellules cancéreuses MDA-MB-231/B02 dans la moelle osseuse.

Koch *et al* ont récemment démontré que Robo4 pouvait jouer le rôle de ligand pour le récepteur à dépendance UNC5b, qui est fortement exprimé par les cellules endothéliales [226]. L'os étant un tissu richement vascularisé, dont les vaisseaux sanguins permettent l'arrivée des cellules tumorales dans cet environnement, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une interaction Robo4/UNC5b permettrait l'arrêt des cellules au niveau des cellules endothéliales de l'os.

De plus, il vient d'être démontré, au laboratoire, par RT-PCR, que le récepteur UNC5b était plus exprimé par les ostéoblastes murins que les ostéoclastes (données non montrées), suggérant ainsi que l'ancrage des cellules tumorales pourrait avoir lieu suite à une interaction inattendue entre le récepteur Robo4, exprimé par les cellules tumorales, et le récepteur UNC5b présent dans les ostéoblastes.

Enfin, dans le but de préciser la voie de signalisation impliquée dans notre modèle, nous avons traité des cellules Sc ou ShRobo1/4 avec la protéine Slit2 murine recombinante, puis évalué la phosphorylation des protéines Akt et Src par western blot (données non montrées). Une récente étude montre qu'un traitement des cellules MDA-MB-231 par la protéine Slit2 diminue la phosphorylation d'Akt ; cet effet est inhibé dans des cellules déplétées pour Robo1, suggérant que l'interaction Slit/Robo1 régule la voie de signation Akt [298]. Cependant, nous n'avons pas

observé de modifications de la phosphorylation des protéines Akt et Src dans nos lignées cellulaires déplétées en Robo1 ou Robo4, ni dans les cellules contrôles (données non montrées), suggérant que les effets de l'inhibition des récepteurs Robo1 et Robo4 observés *in vivo* et *in vitro* dans nos lignées cellulaires ne dépendent pas des voies de signalisation Akt et Src. Ces observations corréleront avec les résultats d'une étude réalisée dans les lignées cellulaires de cancer de l'ovaire, dans lesquelles un traitement par la protéine Slit2 ne modifie pas la phosphorylation de la protéine de survie Akt [307].

D'autres voies de signalisation sont en cours d'étude, telles que la voie Notch. Il vient d'être démontré que la voie Slit/Robo module la prolifération des progéniteurs du système nerveux central par interaction avec la voie de signalisation Notch et activation de *Hes1* un effecteur de Notch [308]. Des facteurs sécrétés par les cellules tumorales peuvent également favoriser la formation des lésions ostéolytiques par activation de la voie Notch dans un dialogue avec l'environnement stromal. Jagged1, l'un des ligands du récepteur Notch, sécrété par les cellules tumorales, perturbe la signalisation Notch des cellules stromales de l'os en stimulant la production d'IL6 par les ostéoblastes activant ainsi la différenciation ostéoclastique [309].

L'ensemble de ces observations montre que les cellules tumorales peuvent soit produire des facteurs pro-ostéoclastiques, soit induire leur production par les cellules de l'environnement osseux. Les résultats de nos expériences montrent que le récepteur Robo4 pourrait participer au contrôle de la production de ces facteurs par interaction avec d'autres voies de signalisation.

Ces travaux de thèse ont donc permis de compléter l'étude initiée sur le récepteur Robo1 et d'apporter de nouvelles informations concernant l'implication du récepteur Robo4 dans la migration et l'implantation des cellules MDA-MB-231/B02 dans la moelle osseuse ainsi que dans le contrôle de la production de cytokines pro-ostéoclastiques.

De plus, l'ensemble de ces travaux démontre pour la première fois l'implication de récepteurs de guidage axonal, dans la formation et le développement des métastases osseuses ; ces récepteurs présentent des rôles antagonistes. Ces récepteurs semblent donc être de bons candidats pour le développement de traitements thérapeutiques. Toutefois, l'absence de Robo4 provoquant une augmentation de l'activité ostéoclastique, le ciblage de Robo4 devra être couplé à

des traitements complémentaires tels que les bisphosphonates ou le Dénosumab afin de limiter cette activité ostéoclastique intrinsèque.

Il serait donc intéressant de tester *in vivo* l'effet d'un anticorps anti-Robo4 couplé à un traitement anti-ostéolytique afin d'évaluer le bénéfice en thérapie d'un ciblage de Robo4. Par ailleurs, ce ciblage de Robo4 chez la souris permettrait d'évaluer le rapport bénéfice/risque d'un tel traitement ; en effet, les récepteurs Robo jouant un rôle important dans le développement du système nerveux ainsi que dans la vascularisation, un traitement de ces récepteurs par des agents modulateurs, tels que des anticorps, pourrait conduire à d'éventuels troubles neurologiques et vasculaires. Cependant, ces récepteurs interviennent essentiellement lors du développement embryonnaire, ce qui laisse penser que leur ciblage pourrait être intéressant en thérapie et ceux avec de faibles conséquences physiologiques.

Par ailleurs, après transfection des cellules HEK293 par la construction plasmidique (vecteur pSecTag contenant la séquence nucléotidique Fc-Robo1), donné gracieusement par le Dr. Alain Chedotal, nous avons obtenu 8 clones surexprimant cette protéine chimère (données non montrées). Cette protéine chimère permettra de « piéger » le ligand Slit2 environnant et ainsi d'évaluer l'effet de cette déplétion, *in vitro*, sur la migration et l'invasion des cellules Sc ou ShRobo1 mais aussi d'évaluer leur pouvoir métastatique *in vivo*.

Dans la même optique, des vecteurs d'expression Fc-Robo4, piégeant le ligand encore très controversé de Robo4, Fc-UNC5b et Fc-Slit2, bloquant les récepteurs Robo4 et Robo1 respectivement, sont en cours de construction au laboratoire. Ces outils permettront une première approche thérapeutique pouvant faire preuve de concept, permettant notamment d'évaluer le rapport bénéfice/risque d'un tel traitement. Ces outils pourraient également permettre de mobiliser les cellules tumorales hors de l'environnement osseux, ou de déstabiliser leurs interactions avec cet environnement, les rendant alors plus accessibles aux traitements thérapeutiques, tels que la chimiothérapie.

Des constructions contenant différentes parties du récepteur Robo4 sont également en cours de production, et devraient permettre d'effectuer des expériences d'interaction *in vitro* entre les deux récepteurs Robo1 et Robo4 et le récepteur UNC5b afin d'identifier les domaines fonctionnels de ces différents récepteurs dans notre modèle de cellules MDA-MB-231/B02 mais aussi de mieux comprendre le rôle de Robo4.

Nous examinerons également les interactions potentielles de Robo1 et Robo4 avec d'autres récepteurs de guidage axonal tels que l'éphrine et les neuropillines dont l'implication dans l'homéostasie osseuse vient d'être démontrée, en particulier celle de la neuropilline 1 qui par liaison à Séma3A régule négativement la résorption osseuse et favorise la formation osseuse [203]. En effet, lors du développement du système nerveux, les récepteurs Robo peuvent interagir avec d'autres récepteurs de guidage axonal, tels que la neuropilline 1 ou DCC, pour diriger les axones [310] [5]. Ces récepteurs présents également dans l'environnement osseux, peuvent aussi interagir avec la voie de signalisation Slit/Robo dans l'os et moduler leur fonction. Ainsi, il serait intéressant de déterminer les éventuelles interactions des récepteurs Robo avec les autres récepteurs de guidage axonal dans notre modèle cellulaire B02 afin de déterminer leurs rôles ainsi que les voies de signalisations impliquées et d'évaluer si l'inhibition des récepteurs Robo peut être plus ou moins compenser par ces autres récepteurs.

Les cellules MDA-MB-231/B02 n'ont pas la capacité de métastaser aux poumons ; dans le but de déterminer si l'inhibition des récepteurs Robo1 ou Robo4 pouvait conduire à une modification du tropisme de ces cellules, nous avons, lors des expériences de micro-métastases osseuses, également récupéré les poumons et mis en culture leurs cellules sous antibiotiques pendant 15 jours. De manière inattendue, des colonies de cellules MDA-MB-231/B02 déplétées en Robo1 mais aussi de cellules contrôles ScRobo1 ont été observées en culture, indiquant donc leur dissémination au poumon (données non montrées). L'étude de ces clones pourrait apporter des informations sur la capacité des cellules MDA-MB-231/B02 à acquérir un tropisme pulmonaire.

Il serait également intéressant d'étudier l'implication des récepteurs Robo1 et Robo4 dans d'autres lignées cellulaires humaines et murines afin d'étendre ces observations à d'autres modèles cellulaires. Les constructions lentivirales, contenant des ShARN dirigés contre les ARNm Robo1 ou Robo4 humain et murin, serviront à ces études. De plus, l'utilisation d'un modèle syngénique murin, le modèle 4T1, nous permettra également d'étudier le rôle de ces récepteurs sans négliger l'implication du système immunitaire.

L'arrivée des cellules MDA-MB-231/B02 dans l'os perturbe l'environnement et favorise le développement des métastases comme il a déjà été démontré au sein du laboratoire [156] [301]. Nous venons de montrer que la modification de l'expression des récepteurs de guidage axonal Robo1 et Robo4 perturbe l'environnement osseux et modifie le cercle vicieux : l'absence de Robo4 favorise la production de cytokines pro-ostéoclastiques alors que l'absence de Robo1 favorise la production de VEGF. L'un de nos principaux objectifs est maintenant d'identifier les voies de signalisation cellulaires qui sont affectées dans nos différentes lignées cellulaires MDA-MB-231/B02 déplétées, mais également dans l'environnement stromal : ostéoblastes, ostéoclaste, ostéocytes. En particulier, nous examinerons la voie de signalisation Notch ainsi que d'autres voies de signalisation impliquées dans l'établissement de métastases.

L'ensemble de ces résultats, qui examinent pour la première fois le rôle des récepteurs, de guidage axonal, Robo1 et Robo4 dans la formation et le développement des métastases osseuses devrait permettre à terme d'envisager des thérapies innovantes pour le traitement de ces métastases.

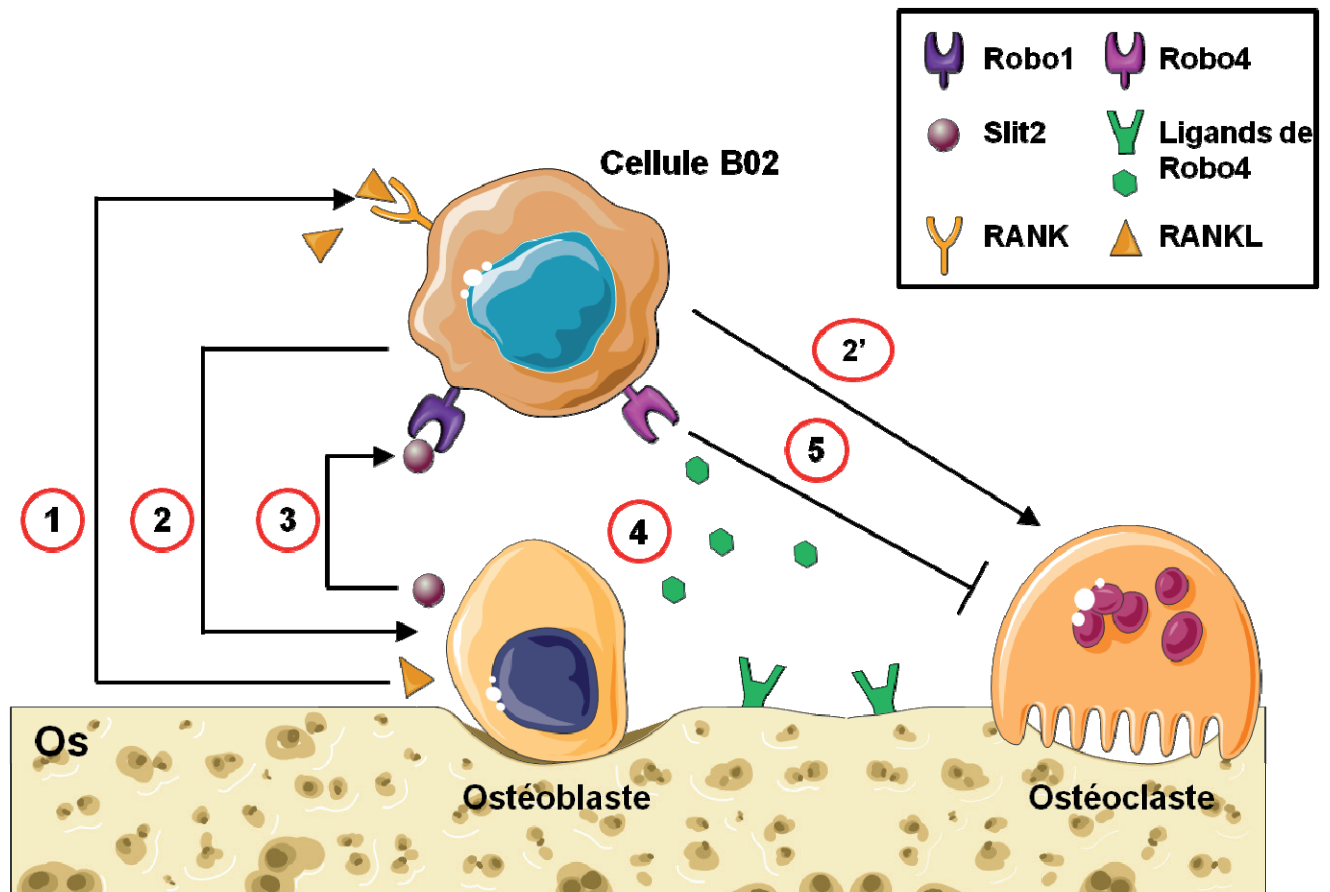


Figure 58. Représentation schématique de l'implication de la voie de signalisation Slit2/Robo1/Robo4 dans la formation et le développement des métastases osseuses.

1 - Les cellules de cancer du sein MDA-MB-231/B02 sont attirées dans l'environnement osseux par chimiotactisme : les ostéoblastes produisent du RANKL qui se lie au récepteur RANK des cellules tumorales.

2 - Une fois dans la moelle osseuse, les cellules tumorales stimulent l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes par la sécrétion de cytokines pro-ostéoblastiques (IL6) (**2**) et pro-ostéoclastiques (IL8, MCP-1, PIGF) (**2'**), respectivement.

3 - Les ostéoblastes sécrètent la protéine Slit2 qui par son interaction avec le récepteur Robo1 freine les cellules tumorales dans l'os.

4 - L'interaction entre le récepteur Robo4 et son ligand non encore identifié participerait à l'ancrage des cellules tumorales dans l'os.

5 - Le récepteur Robo4 inhibe indirectement l'activité ostéoclastique. En effet, la déplétion de Robo4 induit la sécrétion de cytokines pro-ostéoclastiques par les cellules tumorales MDA-MB-231/B02 *in vitro* et *in vivo*, favorisant l'activité ostéoclastique *in vivo*.

PARTIE V : Publications et communications scientifiques

Liste des publications

- Gibert B, **Eckel B**, Gonin V, Goldschneider D, Fombonne J, Deux B, Mehlen P, Arrigo AP, Clézardin P, Diaz-Latoud C. Targeting heat shock protein 27 (HspB1) interferes with bone metastasis and tumour formation *in vivo*. Br J Cancer. 2012 Jun 26;107(1):63-70.
- Gibert B, **Eckel B**, Fasquelle L, Moulin M, Bouhallier F, Gonin V, Mellier G, Simon S, Kretz-Remy C, Arrigo AP, Diaz-Latoud C. Knock down of heat shock protein 27 (HspB1) induces degradation of several putative client proteins. PLoS One. 2012;7(1):e29719.
- Dépôt de brevet par Inserm Transfert en cours :
Eckel B, Diaz C, Clézardin P. Methods and Pharmaceuticals Compositions for the Treatments of Bone Metastasis.

Liste des communications scientifiques orales

- **Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA)**, Lyon France (mars 2011).
V. Gonin, **B. Eckel**, C. Diaz, P. Clézardin. « Implication de la voie de signalisation Slit2/Robo1 dans les métastases osseuses du cancer du sein ». Poster.
- **Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA)**, Lyon France (mars 2012).
B. Eckel, L. Clément-Demange, D. Goehrig, C. Diaz-Latoud, P. Clézardin.
« Involvement of Robo1 and Robo4 proteins in Breast Cancer Bone Metastasis ». Poster.
- **Journée SFR des doctorants**, Lyon France (juin 2012).
B. Eckel, L. Clément-Demange, D. Goehrig, C. Diaz-Latoud, P. Clézardin.
« Involvement of Robo1 and Robo4 proteins in Breast Cancer Bone Metastasis ». Poster.
- **12th International Conference on Cancer-Induced Bone Disease (CIBD)**, Lyon France (novembre 2012).
B. Eckel, V. Gonin, L. Clément-Demange, D. Goehrig, C. Diaz-Latoud P. Clézardin.
« Involvement of the Robo 1 and 4 proteins in Breast Cancer Bone Metastasis ». Présentations orale et poster.

Bibliographie

- [1] Katherine N Weilbaecher, Theresa A Guise, and Laurie K McCauley, "Cancer to bone: a fatal attraction.," *Nat Rev Cancer*, vol. 11, no. 6, pp. 411-425, 2011.
- [2] Dionysios J Papachristou, Efthimia K Basdra, and Athanasios G Papavassiliou, "Bone metastases: molecular mechanisms and novel therapeutic interventions.," *Med Res Rev*, vol. 32, no. 3, pp. 611-636, 2012.
- [3] Don X Nguyen, Paula D Bos, and Joan Massagué, "Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization.," *Nat Rev Cancer*, vol. 9, no. 4, pp. 274-284, 2009.
- [4] Alain Chédotal, "Slits and their receptors.," *Adv Exp Med Biol*, vol. 621, pp. 65-80, 2007.
- [5] Athena R Ypsilanti, Yvrick Zagar, and Alain Chédotal, "Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo.," *Development*, vol. 137, no. 12, pp. 1939-1952, 2010.
- [6] Nehad M Alajez et al., "MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway.," *Cancer Res*, vol. 71, no. 6, pp. 2381-2391, 2011.
- [7] Mehmet Ender Avci, Ozlen Konu, and Tamer Yagci, "Quantification of SLIT-ROBO transcripts in hepatocellular carcinoma reveals two groups of genes with coordinate expression.," *BMC Cancer*, vol. 8, p. 392, 2008.
- [8] Anil Prasad, Aaron Z Fernandis, Yi Rao, and Ramesh K Ganju, "Slit protein-mediated inhibition of CXCR4-induced chemotactic and chemoinvasive signaling pathways in breast cancer cells.," *J Biol Chem*, vol. 279, no. 10, pp. 9115-9124, 2004.
- [9] Bu-Qing Ye, Zhen H Geng, Li Ma, and Jian-Guo Geng, "Slit2 regulates attractive eosinophil and repulsive neutrophil chemotaxis through differential srGAP1 expression during lung inflammation.," *J Immunol*, vol. 185, no. 10, pp. 6294-6305, 2010.
- [10] Russell S Taichman, "Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche.," *Blood*, vol. 105, no. 7, pp. 2631-2639, 2005.
- [11] R Barone, "Caractères généraux des os. En Anatomie comparée des mammifères domestiques," *Ostéologie*, vol. Tome 1, pp. 35-54, 1976.
- [12] J.L Chancrin, "Anatomie et Physiologie de l'os," *Encyclopédie Vétérinaire*, vol. Tome 4, p. 2800, 1992.
- [13] C Chenu, "Innervation de l'os," *Med.Sci.*, vol. 12, pp. 1276-1280, 2001.
- [14] T. Yoneda, "Arterial microvascularization and breast cancer colonization in bone.," *Histol Histopathol*, vol. 12, no. 4, pp. 1145-1149, 1997.
- [15] D. W. Sommerfeldt and C. T. Rubin, "Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton.," *Eur Spine J*, vol. 10 Suppl 2, pp. S86--S95, 2001.

- [16] Bart Clarke, "Normal bone anatomy and physiology.," *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 3 Suppl 3, pp. S131--S139, 2008.
- [17] PG Robey and AL Boskey, "Extracellular matrix and biomineralization of bone.," *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism 5th ed American Society of Bone and Mineral Research.*, pp. 38-46, 2003.
- [18] J. A. Buckwalter, M. J. Glimcher, R. R. Cooper, and R. Recker, "Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization.," *Instr Course Lect*, vol. 45, pp. 371-386, 1996.
- [19] R. Baron, L. Neff, P. Tran Van, J. R. Nefussi, and A. Vignery, "Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts.," *Am J Pathol*, vol. 122, no. 2, pp. 363-378, 1986.
- [20] J. Li et al., "RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 4, pp. 1566-1571, 2000.
- [21] Liesbeth Van Wesenbeeck et al., "The osteopetrotic mutation toothless (tl) is a loss-of-function frameshift mutation in the rat *Csf1* gene: Evidence of a crucial role for CSF-1 in osteoclastogenesis and endochondral ossification.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no. 22, pp. 14303-14308, 2002.
- [22] Yasuhiro Kobayashi, Nobuyuki Udagawa, and Naoyuki Takahashi, "Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis.," *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, vol. 19, no. 1, pp. 61-72, 2009.
- [23] W. S. Simonet et al., "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.," *Cell*, vol. 89, no. 2, pp. 309-319, 1997.
- [24] F. Patrick Ross and Steven L Teitelbaum, "alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology.," *Immunol Rev*, vol. 208, pp. 88-105, 2005.
- [25] Angela Bruzzaniti and Roland Baron, "Molecular regulation of osteoclast activity.," *Rev Endocr Metab Disord*, vol. 7, no. 1-2, pp. 123-139, 2006.
- [26] Jussi M Halleen, Sari L Tiitinen, Hannele Ylipahkala, Katja M Fagerlund, and H. Kalervo Väänänen, "Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption.," *Clin Lab*, vol. 52, no. 9-10, pp. 499-509, 2006.
- [27] M. F. Pittenger et al., "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.," *Science*, vol. 284, no. 5411, pp. 143-147, 1999.
- [28] Toshihisa Komori, "Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors.," *J Cell Biochem*, vol. 99, no. 5, pp. 1233-1239, 2006.
- [29] P.V.N. Bodine and B.S. Komm, "Wnt signaling and osteoblastogenesis," *Rev Endocr Metab Disord*, vol. 7, no. 1-2, pp. 33-39, 2006.
- [30] T. Katagiri and N. Takahashi, "Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation.," *Oral Dis*, vol. 8, no. 3, pp. 147-159, 2002.

- [31] Nadia Rucci, "Molecular biology of bone remodelling.," *Clin Cases Miner Bone Metab*, vol. 5, no. 1, pp. 49-56, 2008.
- [32] J. Ilvesaro, K. Metsikkö, K. Väänänen, and J. Tuukkanen, "Polarity of osteoblasts and osteoblast-like UMR-108 cells.," *J Bone Miner Res*, vol. 14, no. 8, pp. 1338-1344, 1999.
- [33] Toshihisa Komori, "Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development.," *J Cell Biochem*, vol. 87, no. 1, pp. 1-8, 2002.
- [34] Andrea Del Fattore, Anna Teti, and Nadia Rucci, "Bone cells and the mechanisms of bone remodelling.," *Front Biosci (Elite Ed)*, vol. 4, pp. 2302-2321, 2012.
- [35] A. Stevens and J. Lowe, "Musculoskeletal system," *Histology. Grower medical publishing*, pp. 226-248, 1992.
- [36] Brendon S Noble, "The osteocyte lineage.," *Arch Biochem Biophys*, vol. 473, no. 2, pp. 106-111, 2008.
- [37] Sara Temiyasathit and Christopher R Jacobs, "Osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction.," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1192, pp. 422-428, 2010.
- [38] Luis Cardoso et al., "Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue.," *J Bone Miner Res*, vol. 24, no. 4, pp. 597-605, 2009.
- [39] Jonathan Hoggatt and Louis M Pelus, "Mobilization of hematopoietic stem cells from the bone marrow niche to the blood compartment.," *Stem Cell Res Ther*, vol. 2, no. 2, pp. 13, 2011.
- [40] Ingrid G Winkler et al., "Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs.," *Blood*, vol. 116, no. 23, pp. 4815-4828, 2010.
- [41] Tatsuki Sugiyama and Takashi Nagasawa, "Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells.," *Inflamm Allergy Drug Targets*, vol. 11, no. 3, pp. 201-206, 2012.
- [42] Stephanie Smith-Berdan et al., "Robo4 cooperates with CXCR4 to specify hematopoietic stem cell localization to bone marrow niches.," *Cell Stem Cell*, vol. 8, no. 1, pp. 72-83, 2011.
- [43] Katja Brückner, "Blood cells need glia, too: a new role for the nervous system in the bone marrow niche.," *Cell Stem Cell*, vol. 9, no. 6, pp. 493-495, 2011.
- [44] Satoshi Yamazaki et al., "Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche.," *Cell*, vol. 147, no. 5, pp. 1146-1158, 2011.
- [45] Allison R Pettit, Ming K Chang, David A Hume, and Liza-Jane Raggatt, "Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics.," *Bone*, vol. 43, no. 6, pp. 976-982, 2008.
- [46] Chen Zhao et al., "Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis.," *Cell Metab*, vol. 4, no. 2, pp. 111-121, 2006.
- [47] Koichi Matsuo and Naoko Irie, "Osteoclast-osteoblast communication.," *Arch Biochem*

Biophys, vol. 473, no. 2, pp. 201-209, 2008.

- [48] Venkatesh Krishnan et al., "Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling.," *Mol Endocrinol*, vol. 17, no. 3, pp. 423-435, 2003.
- [49] John C Huang et al., "PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG.," *J Bone Miner Res*, vol. 19, no. 2, pp. 235-244, 2004.
- [50] Gerald J Atkins et al., "Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: evidence for autocrine and paracrine activities of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3.," *Bone*, vol. 40, no. 6, pp. 1517-1528, 2007.
- [51] Howard A Morris, Andrew G Turner, and Paul H Anderson, "Vitamin-D regulation of bone mineralization and remodelling during growth.," *Front Biosci (Elite Ed)*, vol. 4, pp. 677-689, 2012.
- [52] I. Couret, "Biologie du remodelage osseux," *Médecine nucléaire*, vol. vol 28, n°2, pp. 57-65, 2004.
- [53] Richard Eastell, "Role of oestrogen in the regulation of bone turnover at the menarche.," *J Endocrinol*, vol. 185, no. 2, pp. 223-234, 2005.
- [54] Gérard Karsenty and Mathieu Ferron, "The contribution of bone to whole-organism physiology.," *Nature*, vol. 481, no. 7381, pp. 314-320, 2012.
- [55] L. Burns et al., "UK Food Standards Agency Optimal Nutrition Status Workshop: environmental factors that affect bone health," *British journal of Nutrition*, vol. 89, pp. 835-840, 2003.
- [56] P. Ducy, R. Zhang, V. Geoffroy, A. L. Ridall, and G. Karsenty, "Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.," *Cell*, vol. 89, no. 5, pp. 747-754, 1997.
- [57] M. Centrella, T. L. McCarthy, and E. Canalis, "Transforming growth factor-beta and remodeling of bone.," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 73, no. 9, pp. 1418-1428, 1991.
- [58] Patricia Juárez and Theresa A Guise, "TGF- β in cancer and bone: implications for treatment of bone metastases.," *Bone*, vol. 48, no. 1, pp. 23-29, 2011.
- [59] S. C. Manolagas, "Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis.," *Endocr Rev*, vol. 21, no. 2, pp. 115-137, 2000.
- [60] P. J. Marie, "Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation.," *Gene*, vol. 316, pp. 23-32, 2003.
- [61] T. L. McCarthy, M. Centrella, and E. Canalis, "Effects of fibroblast growth factors on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in rat parietal bone cells.," *Endocrinology*, vol. 125, no. 4, pp. 2118-2126, 1989.
- [62] J. A. Greenwald et al., "In vivo modulation of FGF biological activity alters cranial suture fate.," *Am J Pathol*, vol. 158, no. 2, pp. 441-452, 2001.
- [63] Björn Behr et al., "Fgf-18 is required for osteogenesis but not angiogenesis during long

- bone repair.," *Tissue Eng Part A*, vol. 17, no. 15-16, pp. 2061-2069, 2011.
- [64] Toshio Matsumoto, Rika Kuriwaka-Kido, Takeshi Kondo, Itsuro Endo, and Shinsuke Kido, "Regulation of osteoblast differentiation by interleukin-11 via AP-1 and Smad signaling.," *Endocr J*, vol. 59, no. 2, pp. 91-101, 2012.
- [65] Hiroshi Takayanagi, "New immune connections in osteoclast formation.," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1192, pp. 117-123, 2010.
- [66] P. Ducy et al., "Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass.," *Cell*, vol. 100, no. 2, pp. 197-207, 2000.
- [67] Florent Elefteriou et al., "Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART.," *Nature*, vol. 434, no. 7032, pp. 514-520, 2005.
- [68] Gerard Karsenty and Franck Oury, "The central regulation of bone mass, the first link between bone remodeling and energy metabolism.," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 95, no. 11, pp. 4795-4801, 2010.
- [69] S Perrot, *Rhumatologie*, p16-17 Med-line, Ed.: Estem, 2002.
- [70] W. C. Peh, "Screening for bone metastases.," *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, vol. 29, no. 5, p. 405, 2000.
- [71] S. E. Downey et al., "Magnetic resonance imaging of bone metastases: a diagnostic and screening technique.," *Br J Surg*, vol. 84, no. 8, pp. 1093-1094, 1997.
- [72] E MONTAGNE, F HEITZ, D BUTHIAU, and F MEYER, *Imagerie médicale. Radiologie conventionnelle standard*, 3ème édition, Ed.: Heures de France, 2009.
- [73] P ANRACT and B Tomeno, "Démarche diagnostique devant une image osseuse d'allure tumorale," *Le journal français de l'orthopédie*, vol. MO n°136, 2004.
- [74] G. T. Krishnamurthy, M. Tubis, J. Hiss, and W. H. Blahd, "Distribution pattern of metastatic bone disease. A need for total body skeletal image.," *JAMA*, vol. 237, no. 23, pp. 2504-2506, 1977.
- [75] C Proust, J Proust, and A Maubon, "Imagerie des métastases osseuses.," *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, vol. vol 30-n°3, 2006.
- [76] H Demirdjian, "Les origines de l'IRM : la résonance magnétique nucléaire," *CultureSciencesChimie*, 2007.
- [77] Tomás Zelinka et al., "Role of positron emission tomography and bone scintigraphy in the evaluation of bone involvement in metastatic pheochromocytoma and paraganglioma: specific implications for succinate dehydrogenase enzyme subunit B gene mutations.," *Endocr Relat Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 311-323, 2008.
- [78] Tsuyoshi Hamaoka, John E Madewell, Donald A Podoloff, Gabriel N Hortobagyi, and Naoto T Ueno, "Bone imaging in metastatic breast cancer.," *J Clin Oncol*, vol. 22, no. 14, pp. 2942-2953, 2004.
- [79] R.E. Coleman, "Skeletal complications of malignancy. Proceedings of a symposium.," *Cancer*, vol. 80, pp. 1527-1701, 1997.

- [80] S. Paget, "The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889.," *Cancer Metastasis Rev*, vol. 8, no. 2, pp. 98-101, 1989.
- [81] Yunfei Zhang, Baoan Ma, and Qingyu Fan, "Mechanisms of breast cancer bone metastasis.," *Cancer Lett*, vol. 292, no. 1, pp. 1-7, 2010.
- [82] P. V. Hauschka, A. E. Mavrakos, M. D. Iafrafi, S. E. Doleman, and M. Klagsbrun, "Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose.," *J Biol Chem*, vol. 261, no. 27, pp. 12665-12674, 1986.
- [83] Paul J Kowalski, Mark A Rubin, and Celina G Kleer, "E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases.," *Breast Cancer Res*, vol. 5, no. 6, pp. R217--R222, 2003.
- [84] G. Berx and F. Van Roy, "The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression.," *Breast Cancer Res*, vol. 3, no. 5, pp. 289-293, 2001.
- [85] G. Mbalaviele et al., "E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastases in an experimental metastasis model.," *Cancer Res*, vol. 56, no. 17, pp. 4063-4070, 1996.
- [86] R. B. Hazan, G. R. Phillips, R. F. Qiao, L. Norton, and S. A. Aaronson, "Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis.," *J Cell Biol*, vol. 148, no. 4, pp. 779-790, 2000.
- [87] Carolyn M Feltes, Akira Kudo, Orest Blaschuk, and Stephen W Byers, "An alternatively spliced cadherin-11 enhances human breast cancer cell invasion.," *Cancer Res*, vol. 62, no. 22, pp. 6688-6697, 2002.
- [88] Khoi Chu et al., "Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone.," *Mol Cancer Res*, vol. 6, no. 8, pp. 1259-1267, 2008.
- [89] Lisa M Coussens, Barbara Fingleton, and Lynn M Matrisian, "Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations.," *Science*, vol. 295, no. 5564, pp. 2387-2392, 2002.
- [90] Ga-Eon Kim et al., "Stromal matrix metalloproteinase-14 expression correlates with the grade and biological behavior of mammary phyllodes tumors.," *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, vol. 20, no. 3, pp. 298-303, 2012.
- [91] Viola Vargová, Marek Pytliak, and Viola Mechírová, "Matrix metalloproteinases.," *EXS*, vol. 103, pp. 1-33, 2012.
- [92] A. J. Littlewood-Evans et al., "The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma.," *Cancer Res*, vol. 57, no. 23, pp. 5386-5390, 1997.
- [93] Jiahua Jiang et al., "BreastDefend™ prevents breast-to-lung cancer metastases in an orthotopic animal model of triple-negative human breast cancer.," *Oncol Rep*, 2012.
- [94] J. Chen, C. Baskerville, Q. Han, Z. K. Pan, and S. Huang, "Alpha(v) integrin, p38 mitogen-activated protein kinase, and urokinase plasminogen activator are functionally linked in invasive breast cancer cells.," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 51, pp. 47901-47905,

2001.

- [95] E. I. Deryugina, M. A. Bourdon, K. Jungwirth, J. W. Smith, and A. Y. Strongin, "Functional activation of integrin alpha V beta 3 in tumor cells expressing membrane-type 1 matrix metalloproteinase.," *Int J Cancer*, vol. 86, no. 1, pp. 15-23, 2000.
- [96] Abdullah Karadag, Kalu U E, Neal S Fedarko, and Larry W Fisher, "Bone sialoprotein, matrix metalloproteinase 2, and alpha(v)beta3 integrin in osteotropic cancer cell invasion.," *J Natl Cancer Inst*, vol. 96, no. 12, pp. 956-965, 2004.
- [97] P. Clézardin, "Physiopathologie des métastases osseuses," *oncologie*, vol. 11, pp. 10-15, 2009.
- [98] A. Müller et al., "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.," *Nature*, vol. 410, no. 6824, pp. 50-56, 2001.
- [99] E.K. Sloan and R.L. Anderson, "genes involved in breast cancer metastasis to bone," *cell.mol.lifeSci*, vol. 59, pp. 1491-1502, 2002.
- [100] Yibin Kang et al., "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone.," *Cancer Cell*, vol. 3, no. 6, pp. 537-549, 2003.
- [101] M.C. Smith et al., "CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer.," *Cancer Res*, vol. 64, no. 23, pp. 8604-8612, 2004.
- [102] Monica M Richert et al., "Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone.," *Oncol Rep*, vol. 21, no. 3, pp. 761-767, 2009.
- [103] D. Holstead Jones et al., "Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL.," *Nature*, vol. 440, no. 7084, pp. 692-696, 2006.
- [104] E. Terpos et al., "Autologous stem cell transplantation normalizes abnormal bone remodeling and sRANKL/osteoprotegerin ratio in patients with multiple myeloma.," *Leukemia*, vol. 18, no. 8, pp. 1420-1426, 2004.
- [105] Christine L Chaffer and Robert A Weinberg, "A perspective on cancer cell metastasis.," *Science*, vol. 331, no. 6024, pp. 1559-1564, 2011.
- [106] Vladislav V Glinsky et al., "Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium.," *Cancer Res*, vol. 63, no. 13, pp. 3805-3811, 2003.
- [107] Dorothy A Sipkins et al., "In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment.," *Nature*, vol. 435, no. 7044, pp. 969-973, 2005.
- [108] Shannon A Shulby, Nathan G Dolloff, Mark E Stearns, Olimpia Meucci, and Alessandro Fatatis, "CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells.," *Cancer Res*, vol. 64, no. 14, pp. 4693-4698, 2004.
- [109] Charles J Dimitroff et al., "Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells.," *Cancer Res*, vol. 65, no. 13, pp. 5750-5760, 2005.

- [110] Isabelle Pécheur et al., "Integrin alpha(v)beta3 expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone.," *FASEB J*, vol. 16, no. 10, pp. 1266-1268, 2002.
- [111] Chih-Fen Huang et al., "Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts.," *Cancer Res*, vol. 70, no. 11, pp. 4580-4589, 2010.
- [112] P. Clézardin, "Pourquoi certains cancers métastasent-ils préférentiellement à l'os ?," *Oncologie*, vol. 14, pp. 31-36, 2012.
- [113] K. S. Koeneman, F. Yeung, and L. W. Chung, "Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment.," *Prostate*, vol. 39, no. 4, pp. 246-261, 1999.
- [114] Joel Nelson, Anna Bagnato, Bruno Battistini, and Perry Nisen, "The endothelin axis: emerging role in cancer.," *Nat Rev Cancer*, vol. 3, no. 2, pp. 110-116, 2003.
- [115] Gregory A Clines et al., "Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation.," *Mol Endocrinol*, vol. 21, no. 2, pp. 486-498, 2007.
- [116] Joel B Nelson, "Endothelin inhibition: novel therapy for prostate cancer.," *J Urol*, vol. 170, no. 6 Pt 2, pp. S65--7; discussion S67-8, 2003.
- [117] Michael A Carducci et al., "Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial.," *J Clin Oncol*, vol. 21, no. 4, pp. 679-689, 2003.
- [118] M. Shioide and M. Noda, "Endothelin modulates osteopontin and osteocalcin messenger ribonucleic acid expression in rat osteoblastic osteosarcoma cells.," *J Cell Biochem*, vol. 53, no. 2, pp. 176-180, 1993.
- [119] J. W. Chiao et al., "Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption.," *Br J Cancer*, vol. 83, no. 3, pp. 360-365, 2000.
- [120] Shahrokh F Shariat et al., "Association of the circulating levels of the urokinase system of plasminogen activation with the presence of prostate cancer and invasion, progression, and metastasis.," *J Clin Oncol*, vol. 25, no. 4, pp. 349-355, 2007.
- [121] G. A. Clines and T. A. Guise, "Hypercalcaemia of malignancy and basic research on mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic metastasis to bone.," *Endocr Relat Cancer*, vol. 12, no. 3, pp. 549-583, 2005.
- [122] S. D. Cramer, Z. Chen, and D. M. Peehl, "Prostate specific antigen cleaves parathyroid hormone-related protein in the PTH-like domain: inactivation of PTHrP-stimulated cAMP accumulation in mouse osteoblasts.," *J Urol*, vol. 156, no. 2 Pt 1, pp. 526-531, 1996.
- [123] Masato Goya et al., "Prostate-specific antigen induces apoptosis of osteoclast precursors: potential role in osteoblastic bone metastases of prostate cancer.," *Prostate*, vol. 66, no. 15, pp. 1573-1584, 2006.
- [124] Hiroyuki Yonou et al., "Prostate-specific antigen stimulates osteoprotegerin production and inhibits receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human

- osteoblasts.," *Prostate*, vol. 67, no. 8, pp. 840-848, 2007.
- [125] Philippe Clezardin and Anna Teti, "Bone metastasis: pathogenesis and therapeutic implications.," *Clin Exp Metastasis*, vol. 24, no. 8, pp. 599-608, 2007.
- [126] Christopher J Logothetis and Sue-Hwa Lin, "Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone.," *Nat Rev Cancer*, vol. 5, no. 1, pp. 21-28, 2005.
- [127] Jinlu Dai et al., "Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism.," *Cancer Res*, vol. 65, no. 18, pp. 8274-8285, 2005.
- [128] Brian T Feeley et al., "Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions.," *Bone*, vol. 38, no. 2, pp. 154-166, 2006.
- [129] Hiroshi Masuda et al., "Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer.," *Prostate*, vol. 54, no. 4, pp. 268-274, 2003.
- [130] N. Jena, C. Martín-Seisdedos, P. McCue, and C. M. Croce, "BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye.," *Exp Cell Res*, vol. 230, no. 1, pp. 28-37, 1997.
- [131] Tzu-Hsiu Lai, Yi-Chin Fong, Wen-Mei Fu, Rong-Sen Yang, and Chih-Hsin Tang, "Osteoblasts-derived BMP-2 enhances the motility of prostate cancer cells via activation of integrins.," *Prostate*, vol. 68, no. 12, pp. 1341-1353, 2008.
- [132] Jillian Cornish et al., "Shared pathways of osteoblast mitogenesis induced by amylin, adrenomedullin, and IGF-1.," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 318, no. 1, pp. 240-246, 2004.
- [133] Bing Yi, Paul J Williams, Marie Niewolna, Yakun Wang, and Toshiyuki Yoneda, "Tumor-derived platelet-derived growth factor-BB plays a critical role in osteosclerotic bone metastasis in an animal model of human breast cancer.," *Cancer Res*, vol. 62, no. 3, pp. 917-923, 2002.
- [134] Yasuhide Kitagawa et al., "Vascular endothelial growth factor contributes to prostate cancer-mediated osteoblastic activity.," *Cancer Res*, vol. 65, no. 23, pp. 10921-10929, 2005.
- [135] L. M. McLatchie et al., "RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor.," *Nature*, vol. 393, no. 6683, pp. 333-339, 1998.
- [136] P. Rocchi et al., "Expression of adrenomedullin and peptide amidation activity in human prostate cancer and in human prostate cancer cell lines.," *Cancer Res*, vol. 61, no. 3, pp. 1196-1206, 2001.
- [137] Benjamin Uzan, Aude Villemin, Jean-Michel Garel, and Michèle Cressent, "Adrenomedullin is anti-apoptotic in osteoblasts through CGRP1 receptors and MEK-ERK pathway.," *J Cell Physiol*, vol. 215, no. 1, pp. 122-128, 2008.
- [138] A. Achbarou et al., "Urokinase overproduction results in increased skeletal metastasis by prostate cancer cells in vivo.," *Cancer Res*, vol. 54, no. 9, pp. 2372-2377, 1994.
- [139] Jinhui Liao, Abraham Schneider, Nabanita S Datta, and Laurie K McCauley, "Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis.,"

Cancer Res, vol. 66, no. 18, pp. 9065-9073, 2006.

- [140] Gregory R Mundy, "Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities.," *Nat Rev Cancer*, vol. 2, no. 8, pp. 584-593, 2002.
- [141] N. J. Bundred et al., "Parathyroid hormone related protein and skeletal morbidity in breast cancer.," *Eur J Cancer*, vol. 28, no. 2-3, pp. 690-692, 1992.
- [142] G. J. Powell et al., "Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites.," *Cancer Res*, vol. 51, no. 11, pp. 3059-3061, 1991.
- [143] Michael A Henderson et al., "Parathyroid hormone-related protein localization in breast cancers predict improved prognosis.," *Cancer Res*, vol. 66, no. 4, pp. 2250-2256, 2006.
- [144] J. J. Yin et al., "TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development.," *J Clin Invest*, vol. 103, no. 2, pp. 197-206, 1999.
- [145] J. H. Pollock, M. J. Blaha, S. A. Lavish, S. Stevenson, and E. M. Greenfield, "In vivo demonstration that parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein stimulate expression by osteoblasts of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor.," *J Bone Miner Res*, vol. 11, no. 6, pp. 754-759, 1996.
- [146] Tsuyoshi Shimo et al., "Pathogenic role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in osteolytic metastasis of breast cancer.," *J Bone Miner Res*, vol. 21, no. 7, pp. 1045-1059, 2006.
- [147] Tasnim Ara and Yves A Declerck, "Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression.," *Eur J Cancer*, vol. 46, no. 7, pp. 1223-1231, 2010.
- [148] Manali S Bendre et al., "Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease.," *Bone*, vol. 33, no. 1, pp. 28-37, 2003.
- [149] Manali Bendre, Dana Gaddy, Richard W Nicholas, and Larry J Suva, "Breast cancer metastasis to bone: it is not all about PTHrP.," *Clin Orthop Relat Res*, no. 415 Suppl, pp. S39--S45, 2003.
- [150] Balraj Singh, Jacob A Berry, Angela Shoher, and Anthony Lucci, "COX-2 induces IL-11 production in human breast cancer cells.," *J Surg Res*, vol. 131, no. 2, pp. 267-275, 2006.
- [151] C. Sotiriou et al., "Interleukins-6 and -11 expression in primary breast cancer and subsequent development of bone metastases.," *Cancer Lett*, vol. 169, no. 1, pp. 87-95, 2001.
- [152] Bae Keun Park et al., "NF-kappaB in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF.," *Nat Med*, vol. 13, no. 1, pp. 62-69, 2007.
- [153] Yi Lu et al., "Monocyte chemotactic protein-1 mediates prostate cancer-induced bone resorption.," *Cancer Res*, vol. 67, no. 8, pp. 3646-3653, 2007.

- [154] Toru Hiraga, Akira Myoui, Mary E Choi, Hideki Yoshikawa, and Toshiyuki Yoneda, "Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor-beta enhances bone metastases in breast cancer.," *Cancer Res*, vol. 66, no. 4, pp. 2067-2073, 2006.
- [155] B. Singh et al., "COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone.," *Oncogene*, vol. 26, no. 26, pp. 3789-3796, 2007.
- [156] Marion David et al., "Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts.," *PLoS One*, vol. 5, no. 3, p. e9741, 2010.
- [157] Ahmed Boucharaba et al., "Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer.," *J Clin Invest*, vol. 114, no. 12, pp. 1714-1725, 2004.
- [158] Ahmed Boucharaba et al., "The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no. 25, pp. 9643-9648, 2006.
- [159] Debbie Liao, Courtney Corle, Tiffany N Seagroves, and Randall S Johnson, "Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression.," *Cancer Res*, vol. 67, no. 2, pp. 563-572, 2007.
- [160] Chao Wan et al., "Role of HIF-1alpha in skeletal development.," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1192, pp. 322-326, 2010.
- [161] H. Zhong et al., "Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases.," *Cancer Res*, vol. 59, no. 22, pp. 5830-5835, 1999.
- [162] Toru Hiraga, Shinae Kizaka-Kondoh, Kiichi Hirota, Masahiro Hiraoka, and Toshiyuki Yoneda, "Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer.," *Cancer Res*, vol. 67, no. 9, pp. 4157-4163, 2007.
- [163] Lauren K Dunn et al., "Hypoxia and TGF-beta drive breast cancer bone metastases through parallel signaling pathways in tumor cells and the bone microenvironment.," *PLoS One*, vol. 4, no. 9, p. e6896, 2009.
- [164] Shu Takeda et al., "Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system.," *Cell*, vol. 111, no. 3, pp. 305-317, 2002.
- [165] Jennifer J Westendorf, Rachel A Kahler, and Tania M Schroeder, "Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases.," *Gene*, vol. 341, pp. 19-39, 2004.
- [166] Z. G. Li et al., "Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) mediates the prostate cancer-induced formation of new bone.," *Oncogene*, vol. 27, no. 5, pp. 596-603, 2008.
- [167] Ruth Schwaninger et al., "Lack of noggin expression by cancer cells is a determinant of the osteoblast response in bone metastases.," *Am J Pathol*, vol. 170, no. 1, pp. 160-175, 2007.
- [168] L. B. Zimmerman, J. M. De, and R. M. Harland, "The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4.," *Cell*, vol. 86, no. 4, pp. 599-606,

1996.

- [169] Jay Groppe et al., "Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin.," *Nature*, vol. 420, no. 6916, pp. 636-642, 2002.
- [170] Martine Deckers et al., "The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells.," *Cancer Res*, vol. 66, no. 4, pp. 2202-2209, 2006.
- [171] Delphine Javelaud et al., "Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis.," *Cancer Res*, vol. 67, no. 5, pp. 2317-2324, 2007.
- [172] Sandra Casimiro, Theresa A Guise, and John Chirgwin, "The critical role of the bone microenvironment in cancer metastases.," *Mol Cell Endocrinol*, vol. 310, no. 1-2, pp. 71-81, 2009.
- [173] Masato Goya et al., "Growth inhibition of human prostate cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice by a ligand-specific antibody to human insulin-like growth factors.," *Cancer Res*, vol. 64, no. 17, pp. 6252-6258, 2004.
- [174] J. L. Sanders et al., "Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines.," *Endocrinology*, vol. 141, no. 12, pp. 4357-4364, 2000.
- [175] R. Mentaverri et al., "The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis.," *FASEB J*, vol. 20, no. 14, pp. 2562-2564, 2006.
- [176] R. Mihai, J. Stevens, C. McKinney, and N. B N, "Expression of the calcium receptor in human breast cancer--a potential new marker predicting the risk of bone metastases.," *Eur J Surg Oncol*, vol. 32, no. 5, pp. 511-515, 2006.
- [177] Yu-Chi Chen, Donna M Sosnoski, and Andrea M Mastro, "Breast cancer metastasis to the bone: mechanisms of bone loss.," *Breast Cancer Res*, vol. 12, no. 6, p. 215, 2010.
- [178] Anke J Roelofs, Keith Thompson, Sharon Gordon, and Michael J Rogers, "Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status.," *Clin Cancer Res*, vol. 12, no. 20 Pt 2, pp. 6222s-6230s, 2006.
- [179] Robert E Coleman, "Bisphosphonates: clinical experience.," *Oncologist*, vol. 9 Suppl 4, pp. 14-27, 2004.
- [180] Philip Sambrook and Cyrus Cooper, "Osteoporosis.," *Lancet*, vol. 367, no. 9527, pp. 2010-2018, 2006.
- [181] J.K.L. Woodward, H.L. Neville-Webbe, R.E. Coleman, and I. Holen, "Combined effects of zoledronic acid and doxorubicin on breast cancer cell invasion in vitro.," *Anticancer Drugs*, vol. 16, no. 8, pp. 845-854, 2005.
- [182] Ian R Reid, "Osteonecrosis of the jaw: who gets it, and why?," *Bone*, vol. 44, no. 1, pp. 4-10, 2009.
- [183] Jean-Jacques Body et al., "A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone

- metastases from breast cancer.," *Clin Cancer Res*, vol. 12, no. 4, pp. 1221-1228, 2006.
- [184] Allan Lipton et al., "Randomized active-controlled phase II study of denosumab efficacy and safety in patients with breast cancer-related bone metastases.," *J Clin Oncol*, vol. 25, no. 28, pp. 4431-4437, 2007.
- [185] Jean-Jacques Body et al., "Effects of denosumab in patients with bone metastases with and without previous bisphosphonate exposure.," *J Bone Miner Res*, vol. 25, no. 3, pp. 440-446, 2010.
- [186] J.J Body et al., "Results of a prospective, randomized, double-blind, double-dummy, Phase 3 study comparing Denosumab with zoledronic acid for the treatment of breast cancer patients with bone metastases.," *Bone*, vol. 46, pp. 36-37, 2010.
- [187] B. Pennypacker et al., "Bone density, strength, and formation in adult cathepsin K (-/-) mice.," *Bone*, vol. 44, no. 2, pp. 199-207, 2009.
- [188] B.D. Gelb, J.P. Shi, H.A. Chapman, and R.J. Desnick, "Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency.," *Science*, vol. 273, pp. 1236-1238, 1996.
- [189] S. A. Stoch et al., "Effect of the cathepsin K inhibitor odanacatib on bone resorption biomarkers in healthy postmenopausal women: two double-blind, randomized, placebo-controlled phase I studies.," *Clin Pharmacol Ther*, vol. 86, no. 2, pp. 175-182, 2009.
- [190] Paul A Bromann, Hasan Korkaya, and Sara A Courtneidge, "The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases.," *Oncogene*, vol. 23, no. 48, pp. 7957-7968, 2004.
- [191] Donghui Zou et al., "Increased levels of active c-Src distinguish invasive from in situ lobular lesions.," *Breast Cancer Res*, vol. 11, no. 4, p. R45, 2009.
- [192] B. F. Boyce, T. Yoneda, C. Lowe, P. Soriano, and G. R. Mundy, "Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice.," *J Clin Invest*, vol. 90, no. 4, pp. 1622-1627, 1992.
- [193] Xiang H-F Zhang et al., "Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals.," *Cancer Cell*, vol. 16, no. 1, pp. 67-78, 2009.
- [194] Richard S Finn et al., "Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro.," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 105, no. 3, pp. 319-326, 2007.
- [195] Michael A Carducci and Antonio Jimeno, "Targeting bone metastasis in prostate cancer with endothelin receptor antagonists.," *Clin Cancer Res*, vol. 12, no. 20 Pt 2, pp. 6296s-6300s, 2006.
- [196] Michael A Carducci et al., "A phase 3 randomized controlled trial of the efficacy and safety of atrasentan in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer.," *Cancer*, vol. 110, no. 9, pp. 1959-1966, 2007.
- [197] N.D. James et al., "Safety and efficacy of the specific endothelin-A receptor antagonist ZD4054 in patients with hormone-resistant prostate cancer and bone metastases who were pain free or mildly symptomatic: A double-blind, placebo-controlled, randomized, phase 2 trial.," *Eur Urol*, vol. 55, pp. 1112-1123, 2009.

- [198] E. L. Hill, R. Turner, and R. Elde, "Effects of neonatal sympathectomy and capsaicin treatment on bone remodeling in rats.," *Neuroscience*, vol. 44, no. 3, pp. 747-755, 1991.
- [199] Lindsay Hinck, "The versatile roles of "axon guidance" cues in tissue morphogenesis.," *Dev Cell*, vol. 7, no. 6, pp. 783-793, 2004.
- [200] A. Togari, M. Mogi, M. Arai, S. Yamamoto, and Y. Koshihara, "Expression of mRNA for axon guidance molecules, such as semaphorin-III, netrins and neurotrophins, in human osteoblasts and osteoclasts.," *Brain Res*, vol. 878, no. 1-2, pp. 204-209, 2000.
- [201] Guillaume Delorme, Frederic Saltel, Edith Bonnelye, Pierre Jurdic, and Irma Machuca-Gayet, "Expression and function of semaphorin 7A in bone cells.," *Biol Cell*, vol. 97, no. 7, pp. 589-597, 2005.
- [202] Alun Hughes, Jennifer Kleine-Albers, Miep H Helfrich, Stuart H Ralston, and Michael J Rogers, "A class III semaphorin (Sema3e) inhibits mouse osteoblast migration and decreases osteoclast formation in vitro.," *Calcif Tissue Int*, vol. 90, no. 2, pp. 151-162, 2012.
- [203] Mikihiro Hayashi et al., "Osteoprotection by semaphorin 3A.," *Nature*, vol. 485, no. 7396, pp. 69-74, 2012.
- [204] Serena Zacchigna et al., "Bone marrow cells recruited through the neuropilin-1 receptor promote arterial formation at the sites of adult neoangiogenesis in mice.," *J Clin Invest*, vol. 118, no. 6, pp. 2062-2075, 2008.
- [205] M. A. Horstmann et al., "Frequent reduction or loss of DCC gene expression in human osteosarcoma.," *Br J Cancer*, vol. 75, no. 9, pp. 1309-1317, 1997.
- [206] Koichi Matsuo and Natsuko Otaki, "Bone cell interactions through Eph/ephrin: Bone modeling, remodeling and associated diseases.," *Cell Adh Migr*, vol. 6, no. 2, pp. 148-156, 2012.
- [207] Shaohong Cheng et al., "Targeted disruption of ephrin B1 in cells of myeloid lineage increases osteoclast differentiation and bone resorption in mice.," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e32887, 2012.
- [208] Hongli Sun, Kerong Dai, Tingting Tang, and Xiaoling Zhang, "Regulation of osteoblast differentiation by slit2 in osteoblastic cells.," *Cells Tissues Organs*, vol. 190, no. 2, pp. 69-80, 2009.
- [209] Stephanie Smith-Berdan, Koen Schepers, Alan Ly, Emmanuelle Passegué, and E. Camilla Forsberg, "Dynamic expression of the Robo ligand Slit2 in bone marrow cell populations.," *Cell Cycle*, vol. 11, no. 4, pp. 675-682, 2012.
- [210] Erhard Hohenester, "Structural insight into Slit-Robo signalling.," *Biochem Soc Trans*, vol. 36, no. Pt 2, pp. 251-256, 2008.
- [211] Cecile Morlot et al., "Structural insights into the Slit-Robo complex.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 38, pp. 14923-14928, 2007.
- [212] Lukasz Huminiecki, Michael Gorn, Steven Suchting, Richard Poulosom, and Roy Bicknell, "Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis.," *Genomics*, vol. 79,

no. 4, pp. 547-552, 2002.

- [213] Timothy A Evans and Greg J Bashaw, "Functional diversity of Robo receptor immunoglobulin domains promotes distinct axon guidance decisions.," *Curr Biol*, vol. 20, no. 6, pp. 567-572, 2010.
- [214] Barry J Dickson and Giorgio F Gilestro, "Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors.," *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 22, pp. 651-675, 2006.
- [215] Biao Wang et al., "Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity.," *Cancer Cell*, vol. 4, no. 1, pp. 19-29, 2003.
- [216] Bing Zhang et al., "Repulsive axon guidance molecule Slit3 is a novel angiogenic factor.," *Blood*, vol. 114, no. 19, pp. 4300-4309, 2009.
- [217] K. Brose et al., "Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance.," *Cell*, vol. 96, no. 6, pp. 795-806, 1999.
- [218] Elena Seiradake et al., "Structure and functional relevance of the Slit2 homodimerization domain.," *EMBO Rep*, vol. 10, no. 7, pp. 736-741, 2009.
- [219] Sadaf-Ahmahni Hussain et al., "A molecular mechanism for the heparan sulfate dependence of slit-robo signaling.," *J Biol Chem*, vol. 281, no. 51, pp. 39693-39698, 2006.
- [220] Bess Wayburn and Talila Volk, "LRT, a tendon-specific leucine-rich repeat protein, promotes muscle-tendon targeting through its interaction with Robo.," *Development*, vol. 136, no. 21, pp. 3607-3615, 2009.
- [221] Kazuko Fujisawa, Jeffrey L Wrana, and Joseph G Culotti, "The slit receptor EVA-1 coactivates a SAX-3/Robo mediated guidance signal in *C. elegans*.," *Science*, vol. 317, no. 5846, pp. 1934-1938, 2007.
- [222] Wang Zheng, An-Qi Geng, Peng-Fei Li, Yi Wang, and Xiao-Bing Yuan, "Robo4 Regulates the Radial Migration of Newborn Neurons in Developing Neocortex.," *Cereb Cortex*, 2011.
- [223] Kye Won Park et al., "Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration.," *Dev Biol*, vol. 261, no. 1, pp. 251-267, 2003.
- [224] E. Hohenester, S. Hussain, and J. A. Howitt, "Interaction of the guidance molecule Slit with cellular receptors.," *Biochem Soc Trans*, vol. 34, no. Pt 3, pp. 418-421, 2006.
- [225] Helen Sheldon et al., "Active involvement of Robo1 and Robo4 in filopodia formation and endothelial cell motility mediated via WASP and other actin nucleation-promoting factors.," *FASEB J*, vol. 23, no. 2, pp. 513-522, 2009.
- [226] Alexander W Koch et al., "Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B.," *Dev Cell*, vol. 20, no. 1, pp. 33-46, 2011.
- [227] Ashraf Dallol et al., "Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the *Drosophila* Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers.," *Oncogene*, vol. 21, no. 19, pp. 3020-3028, 2002.

- [228] A. Dallol, R.E. Dickinson, and F. Latif, "Epigenetic disruption of the Slit-Robo interactions in human cancer," *DNA Methylation, Epigenetics and Metastasis*, pp. 191-214, 2005.
- [229] Thomas L Dunwell et al., "Frequent epigenetic inactivation of the SLIT2 gene in chronic and acute lymphocytic leukemia.," *Epigenetics*, vol. 4, no. 4, pp. 265-269, 2009.
- [230] Ganesh V Samant et al., "Sox factors transcriptionally regulate ROBO4 gene expression in developing vasculature in zebrafish.," *J Biol Chem*, vol. 286, no. 35, pp. 30740-30747, 2011.
- [231] Laura Camurri et al., "Evidence for the existence of two Robo3 isoforms with divergent biochemical properties.," *Mol Cell Neurosci*, vol. 30, no. 4, pp. 485-493, 2005.
- [232] Ying Yue, Bärbel Grossmann, Danuta Galetzka, Ulrich Zechner, and Thomas Haaf, "Isolation and differential expression of two isoforms of the ROBO2/Robo2 axon guidance receptor gene in humans and mice.," *Genomics*, vol. 88, no. 6, pp. 772-778, 2006.
- [233] Eric M Small, Lillian B Sutherland, Kartik N Rajagopalan, Shusheng Wang, and Eric N Olson, "MicroRNA-218 regulates vascular patterning by modulation of Slit-Robo signaling.," *Circ Res*, vol. 107, no. 11, pp. 1336-1344, 2010.
- [234] Jun Tie et al., "MiR-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the Robo1 receptor.," *PLoS Genet*, vol. 6, no. 3, p. e1000879, 2010.
- [235] Motoaki Seki et al., "Human ROBO1 is cleaved by metalloproteinases and gamma-secretase and migrates to the nucleus in cancer cells.," *FEBS Lett*, vol. 584, no. 13, pp. 2909-2915, 2010.
- [236] Hope A Coleman, Juan-Pablo Labrador, Rebecca K Chance, and Greg J Bashaw, "The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline.," *Development*, vol. 137, no. 14, pp. 2417-2426, 2010.
- [237] K. T. Nguyen et al., "Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance.," *J Neurosci*, vol. 21, no. 12, pp. 4281-4289, 2001.
- [238] Junichi Yuasa-Kawada, Mariko Kinoshita-Kawada, Yi Rao, and Jane Y Wu, "Deubiquitinating enzyme USP33/VDU1 is required for Slit signaling in inhibiting breast cancer cell migration.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 34, pp. 14530-14535, 2009.
- [239] G. J. Bashaw, T. Kidd, D. Murray, T. Pawson, and C. S. Goodman, "Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor.," *Cell*, vol. 101, no. 7, pp. 703-715, 2000.
- [240] K. Wong et al., "Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway.," *Cell*, vol. 107, no. 2, pp. 209-221, 2001.
- [241] Hailan Hu et al., "Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse links the Roundabout receptor to Rac to regulate midline repulsion.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 12, pp. 4613-4618, 2005.

- [242] E. Stein and M. Tessier-Lavigne, "Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex.," *Science*, vol. 291, no. 5510, pp. 1928-1938, 2001.
- [243] Hua Long et al., "Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance.," *Neuron*, vol. 42, no. 2, pp. 213-223, 2004.
- [244] Christelle Sabatier et al., "The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons.," *Cell*, vol. 117, no. 2, pp. 157-169, 2004.
- [245] Zhe Chen, Bryan B Gore, Hua Long, Le Ma, and Marc Tessier-Lavigne, "Alternative splicing of the Robo3 axon guidance receptor governs the midline switch from attraction to repulsion.," *Neuron*, vol. 58, no. 3, pp. 325-332, 2008.
- [246] Peter Carmeliet and Marc Tessier-Lavigne, "Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring.," *Nature*, vol. 436, no. 7048, pp. 193-200, 2005.
- [247] Jennifer C Hocking, Carrie L Hehr, Gabriel E Bertolesi, Jane Y Wu, and Sarah McFarlane, "Distinct roles for Robo2 in the regulation of axon and dendrite growth by retinal ganglion cells.," *Mech Dev*, vol. 127, no. 1-2, pp. 36-48, 2010.
- [248] N. Shivapurkar et al., "Multiple regions of chromosome 4 demonstrating allelic losses in breast carcinomas.," *Cancer Res*, vol. 59, no. 15, pp. 3576-3580, 1999.
- [249] N. Shivapurkar et al., "Deletions of chromosome 4 at multiple sites are frequent in malignant mesothelioma and small cell lung carcinoma.," *Clin Cancer Res*, vol. 5, no. 1, pp. 17-23, 1999.
- [250] Ratnesh Kumar Singh et al., "Deletions in chromosome 4 differentially associated with the development of cervical cancer: evidence of slit2 as a candidate tumor suppressor gene.," *Hum Genet*, vol. 122, no. 1, pp. 71-81, 2007.
- [251] Ashraf Dallol et al., "Frequent epigenetic inactivation of the SLIT2 gene in gliomas.," *Oncogene*, vol. 22, no. 29, pp. 4611-4616, 2003.
- [252] Ashraf Dallol, Dion Morton, Eamonn R Maher, and Farida Latif, "SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells.," *Cancer Res*, vol. 63, no. 5, pp. 1054-1058, 2003.
- [253] R. E. Dickinson et al., "Epigenetic inactivation of SLIT3 and SLIT1 genes in human cancers.," *Br J Cancer*, vol. 91, no. 12, pp. 2071-2078, 2004.
- [254] Dana M Brantley-Sieders et al., "Angiocrine factors modulate tumor proliferation and motility through EphA2 repression of Slit2 tumor suppressor function in endothelium.," *Cancer Res*, vol. 71, no. 3, pp. 976-987, 2011.
- [255] Matthias Christgen et al., "Comprehensive genetic and functional characterization of IPH-926: a novel CDH1-null tumour cell line from human lobular breast cancer.," *J Pathol*, vol. 217, no. 5, pp. 620-632, 2009.
- [256] Alain Latil et al., "Gene expression profiling in clinically localized prostate cancer: a four-gene expression model predicts clinical behavior.," *Clin Cancer Res*, vol. 9, no. 15, pp. 5477-5485, 2003.

- [257] J. Xian et al., "Inadequate lung development and bronchial hyperplasia in mice with a targeted deletion in the *Dutt1/Robo1* gene.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 26, pp. 15062-15066, 2001.
- [258] Susmita Ghosh et al., "Alterations of *ROBO1/DUTT1* and *ROBO2* loci in early dysplastic lesions of head and neck: clinical and prognostic implications.," *Hum Genet*, vol. 125, no. 2, pp. 189-198, 2009.
- [259] Gopeshwar Narayan et al., "Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression.," *Mol Cancer*, vol. 5, p. 16, 2006.
- [260] S. Fulda and K-M. Debatin, "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy.," *Oncogene*, vol. 25, no. 34, pp. 4798-4811, 2006.
- [261] Céline Furne, Nicolas Rama, Véronique Corset, Alain Chédotal, and Patrick Mehlen, "Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 38, pp. 14465-14470, 2008.
- [262] Julien Fitamant et al., "Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 12, pp. 4850-4855, 2008.
- [263] Hector Macias et al., "SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number.," *Dev Cell*, vol. 20, no. 6, pp. 827-840, 2011.
- [264] Rebecca Marlow et al., "SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing *Sdf1/Cxcr4* within breast epithelium.," *Cancer Res*, vol. 68, no. 19, pp. 7819-7827, 2008.
- [265] Ruo-Chia Tseng et al., "SLIT2 attenuation during lung cancer progression deregulates beta-catenin and E-cadherin and associates with poor prognosis.," *Cancer Res*, vol. 70, no. 2, pp. 543-551, 2010.
- [266] Wei-Jie Zhou et al., "Slit-Robo signaling induces malignant transformation through Hakai-mediated E-cadherin degradation during colorectal epithelial cell carcinogenesis.," *Cell Res*, vol. 21, no. 4, pp. 609-626, 2011.
- [267] Jinseol Rhee, Tim Buchan, Lawrence Zukerberg, Jack Lilien, and Janne Balsamo, "Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription.," *Nat Cell Biol*, vol. 9, no. 8, pp. 883-892, 2007.
- [268] Karin Bauer, Albert Doweiko, A-K. Bosserhoff, T. E. Reichert, and Richard Bauer, "Slit-2 facilitates interaction of P-cadherin with Robo-3 and inhibits cell migration in an oral squamous cell carcinoma cell line.," *Carcinogenesis*, vol. 32, no. 6, pp. 935-943, 2011.
- [269] T. E. Werbowetski-Ogilvie et al., "Inhibition of medulloblastoma cell invasion by Slit.," *Oncogene*, vol. 25, no. 37, pp. 5103-5112, 2006.
- [270] Jia-Jean Yiin et al., "Slit2 inhibits glioma cell invasion in the brain by suppression of Cdc42 activity.," *Neuro Oncol*, vol. 11, no. 6, pp. 779-789, 2009.
- [271] D. Williams Parsons et al., "An integrated genomic analysis of human glioblastoma

- multiforme.," *Science*, vol. 321, no. 5897, pp. 1807-1812, 2008.
- [272] Maria Cristina Stella, Livio Trusolino, and Paolo M Comoglio, "The Slit/Robo system suppresses hepatocyte growth factor-dependent invasion and morphogenesis.," *Mol Biol Cell*, vol. 20, no. 2, pp. 642-657, 2009.
- [273] P. Raaj Khusial et al., "Src activates Abl to augment Robo1 expression in order to promote tumor cell migration.," *Oncotarget*, vol. 1, no. 3, pp. 198-209, 2010.
- [274] Dong Liu et al., "Neuronal chemorepellent Slit2 inhibits vascular smooth muscle cell migration by suppressing small GTPase Rac1 activation.," *Circ Res*, vol. 98, no. 4, pp. 480-489, 2006.
- [275] J. Y. Wu et al., "The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors.," *Nature*, vol. 410, no. 6831, pp. 948-952, 2001.
- [276] Soumitra Tole et al., "The axonal repellent, Slit2, inhibits directional migration of circulating neutrophils.," *J Leukoc Biol*, vol. 86, no. 6, pp. 1403-1415, 2009.
- [277] Hongbing Guan et al., "Neuronal repellent Slit2 inhibits dendritic cell migration and the development of immune responses.," *J Immunol*, vol. 171, no. 12, pp. 6519-6526, 2003.
- [278] Anil Prasad, Zahida Qamri, Jane Wu, and Ramesh K Ganju, "Slit-2/Robo-1 modulates the CXCL12/CXCR4-induced chemotaxis of T cells.," *J Leukoc Biol*, vol. 82, no. 3, pp. 465-476, 2007.
- [279] Ombretta Salvucci et al., "The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study.," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 97, no. 3, pp. 275-283, 2006.
- [280] M. A. Moore, "The role of chemoattraction in cancer metastases.," *Bioessays*, vol. 23, no. 8, pp. 674-676, 2001.
- [281] Bernd C Schmid et al., "The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells.," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 106, no. 3, pp. 333-342, 2007.
- [282] Michael Potente, Holger Gerhardt, and Peter Carmeliet, "Basic and therapeutic aspects of angiogenesis.," *Cell*, vol. 146, no. 6, pp. 873-887, 2011.
- [283] Christopher A Jones et al., "Slit2-Robo4 signalling promotes vascular stability by blocking Arf6 activity.," *Nat Cell Biol*, vol. 11, no. 11, pp. 1325-1331, 2009.
- [284] Rebecca Marlow et al., "Vascular Robo4 restricts proangiogenic VEGF signaling in breast.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 23, pp. 10520-10525, 2010.
- [285] Sukhbir Kaur et al., "Robo4 signaling in endothelial cells implies attraction guidance mechanisms.," *J Biol Chem*, vol. 281, no. 16, pp. 11347-11356, 2006.
- [286] Lisette M Acevedo, Sara M Weis, and David A Cheresh, "Robo4 counteracts VEGF signaling.," *Nat Med*, vol. 14, no. 4, pp. 372-373, 2008.
- [287] M. Mura et al., "Identification and angiogenic role of the novel tumor endothelial marker CLEC14A.," *Oncogene*, vol. 31, no. 3, pp. 293-305, 2012.

- [288] Robert S Kerbel, "Tumor angiogenesis.," *N Engl J Med*, vol. 358, no. 19, pp. 2039-2049, 2008.
- [289] Charlene M Dunaway et al., "Cooperative signaling between Slit2 and Ephrin-A1 regulates a balance between angiogenesis and angiostasis.," *Mol Cell Biol*, vol. 31, no. 3, pp. 404-416, 2011.
- [290] Robert Coleman, Michael Gnant, Gareth Morgan, and Philippe Clezardin, "Effects of bone-targeted agents on cancer progression and mortality.," *J Natl Cancer Inst*, vol. 104, no. 14, pp. 1059-1067, 2012.
- [291] A. Bellahcène et al., "Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells.," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 101, no. 2, pp. 135-148, 2007.
- [292] Teresa Garcia et al., "A convenient clinically relevant model of human breast cancer bone metastasis.," *Clin Exp Metastasis*, vol. 25, no. 1, pp. 33-42, 2008.
- [293] Soraya Sin et al., "Role of the focal adhesion protein kindlin-1 in breast cancer growth and lung metastasis.," *J Natl Cancer Inst*, vol. 103, no. 17, pp. 1323-1337, 2011.
- [294] Patrick Mehlen, Céline Delloye-Bourgeois, and Alain Chédotal, "Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets?," *Nat Rev Cancer*, vol. 11, no. 3, pp. 188-197, 2011.
- [295] Rachel E Dickinson and W. Colin Duncan, "The SLIT-ROBO pathway: a regulator of cell function with implications for the reproductive system.," *Reproduction*, vol. 139, no. 4, pp. 697-704, 2010.
- [296] J. Yu et al., "The neuronal repellent SLIT2 is a target for repression by EZH2 in prostate cancer.," *Oncogene*, vol. 29, no. 39, pp. 5370-5380, 2010.
- [297] Anil Prasad, Vikram Paruchuri, Anju Preet, Farida Latif, and Ramesh K Ganju, "Slit-2 induces a tumor-suppressive effect by regulating beta-catenin in breast cancer cells.," *J Biol Chem*, vol. 283, no. 39, pp. 26624-26633, 2008.
- [298] Po-Hao Chang et al., "Activation of Robo1 Signaling of Breast Cancer Cells by Slit2 from Stromal Fibroblast Restrains Tumorigenesis via Blocking PI3K/Akt/ β -Catenin Pathway.," *Cancer Res*, vol. 72, no. 18, pp. 4652-4661, 2012.
- [299] Olivier Peyruchaud, Claire-Marie Serre, Roisin NicAmhlaoibh, Pierrick Fournier, and Philippe Clezardin, "Angiostatin inhibits bone metastasis formation in nude mice through a direct anti-osteoclastic activity.," *J Biol Chem*, vol. 278, no. 46, pp. 45826-45832, 2003.
- [300] Jeroen T Buijs et al., "Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment of bone metastases from breast cancer.," *Cancer Res*, vol. 67, no. 18, pp. 8742-8751, 2007.
- [301] Anaïs Fradet et al., "Dual function of $ERR\alpha$ in breast cancer and bone metastasis formation: implication of VEGF and osteoprotegerin.," *Cancer Res*, vol. 71, no. 17, pp. 5728-5738, 2011.
- [302] A. Berthier et al., "High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer.," *Br J Cancer*, vol. 102, no. 6, pp.

1024-1031, 2010.

- [303] Kai Kessenbrock, Vicki Plaks, and Zena Werb, "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment.," *Cell*, vol. 141, pp. 52-67, 2010.
- [304] Lieve Coenegrachts et al., "Anti-placental growth factor reduces bone metastasis by blocking tumor cell engraftment and osteoclast differentiation.," *Cancer Res*, vol. 70, no. 16, pp. 6537-6547, 2010.
- [305] A. Ahluwalia and A. S. Tarnawski, "Critical role of hypoxia sensor--HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing.," *Curr Med Chem*, vol. 19, no. 1, pp. 90-97, 2012.
- [306] Xin Lu et al., "In vivo dynamics and distinct functions of hypoxia in primary tumor growth and organotropic metastasis of breast cancer.," *Cancer Res*, vol. 70, no. 10, pp. 3905-3914, 2010.
- [307] Cai Feng Dai et al., "Expression and roles of Slit/Robo in human ovarian cancer.," *Histochem Cell Biol*, vol. 135, no. 5, pp. 475-485, 2011.
- [308] Víctor Borrell et al., "Slit/Robo signaling modulates the proliferation of central nervous system progenitors.," *Neuron*, vol. 76, no. 2, pp. 338-352, 2012.
- [309] Nilay Sethi, Xudong Dai, Christopher G Winter, and Yibin Kang, "Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells.," *Cancer Cell*, vol. 19, no. 2, pp. 192-205, 2011.
- [310] Luis R Hernández-Miranda et al., "Robo1 regulates semaphorin signaling to guide the migration of cortical interneurons through the ventral forebrain.," *J Neurosci*, vol. 31, no. 16, pp. 6174-6187, 2011.
- [311] Hong-Qing Xi, Xiao-Song Wu, Bo Wei, and Lin Chen, "Eph receptors and ephrins as targets for cancer therapy.," *J Cell Mol Med*, 2012.
- [312] Akio Shimizu et al., "Netrin-1 Promotes Glioblastoma Cell Invasiveness and Angiogenesis by Multiple Pathways Involving Activation of RhoA, Cathepsin B and CREB.," *J Biol Chem*, 2012.
- [313] Michael Rehman and Luca Tamagnone, "Semaphorins in cancer: Biological mechanisms and therapeutic approaches.," *Semin Cell Dev Biol*, 2012.
- [314] Paul Krimpenfort et al., "Deleted in colorectal carcinoma suppresses metastasis in p53-deficient mammary tumours.," *Nature*, vol. 482, no. 7386, pp. 538-541, 2012.
- [315] Andrew A Jarjour et al., "Autocrine netrin function inhibits glioma cell motility and promotes focal adhesion formation.," *PLoS One*, vol. 6, no. 9, p. e25408, 2011.

Résumé

Etude du rôle des récepteurs de guidage axonal Robo1 et Robo4 dans la formation et le développement des métastases osseuses

Les métastases osseuses sont des complications fréquentes de nombreuses tumeurs solides et sont responsables, sur le plan clinique, de fractures osseuses, d'hypercalcémie et de douleurs. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif ; la compréhension des mécanismes impliqués dans la formation et le développement des métastases osseuses est donc nécessaire afin d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques.

Une analyse transcriptomique comparative entre une lignée humaine de cancer du sein, les MDA-MB-231, et leur sous-population ostéotrope, les B02, a montré une surexpression de composants de la voie de signalisation Slit/Robo.

Les récepteurs Robo et leurs ligands Slits, initialement identifiés comme facteurs clés du guidage axonal lors du développement, sont également impliqués dans la migration des cellules cancéreuses.

Afin d'étudier le rôle de ces récepteurs Robo1 et 4 dans la dissémination métastatique à l'os, nous avons inhibé l'expression de ces gènes dans les cellules B02. Des expériences *in vitro* et *in vivo* montrent alors un rôle antagoniste de Robo1/4. En effet, l'inhibition de Robo1 augmente la croissance des tumeurs primaires, tandis que celle de Robo4 la diminue. Ces récepteurs régulent également différemment la formation de lésions ostéolytiques ainsi que la croissance tumorale de ces métastases. *In vitro*, l'absence de Robo1 augmente l'invasion, tandis que celle de Robo4 la diminue. Nous avons également montré que l'inhibition de Robo4 ralentit la colonisation de la moelle osseuse par les cellules B02 à des temps précoces. Enfin, l'étude d'une cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein montre une corrélation entre l'expression de Robo4 et la rechute métastatique osseuse.

Cette étude montre l'implication de la voie Slit/Robo dans la dissémination métastatique à l'os, et semble par conséquent constituer une approche thérapeutique judicieuse pour traiter ces métastases.

Mots clés : cancer du sein, métastases osseuses, Robo1/4, Slit2, invasion.

Abstract

Study of the role of axon guidance receptors Robo1 and Robo4 in the formation and development of bone metastases

Bone metastases are a common complication of many solid tumors and are clinically responsible of bone fractures, hypercalcemia, and pain. Currently, there is no curative treatment; understanding the mechanisms involved in the formation and development of bone metastases is therefore necessary to consider new therapeutic approaches.

A comparative transcriptomic analysis between the human breast cancer cell line MDA-MB-231, and its osteotropic subpopulation, B02, has shown an up-regulation of Slit/Robo signaling pathway.

Robo receptors and their ligands Slits were initially identified as key factors in axon guidance during development. However, these proteins are also involved in the migration of cancer cells.

To investigate the role of these receptors Robo1 and 4 in breast cancer bone metastasis, the expression of these genes was inhibited in B02 cells. *In vitro* and *in vivo* experiments point out antagonistic role of Robo1/4. Indeed, inhibition of Robo1 expression increases primary tumors growth, while Robo4 inactivation reduces it. These receptors also differently regulate the formation of osteolytic lesions and extent of skeletal tumor burden. *In vitro*, Robo1 depletion induces an increased invasion, whereas Robo4 depletion decreases it. We also showed that inhibition of Robo4 reduces survival and growth of B02 cells in the bone marrow at early times of invasion. Finally, a cohort study of breast cancer patients shows a strong correlation between Robo4 expression and metastatic relapse in bone.

This study shows the involvement of the Slit/Robo pathway in bone metastasis, and therefore seems to be a judicious therapeutic approach to treat these metastases.

Keywords: breast cancer, bone metastases, Robo1/4, Slit2, invasion