N°d'ordre NNT : 2017LYSE1269

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED 340
BIOLOGIE MOLECULAIRE INTEGRATIVE ET CELLULAIRE

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie
Discipline : Cancérologie

Soutenue publiquement le 5 décembre 2017, par :
François LE PAPE

ROBO4 dans les cellules métastatiques du cancer du sein : Identification et caractérisation fonctionnelle d'isoformes protéiques

---

Directrice de thèse : Dr. DIAZ Chantal

Devant le jury composé du :

Pr. VALCOURT Ulrich	Université Claude Bernard Lyon1	Président du jury
Dr. BLIN Claudine	Université de Nice Sophia Antipolis	Rapporteur
Pr. HEYMANN Dominique	Université de Nantes	Rapporteur
Pr. BERNET Agnès	Université Claude Bernard Lyon 1	Examinatrice
Dr. CLEZARDIN Philippe	Université Claude Bernard Lyon 1	Directeur de l'UMR 1033

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

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

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

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

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adresse à ma directrice de thèse, le Dr. DIAZ Chantal. Merci pour la confiance que tu m'as accordée. Tes conseils et ton optimisme sans faille m'ont permis de gérer au mieux cette thèse.

Je remercie également le Dr. CLEZARDIN Philippe pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse sous les meilleures conditions.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr. BLIN Claudine ainsi qu'au Pr. HEYMANN Dominique pour avoir accepté de consacrer un temps précieux à la lecture de mon manuscrit ainsi que pour leurs critiques constructives à son sujet.

Je remercie également le Pr. BERNET Agnès pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse ainsi qu'au Pr. VALCOURT Ulrich, pour avoir accepté de présider mon jury ainsi que pour ses nombreux conseils lors de mes comités de suivi de thèse. Mes remerciements s'adressent également au Pr. MALAVAL Luc pour l'intérêt et les conseils prodigués durant le suivi de mon travail.

Je tiens à remercier Lise Clément-demange avec qui j'ai partagé ce projet et maintenant une amitié. Merci pour ta patience, ta pédagogie et ton soutien. Tu as incontestablement participé à mon évolution scientifique dans le laboratoire.

Je remercie ma stagiaire maladroite Margaux Bernard qui va reprendre le flambeau ! Elle a tout cassé dans le labo, sauf mon moral… merci pour ton soutien.

Je tiens également à remercier Martine Croset, tu as été un pilier pour moi dans ce laboratoire tant humainement que scientifiquement. Je n'oublierai jamais toute l'aide que tu as pu m'apporter.

Je remercie Geoffrey Vargas de m'avoir supporté moi et mon mauvais caractère aussi longtemps (6ans), soutenu et encouragé dans les moments difficiles (surtout sur la fin de la rédaction de thèse) et d'avoir partagé les hauts et les bas du quotidien, ses blagues et sa bonne humeur.

Je remercie toutes les personnes de l'unité U1033 avec qui j'ai partagé ces quelques années. Christine pour ta gentillesse et ton efficacité….et pour le nombre incalculable de café que tu as pu préparer. Lamia et Sandra pour votre bonne humeur, votre

disponibilité et votre soutien. Sofia pour les nombreux conseils et les moments partagés mais aussi Paola, Sacha et Léa pour nos nombreuses discussions. Je remercie Edith, Caroline, Irma et Olivier pour leur aide et conseils et je n'oublie pas l'ensemble du 6ème étage qui a largement participé à l'ambiance du laboratoire.

Je tiens à remercier la Team de l'hôpital notamment Evelyne, merci pour ton aide ton soutien et ton expertise en gel deux dimensions, Marjorie, Olivier et jean Charles qui ont su partager leur bonne humeur. Je remercie également les deux rhumatologues qui ont fait un séjour dans l'unité. Merci Elodie pour toutes ces discussions, conseils et soutien à une époque où je faisais encore du sport… Merci Marie-Eva pour ton amitié, ta disponibilité et tous ces footings que nous avons partagés.

Je remercie également les personnes avec qui j'ai partagé mes débuts dans le laboratoire, Sophie et Raphael le couple du laboratoire mariés et parents, Manon qui en terme de blague n'était pas en reste mais également Johnny, Mathilde, Casina, Debashish, Marie-Claude et de manière générale toutes les personnes de l'unité avec qui j'ai pu échanger et discuter.

Je remercie également mes amis, sans qui ces trois années n'auraient pas été les mêmes.

Margaux, Florian, Sarah, Christophe et Marlène…Merci pour tous les moments que nous avons partagés et que nous partagerons encore autour d'un bon repas (avec la petite Adèle)….sur des pistes de ski, ou dans un bar…et « peut être » un jour chez moi.

Guillaume et Jeremy, merci pour votre soutien, votre aide ainsi que pour ces nombreuses soirées où vous m'avez grassement nourri même quand j'arrivais les mains vides.

Camille, c'est avec toi que j'ai commencé cette aventure à l'université et même si tu es loin nous l'avons terminée ensemble….merci pour ton soutien….ta bonne humeur et tes blagues dont je ne me lasserai jamais.

Manon, merci pour ton soutien et tous ces moments que nous avons partagés….depuis le lycée.

Anthony, merci d'avoir toujours été présent, pour nos discussions et pour tous les moments que nous avons partagés depuis que nous sommes gamins…

A mes parents qui m'ont poussé à passer le bac… merci pour vos sacrifices, à mes frères et sœurs (ils sont nombreux) pour votre soutien constant.

A ma tante Mireille et ma petite filleule Céléna, merci d'avoir toujours cru en moi, pour votre soutien et pour les nombres incalculables de « bonnes bouffes » que nous avons partagées ensemble. Vous êtes des piliers dans ma vie, je ne vous remercierais jamais assez pour ça.

A ma tante Annie, mon cousin, ma cousine merci pour votre constance, votre bienveillance et votre soutien indéfectible.

A ma Grand-mère, cette thèse je te la dois. Merci d'avoir été là au moment où j'en avais le plus besoin, de m'avoir soutenu, guidé et d'avoir toujours cru en moi… tu as amorcé la vie que je mène actuellement et je t'en serai éternellement reconnaissant.

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

Résumé

ROBO4 dans les cellules métastatiques du cancer du sein :
Identification et caractérisation fonctionnelle d'isoformes protéiques

Les métastases osseuses sont des complications fréquentes de nombreux cancers tels que le cancer du poumon, de la prostate et du sein. Chez la femme, 70% des patientes présentant un cancer du sein avancé développent des métastases qualifiées d'ostéolytiques. Le développement de ce type de métastases entraine la destruction massive de l'os causant chez les patientes des fractures pathologiques. Les traitements actuellement dispensés en clinique tels que les bisphosphonates et le dénosumab (anti-RANKL) ne sont pas curatifs mais seulement palliatifs. Pour cette raison, notre laboratoire s'intéresse particulièrement aux évènements moléculaires et cellulaires précoces aboutissant à l'émergence de métastases osseuses. Les récepteurs Roundabout (ROBO) ont été initialement décrits comme des régulateurs cruciaux de la migration neuronale et vasculaire lors du développement. ROBO4 est le dernier récepteur décrit et diverge des autres récepteurs ROBO, notamment par son expression spécifique et limitée aux cellules endothéliales et hématopoïétiques. Toutefois, lors d'une analyse transcriptomique comparative, le récepteur ROBO4 a été retrouvé sur-exprimé dans la lignée tumorale ostéotropique MDA-B02. Les récentes expériences, réalisées par notre équipe, visant à inhiber l'activité du récepteur ROBO4, nous ont permis de considérer ce récepteur comme un médiateur de l'ancrage à l'os des cellules tumorales MDA-B02. En effet, L'utilisation d'un anticorps anti-ROBO4 réduit considérablement l'adhérence des cellules MDA-B02 sur les cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 *in vitro* et l'ancrage à l'os *in vivo*. La sur-expression de ROBO4 dans le modèle cellulaire de cancer du sein murin 4T1 nous a conduit à mettre en évidence l'existence de deux formes de la protéine ROBO4 possédant des propriétés métastatiques potentiellement antagonistes : (i) une forme glycosylée détectée exclusivement dans les cellules endothéliales et (ii) une forme alternative non glycosylée « agressive » présente en forte quantité dans les cellules tumorales MDA-B02. L'identification de ces variants protéiques du récepteur ROBO4 aux propriétés fonctionnelles et structurales différentes nous a permis d'envisager de nouvelles pistes dans le décryptage des fonctions de ROBO4 dans le processus tumoral et pourrait conduire à la mise au point de thérapies innovantes pour empêcher la formation de métastases dans la moelle osseuse.

Abstract

ROBO4 in metastatic breast cancer cells:
Identification and functional characterization of protein isoforms

Bone metastases are frequent complications of many cancers such as lung, prostate and breast cancer. In women, 70% of patients with advanced breast cancer develop metastases known as osteolytic. The development of this type of metastasis leads to the mass destruction of bone causing pathological fractures in patients. Current clinical treatments such as bisphosphonates and denosumab (anti-RANKL) only slow down the progression of the disease. For this reason, our laboratory is particularly interested in early molecular and cellular events leading to the emergence of bone metastases. Roundabout receptors (ROBO) were initially described as crucial regulators of neuronal and vascular migration during development. ROBO4 is the last receptor described and diverges from other ROBO receptors, in particular by its specific expression limited to endothelial and hematopoietic cells. However, in a comparative transcriptomic analysis, the ROBO4 receptor was found to be overexpressed in the MDA-B02 osteotropic tumor cell line. Recent experiments carried out by our team, aiming at inhibiting the activity of the ROBO4 receptor, allowed us to consider the ROBO4 receptor as a mediator of MDA-B02 tumor cells anchorage to the bone. Indeed, the use of an anti-ROBO4 antibody considerably reduces the adhesion of the MDA-B02 cells to the MC3T3-E1 osteoblastic cells *in vitro* and the anchoring to the bone *in vivo*. The over-expression of ROBO4 in the 4T1 murine breast cancer cell model led us to highlight the existence of two forms of ROBO4 protein with potentially antagonistic metastatic properties: (i) a glycosylated form detected exclusively in endothelial cells and (ii) an "aggressive" non-glycosylated alternative form present in large amounts in MDA-B02 tumor cells. The identification of these protein variants of the ROBO4 receptor with different functional and structural properties has allowed us to consider new oportunities of decrypting the functions of ROBO4 in the tumor process and could lead to the development of innovative therapies to prevent formation of metastases in the bone marrow.

Sommaire

Remerciements 3
Résumé 6
Abstract 7
Sommaire 8
Liste des tableaux 12
Liste des illustrations 13
Liste des abréviations 15
A. Préface 18
B. Etat de l'art 22
I. Biologie du tissu osseux 23
1. GENERALITES 23
2. ARCHITECTURE MACROSCOPIQUE 23
3. ARCHITECTURE MICROSCOPIQUE 24
3.1. Composantes organiques 24
3.2. Composantes minérales 24
4. COMPOSITION CELLULAIRE DU TISSU OSSEUX 25
4.1. Les ostéoclastes 25
4.1.1. Différenciation des ostéoclastes 25
4.1.2. Dégradation de la matrice osseuse 26
4.2. Les ostéoblastes 27
4.2.1. Différenciation des ostéoblastes 27
4.2.2. Production de la matrice osseuse 29
4.3. Les ostéocytes 30
5. NICHES HEMATOPOÏETIQUES 30
5.1. Les cellules souches hématopoïétiques 30
5.2. Concept de «niche hématopoïétique» 32
5.3. Niche endostéale 33
5.4. Niche vasculaire et périvasculaire 34
6. MECANISME DU REMODELAGE OSSEUX 35

6.1. Processus général 35
6.2. Régulation du remodelage osseux 36
6.2.1. Facteurs systémiques 37
6.2.2. Facteurs locaux 38
6.2.3. Système RANK/RANKL/OPG 39
6.2.4. Régulation médiée par des molécules de guidage axonal 39
II. Métastases osseuses du cancer du sein 40
1. CANCER DU SEIN 40
2. PROCESSUS METASTATIQUE 41
2.1. Transition épithélio-mésenchymateuse et invasion locale (EMT) 42
2.2. Intravasation : Cellules tumorales circulantes (CTCs) 43
2.3. Extravasation et invasion : Cellules tumorales disséminées (DTCs) 44
3. DISSEMINATION METASTATIQUE OSSEUSE 45
3.1. Niche pré-métastatique 46
3.2. Migration des cellules tumorales vers le tissu osseux 47
3.3. Nidation des cellules tumorales dans la moelle osseuse 48
3.4. ostéomimétisme et dormance 49
4. FORMATION DES METASTASES OSTEOLYTIQUES 51
4.1. Activation de la résorption osseuse 53
4.2. Inhibition de la formation osseuse 55
4.3. Contribution du tissu osseux 56
5. TRAITEMENTS DES METASTASES OSSEUSES 58
5.1. Thérapies actuelles 58
5.2. Thérapies émergentes 59
5.2.1. Traitement ciblant les ostéoclastes 59
5.2.2. Traitement ciblant les ostéoblastes 60
5.2.3. Traitement ciblant l'environnement osseux 61
III. Les récepteurs de guidage axonal Roundabout 62
1. LES RECEPTEURS ROBO ET LES LIGANDS SLIT 64
1.1. Structure 64
1.2. Interaction ligand/récepteur 65
1.2.1. Liaison SLIT/ROBO 65

1.2.2. Dimérisation des récepteurs ROBO 66
1.2.3. Cas particulier du récepteur ROBO4 66
2. REGULATION DES PROTEINES ROBO ET SLIT 67
2.1. Régulation épigénétique 67
2.1.1. Méthylation des promoteurs 67
2.1.2. Régulation par les miRNA 68
2.2. Régulation transcriptionnelle 69
2.2.1. Régions promotrices 69
2.2.2. Epissage alternatif 70
2.3. Modification post-traductionnelle 71
2.3.1. Clivage 71
2.3.2. Glycosylation 73
2.3.3. Déubiquitinylation par USP33 73
3. FONCTION ET SIGNALISATION DES RECEPTEURS ROBO 74
3.1. Contrôle de la migration axonale 74
3.2. Contrôle de la migration vasculaire 76
3.2.1. Migration des cellules endothéliales 77
3.2.2. Inhibition de l'angiogenèse et stabilisation de la vasculature 77
3.3. Physiologie des cellules souches hématopoïétiques 79
4. LES RECEPTEURS ROBO DANS LA PROGRESSION TUMORALE 80
4.1. Dérégulation génétique 80
4.2. Implication dans la tumorigenèse et la formation de métastases 81
4.2.1. Prolifération et survie des cellules tumorales 81
4.2.2. Transition épithélio-mésenchymateuse 82
4.2.3. Migration et chimiotactisme 84
4.2.4. Angiogenèse tumorale 85
C. Travail expérimental 88
I. Introduction et hypothèse de travail 89
II. Matériels et méthodes 93
1. BIOLOGIE MOLECULAIRE 93
2. BIOLOGIE CELLULAIRE 97

3. EXPERIMENTATION ANIMALE 100
III. Résultats 101
1. SUR-EXPRESSION DU GENE *ROBO4* HUMAIN DANS LE MODELE MURIN DE METASTASES OSSEUSES 4T1 101
1.1. Construction des outils 101
1.2. La sur-expression de *ROBO4* dans les lignées murines de carcinome mammaire aboutit à l'accumulation d'une forme protéique de masse moléculaire élevée 102
1.3. Le récepteur ROBO4 est une protéine glycosylée 104
1.4. Détection des formes protéiques glycosylée et non glycosylée de ROBO4 dans les cellules endothéliales, hématopoïétiques et tumorales 106
1.5. La forme protéique glycosylée de ROBO4 réduit la migration et l'invasion des cellules 4T1 mais n'affecte pas leur propriétés tumorales *in vivo* 108
2. STRATEGIE DE MUTAGENESE DIRIGEE POUR OBTENIR LA FORME NON GLYCOSYLEE DU RECEPTEUR ROBO4 DANS LES CELLULES TUMORALES 111
2.1. Construction des outils 112
2.2. La Mutagenèse dirigée des sites de glycosylation du récepteur ROBO4 n'aboutit pas à la synthèse d'une forme équivalente à celle détectée dans les cellules MDA-B02 113
2.3. La protéine endogène détectée par l'anticorps Ac1 dans les cellules tumorales est le produit du gène *ROBO4* 116
3. IDENTIFICATION DES TRANSCRITS DES CELLULES HUVEC ET MDA-B02 117
3.1. Mise en évidence de transcrits alternatifs du récepteur ROBO4 119
3.2. Les transcrits alternatifs de ROBO4 sont produits par les cellules endothéliales HUVEC et les cellules ostéotropique MDA-B02 121
3.3. La protéine ROBO4 endogène détectée dans les cellules tumorales est une forme plus légère et non glycosylée 123
IV. Discussion et perspectives 126
Publications et communications scientifiques 137
Références bibliographiques 138

Liste des tableaux

TABLEAU 1. STATUT HORMONAL ET FREQUENCE DES SITES METASTATIQUES CHEZ LES PATIENTES AVEC UN CANCER DU SEIN INVASIF. 40
TABLEAU 2. LISTE DES COUPLES D'AMORCES UTILISES POUR LES EXPERIENCES DE RTQPCR 93
TABLEAU 3. LISTE DES COUPLES D'AMORCES UTILISES POUR LES EXPERIENCES DE MUTAGENESE DIRIGEE.....95
TABLEAU 4. LISTE DES COUPLES D'AMORCES UTILISES POUR LES EXPERIENCES DE CLONAGE MOLECULAIRE 97
TABLEAU 5. LISTE DES LIGNEES CELLULAIRES CULTIVEES 98

Liste des illustrations

FIGURE 1. STRUCTURE D'UN OS LONG. 23
FIGURE 2. OSTEOCLASTOGENESE 26
FIGURE 3. RESORPTION DE LA MATRICE OSSEUSE. 27
FIGURE 4. OSTEOBLASTOGENESE 28
FIGURE 5. MINERALISATION OSSEUSE. 30
FIGURE 6. ROLE DES RECEPTEURS ROBO4 ET CXCR4 DANS L'ANCRAGE DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES. 32
FIGURE 7. NICHES HEMATOPOÏETIQUES. 33
FIGURE 8. LES ETAPES DU REMODELAGE OSSEUX. 36
FIGURE 9. REGULATION DU REMODELAGE OSSEUX. 38
FIGURE 10. PRINCIPALES ETAPES DE LA CASCADE METASTATIQUE DU CANCER DU SEIN. 42
FIGURE 11. LES ETAPES DE LA COLONISATION OSSEUSE PAR LES CELLULES TUMORALES. 51
FIGURE 12. VISUALISATION DE L'OS EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET METASTATIQUES EN RADIOGRAPHIE ET EN HISTOLOGIE. 52
FIGURE 13. CERCLE VICIEUX DES METASTASES OSSEUSES OSTEOLYTIQUES. 53
FIGURE 14. ROLE DE LA TRIADE RANK/RANKL/OPG DANS LA FORMATION DES METASTASES OSSEUSES. 54
FIGURE 15. LES ETAPES ET MOLECULES CLES DU PROCESSUS DES METASTASES OSSEUSES 57
FIGURE 16. LES RECEPTEURS DE GUIDAGE AXONAL. 63
FIGURE 17. PHENOTYPE DES AXONES COMMISSURAUX CHEZ LA DROSOPHILE SAUVAGE OU MUTEE POUR LES GENES *ROBO* ET *SLIT*. 63
FIGURE 18. STRUCTURE DES PROTEINES SLIT ET ROBO. 65
FIGURE 19. REGULATION DES PROTEINES ROBO PAR LE MIRNA-218. 68
FIGURE 20. SEQUENCE PROMOTRICE DU GENE *ROBO4*. 70
FIGURE 21. CLIVAGE DE ROBO1. 72
FIGURE 22. REGULATION DE LA MIGRATION CELLULAIRE PAR LA VOIE DE SIGNALISATION SLIT/ROBO. 75
FIGURE 23.REGULATION PAR LE RECEPTEUR ROBO4 DE LA MIGRATION VASCULAIRE INDUITE PAR LA VOIE DU VEGF. 79
FIGURE 24. ROLE DE LA VOIE SLIT/ROBO DANS LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE. 83
FIGURE 25. INHIBITION DE L'ANGIOGENESE TUMORALE PAR LA VOIE SLIT2/ROBO4. 87
FIGURE 26. ROLE DU RECEPTEUR ROBO4 DANS LES ETAPES PRECOCES DE LA FORMATION DES METASTASES OSSEUSES. 92
FIGURE 27. VECTEUR D'EXPRESSION RETROVIRAL PLPCX-HROBO4. 102

FIGURE 28. ANALYSE DE L'ACCUMULATION DES TRANSCRITS ET DETECTION DE LA PROTEINE ROBO4 DANS LES LIGNEES MURINES DE CANCER DU SEIN TRANSDUITES. 104
FIGURE 29. CARACTERISATION DE LA GLYCOSYLATION DU RECEPTEUR ROBO4..... 105
FIGURE 30. DETECTION DES FORMES GLYCOSYLEE ET NON GLYCOSYLEE DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES, LES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES ET LES CELLULES TUMORALES DE CARCINOMES MAMMAIRES HUMAIN. 107
FIGURE 31. EFFET DE LA FORME GLYCOSYLEE DU RECEPTEUR ROBO4 SUR LA MIGRATION ET L'INVASION DES CELLULES CANCEREUSES 4T1..... 108
FIGURE 32. EFFET DE LA FORME PROTEIQUE GLYCOSYLEE DU RECEPTEUR ROBO4 SUR LA CROISSANCE ORTHOTOPIQUE ET SUR LA FORMATION DES METASTASES PULMONAIRES ET OSSEUSES DES CELLULES TUMORALES 4T1. 110
FIGURE 33. LES SITES PUTATIFS DE N-GLYCOSYLATION DU RECEPTEUR ROBO4..... 111
FIGURE 34. VECTEUR D'EXPRESSION PLPCX-HROBO4 DEPOURVU DES SITES DE GLYCOSYLATION. 112
FIGURE 35. ANALYSE DE LA SYNTHESE DE LA PROTEINE ROBO4 MUTEE POUR SES QUATRE SITES DE GLYCOSYLATION DANS LES CELLULES HUMAINES HELA. 114
FIGURE 36. CO-TRAITEMENT PAR LA TUNICAMYCINE ET PAR DES INHIBITEURS DU PROTEASOME DES CELLULES TUMORALES MDA-MB-231 SUR-EXPRIMANT ROBO4. 115
FIGURE 37. INVALIDATION GENETIQUE DU GENE ROBO4 PAR CRISPR/CAS9. 116
FIGURE 38. PRINCIPE DE LA 5' RACE PCR. 118
FIGURE 39. IDENTIFICATION DES EXTREMITES 5' DES ARN MESSAGERS DE ROBO4 PROVENANT DES CELLULES ENDOTHELIALES ET DES CELLULES TUMORALES OSTEOTROPIQUES MDA-B02 119
FIGURE 40. IDENTIFICATION DES PARTIES N-TERMINALE DES DIFFERENTS VARIANTS PROTEIQUES DE ROBO4 120
FIGURE 41. DETECTION DES TRANSCRITS ALTERNATIFS DE ROBO4 PAR RT-QPCR 122
FIGURE 42. FORMES PROTEIQUES PRODUITES PAR LES TRANSCRITS ALTERNATIFS DE ROBO4. 125

Liste des abréviations

3′UTR : 3′ Untranslated region
5′UTR : 5′ Untranslated region

A

Abl : Abelson
ADAMTS1 : ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif
Akt : Protein Kinase B
ALP : Alkalin Phosphatase
ARF6 : ADP-Ribosylation Factor 6

B

BCL-2 : B-Cell Lymphoma 2
BCL-XL : B-Cell Lymphoma Extra Large
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BMU : Basic Multicellular Units
BRC : Bone Remodeling Compartment

C

CAR : CXCL12-abundant reticular
CASR : Calcium Sensing Receptor
CC : Cytoplasmic Conserved
CCL2 : C-C Motif Ligand 2
CDC42 : Cell Division Control Protein 42 Homolog
CSF1R : Colony Stimulating Factor 1 Receptor
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
CSM : Cellule Souche Mésenchymateuse
CTC : Cellule Tumorale Circulante
CTGF : Connective Tissue Growth Factor
CTR : Calcitonine Receptor
CXCL12 : CXC-type Chemokine Ligand 12
CXCR4 : CXC-type Receptor 4

D

DCC : Deleted In Colorectal Cancer
DKK-1 : Dickkopf-1
DTC : Cellule Tumorale Disséminée

E

EMT : Ephitelial to Mesenchymal Transition
ER : Estrogen Receptor
ETS : E26 Transformation-Specific

F

FAK : Focal Adhesion Kinase
FGF-23 : Fibroblast Growth Factor 23
Fra-1 : Fos Related Antigen 1

G

GAPB : GA-Binding Protein
GAS6 : Growth Arrest-Specific 6
G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor
GDP : Guanosine Diphosphate
GEF-Sos : Guanosine exchange factor Son-Of-Sevenless
GTP : Guanosine Triphosphate

H

HCAEC : Human Coronary Artery Endothelial Cell
HCASmC : Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells
HEK-293 : Human Embryonic Kidney
HeLa : Henrietta Lacks
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HPMEC : Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cell
HUAEC : Human Umbilical Artery Endothelial Cell
HUVEC : Human Umbilical vein Endothelial Cell

I

IGF : Insuline-like Growth Factor
IL : Interleukine

K

kDa : Kilo-Dalton
KI : Knock-In
KO : Knock-Out

L

LOX : Lysyl oxydase
LPA : Lysophosphatidic Acid

M

M-CSF : Monocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor
MENA : Mammalian Enabled
MET : Mesenchymal to Ephitelial Transition
MMP : Matrix Metalloprotease
Myo9B : Myosin IXB

N

NG2 : Neural-Glial antigen 2
NHDF : Normal Human Dermal Fibroblasts

O

OPG : Ostéoprotégérine
OPN : Ostéopontine
OSX : Osterix

P

PAK : P21-Activated Protein Kinase
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PHOSPHO1 : Phosphate, Orphan 1
Pi : Phosphate Inorganique
PIGF : Placental Growth Factor
PR : Progesterone Receptor
PRRx1 : Paired-Related Homeobox 1
PDTC : Ammonium Pyrrolidinedithiocarbamate
PTH : Parathyroid Hormone
PTHrP : Parathyroid Hormone-Related Protein

R

RAC1 : Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
RACE : Rapid Amplification of cDNA Ends
RANK : Receptor Activator of NFκB
RANKL : Receptor Activator of NFκB Ligand
ROBO : Roundabout
RUNX2 : Runt-Related Transcription Factor 2

S

SCF : Stem Cell Factor
SOST : Sclerostin
SRGAP : SLIT-ROBO Rho GTPase Activating Protein

T

TGF-β : Transforming Growth Factor β
TNF-α : Tumor Necrosis Factor α
TRAP : Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
TSP1 : Thrombospondine 1
UNC : Un-Coordinated
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
WASP : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
ZEB 1 : Zinc-finger E-box-Binding 1
ZO-1 : Zona Occludin 1

A. Préface

Dans les pays économiquement développés, le cancer est la première cause de mortalité chez l'homme et la seconde chez la femme après les maladies cardiovasculaires. En France métropolitaine, 385 000 nouveaux cas de cancers ont été estimés en 2015. Parmi eux, les cancers de la prostate chez l'homme et du sein chez la femme sont ceux les plus fréquemment diagnostiqués. Plusieurs thérapies ciblées sont aujourd'hui utilisées pour lutter contre le cancer du sein. Néanmoins, la majeure partie des décès dus aux tumeurs malignes solides est la conséquence de l'apparition et de la croissance de métastases pour lesquelles les traitements proposés sont beaucoup moins efficaces. C'est pour cette raison que la compréhension des étapes biologiques, menant les cellules d'une tumeur primitive à une localisation secondaire, est un des enjeux majeurs en cancérologie.

Le tissu osseux est l'un des organes les plus souvent ciblés par les cellules métastatiques du cancer du sein, mais aussi du poumon et de la prostate. La survenue des métastases osseuses est à l'origine de troubles squelettiques, tels que des fractures pathologiques et des compressions médullaires, qui grèvent le pronostic vital des patientes. Avec 50 000 à 70 000 personnes concernées par an en France, les métastases osseuses constituent un véritable problème de santé publique.

Le tissu osseux est un microenvironnement dynamique et complexe. La présence de cellules spécialisées permet le remodelage de l'os à travers sa dégradation (ostéoclastes) et sa formation (ostéoblastes). Un équilibre physiologique finement régulé existe entre les processus de résorption et de formation. Ainsi, le dérèglement de l'une de ces deux activités conduit à des anomalies osseuses telles que l'ostéoporose (perte de masse osseuse) ou l'ostéopétrose (gain de masse osseuse). Les cellules tumorales de cancer du sein qui métastasent à l'os modulent le microenvironnement osseux *via* la sécrétion de facteurs initialement impliqués dans la régulation du remodelage osseux. Dans le cas des métastases ostéolytiques, les facteurs produits par les cellules tumorales stimulent l'activité des ostéoclastes et inhibent celle des ostéoblastes aboutissant à la destruction massive de la matrice osseuse. Ce constat moléculaire a permis l'élaboration de thérapies visant à limiter l'activité des

ostéoclastes par traitement des patientes avec des bisphosphonates ou du dénosumab. Toutefois, ces traitements sont uniquement donnés à visée palliative et n'améliorent pas la survie des patientes. C'est pourquoi il est nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de ces lésions osseuses afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans ce contexte, une analyse transcriptomique différentielle des cellules de cancer du sein de la lignée MDA-MB-231 et de la lignée MDA-B02 (dérivée des cellules MDA-MB-231 et métastasant spécifiquement vers l'os) a été entreprise au laboratoire afin d'identifier les déterminants moléculaires impliqués dans l'ostéotropisme des cellules de cette lignée. Cette étude a révélé une sur-expression du gène codant le récepteur de guidage axonal ROBO4 dans les cellules MDA-B02. Ce récepteur est un facteur important de la migration vasculaire développementale et pathologique. De plus, dans l'environnement osseux, ROBO4 est spécifiquement exprimé par les cellules souches hématopoïétiques et participe à leur tropisme et leur ancrage dans les niches osseuses. Cette fonction de ROBO4 est particulièrement intéressante car il a été démontré que les cellules tumorales s'établissent dans la moelle osseuse *via* des mécanismes moléculaires similaires à ceux employés par les cellules souches hématopoïétiques. Ainsi notre hypothèse majeure est que ROBO4, lorsqu'il est produit par les cellules tumorales, permettrait la colonisation et l'ancrage sur le site osseux. Les expériences précédentes réalisées au laboratoire vont dans ce sens puisqu'ils montrent que ROBO4 est un médiateur important dans l'ancrage des cellules tumorales dans l'environnement osseux. En effet, dans le modèle ostéotropique MDA-B02, l'inhibition de la synthèse du récepteur ROBO4 par génétique inverse ou bien son inactivation par l'utilisation d'un anticorps ne permet plus la colonisation du microenvironnement osseux par les cellules métastatiques.

Mon projet de thèse se place dans la continuité des travaux réalisés au laboratoire et a pour objectif initial d'étudier plus précisément le rôle du récepteur ROBO4 dans les différentes étapes de la formation des métastases osseuses, c'est-à-dire de la migration ciblée des cellules tumorales vers l'os jusqu'à leur développement dans l'environnement osseux. En effet, les mécanismes permettant aux cellules tumorales d'envahir la moelle osseuse ne sont pas complétement

élucidés et demeurent un enjeu majeur dans le contexte physiopathologique des métastases osseuses.

Pour répondre à cette question, une stratégie de sur-expression à été développée afin d'identifier si un niveau élevé de ROBO4 humain dans des cellules de carcinomes mammaires pouvait moduler i) Les capacités migratoires et invasives de ces cellules *in vitro* ii) La capacité des cellules tumorales à croître dans la glande mammaire, s'échapper de la tumeur primaire et coloniser l'os dans un modèle murin *in vivo*. Pour vérifier ce dernier aspect, la lignée syngénique 4T1 a été choisie notamment parce qu'elle récapitule, une fois injectée dans la glande mammaire, l'ensemble des étapes du processus métastatique du cancer du sein. De manière inattendue, lors de la sur-expression du récepteur ROBO4, une forme glycosylée du récepteur, qui ne correspond pas à la forme synthétisée pas les cellules tumorales, a été produite. A partir de ce résultat, l'objectif fut double : i) Caractériser fonctionnellement la forme glycosylée du récepteur ROBO4 ii) Identifier l'origine de la forme endogène produite par les cellules tumorales afin de la produire dans notre modèle. Pour étudier ce dernier point, des approches de mutagenèse dirigée des sites de glycosylation ainsi que des expériences de RACE PCR permettant d'identifier les régions non-traduites des messagers ont été effectuées.

Après avoir replacé ce travail dans son contexte bibliographique en présentant l'état des connaissances actuelles sur la biologie de l'os, les métastases osseuses et les récepteurs de guidage axonal Roundabout, les objectifs du travail de thèse, les résultats obtenus et les perspectives qui en découlent seront présentés.

B. Etat de l'art

I. Biologie du tissu osseux

1. GENERALITES

L'os est un tissu conjonctif minéralisé, décrit comme un organe dynamique et vivant qui assure au sein de l'organisme des fonctions vitales. La plus intuitive est la fonction architecturale car le squelette agit comme une charpente permettant le soutien et la protection des organes et des tissus mous et, associé aux muscles et aux ligaments, il rend possible le mouvement du corps humain. Biologiquement, l'os est une réserve de minéraux comme le calcium et le phosphate mais aussi d'hormones protéiques telles que l'ostéocalcine lui conférant le double rôle d'organe métabolique et endocrine. Enfin, en étant le siège de l'hématopoïèse, il permet la production des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes dans la moelle osseuse.

2. ARCHITECTURE MACROSCOPIQUE

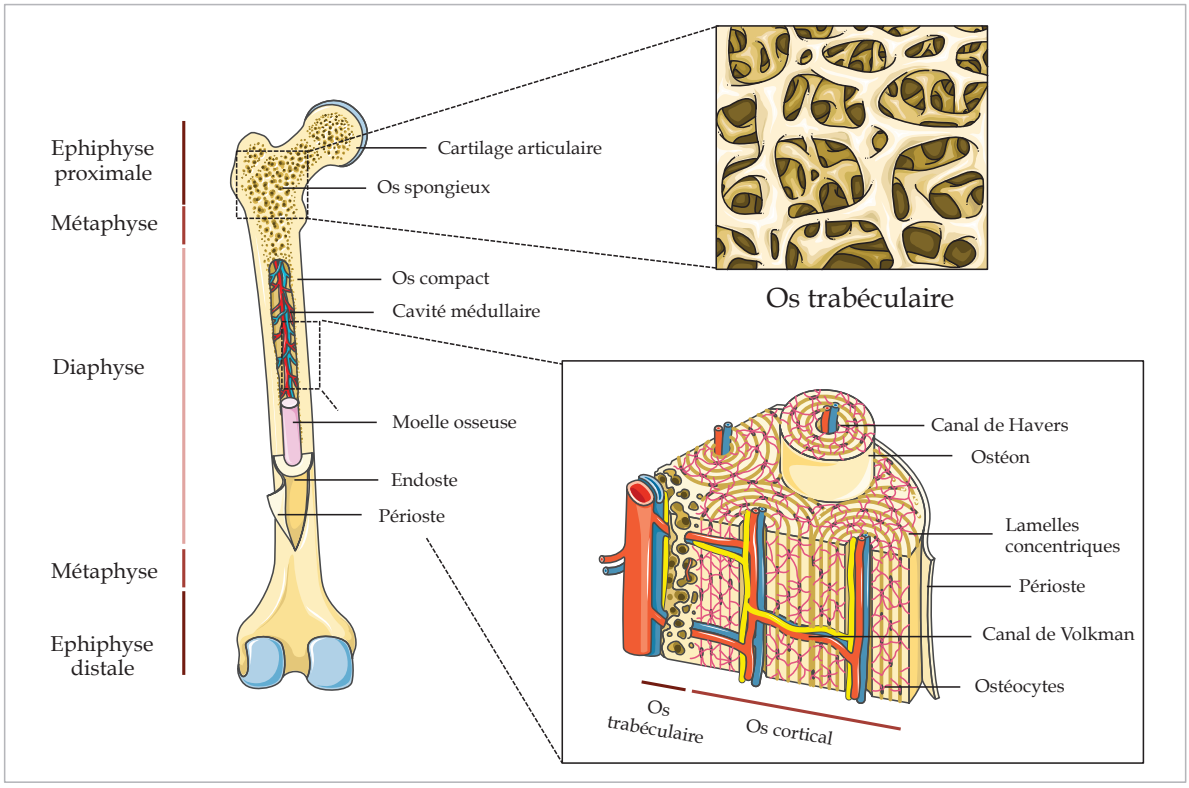


Figure 1. Structure d'un os long.

Pour les os longs, on dénombre trois parties externes distinctes. La diaphyse correspond à la partie centrale de l'os. Les épiphyses sont situées aux extrémités distales et proximales des os longs. Enfin, les métaphyses sont des régions intermédiaires situées entre la diaphyse et l'épiphyse [1] **(Figure 1)**.

3. ARCHITECTURE MICROSCOPIQUE

Si l'on observe plus précisément la composition osseuse, deux structures prédominent : l'os cortical et l'os trabéculaire.

L'os cortical compact représente 80% du squelette et constitue la diaphyse des os longs. Il est composé d'unités de bases appelées ostéons. L'os trabéculaire, représentant 20% du squelette adulte est constitué d'un réseau tridimensionnel de travées osseuses riches en tissus hématopoïétiques et adipeux. Sa résistance est faible, mais l'os trabéculaire représente une surface d'échange considérable jouant un rôle majeur dans la fonction métabolique de l'os [1] **(Figure 1)**.

3.1. Composantes organiques

Quel que soit son type, trabéculaire ou cortical, le tissu osseux est constitué d'une matrice protéique représentée presque totalement par le collagène de type I (90%), une glycoprotéine fibreuse et rigide responsable de la résistance de l'os [2]. Les protéines non collagéniques sont quantitativement minoritaires mais assurent des fonctions toutes aussi importantes que le collagène. La majorité des protéines non collagéniques sont d'origine osseuse et sont principalement produites par les ostéoblastes [3].

L'os est également un réservoir important de facteurs de croissance. L'IGF (Insulin-like Growth Factor), le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), les BMP (Bone Morphogenetic proteins), le TGF-β (Transforming Growth Factor β) et les interleukines sont les plus représentés [3].

3.2. Composantes minérales

La phase minérale est composée presque dans son intégralité de cristaux d'hydroxyapatite de calcium de formule générale $Ca_{10}(Po_4)_6(OH)_2$, mais également

d'autres éléments en quantité significative comme le magnésium, le sodium ou encore le potassium [2].

4. COMPOSITION CELLULAIRE DU TISSU OSSEUX

L'os contient une grande variété de types cellulaires qui participent à ses fonctions biologiques. Parmi eux, les ostéoclastes qui sont responsables de la dégradation osseuse, les ostéoblastes qui sont responsables de la formation osseuse et les ostéocytes qui participent à la régulation du remodelage osseux.

4.1. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées qui ont la propriété unique de dégrader la matrice osseuse. Ces cellules spécialisées sont la différenciation finale de progéniteurs hématopoïétiques.

4.1.1. Différenciation des ostéoclastes

La différenciation des CSH (Cellule Souche Hématopoïétique) en ostéoclastes matures nécessite leur engagement dans le lignage monocyte/macrophage. Il est rendu possible par l'action temporelle de différents facteurs produits par les ostéoblastes et les cellules stromales. Cet engagement est premièrement assuré par le facteur de transcription PU.1 qui permet la sur-expression par les CSH du récepteur au M-CSF (Monocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor) nommé c-fms [4]. La fixation du M-CSF sur son récepteur active l'expression par les précurseurs hématopoïétiques du récepteur RANK (Receptor Activator of NFκB) [5]. Le RANKL (Receptor Activator of NFκB Ligand) produit par l'environnement stromal mais aussi immunitaire (lymphocytes) agit en association avec le M-CSF et permet alors la différenciation des précurseurs monocytaires en ostéoclastes matures [6]. En parallèle, les ostéoblastes synthétisent l'OPG (ostéoprotégérine), un récepteur leurre du RANKL, qui régule finement la résorption osseuse par l'inhibition de l'ostéoclastogenèse [7] **(Figure 2)**.

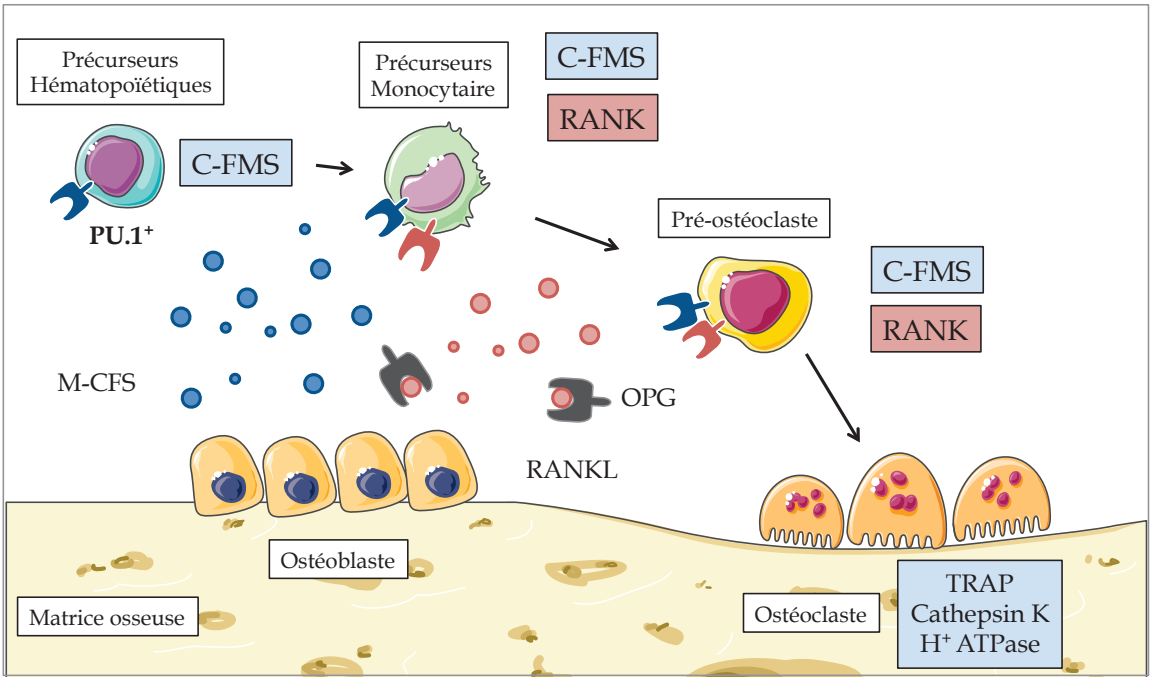


Figure 2. Ostéoclastogenèse.

Sous l'action du facteur de transcription PU.1, les précurseurs hématopoïétiques expriment le récepteur c-fms. L'action du M-CSF sur son récepteur permet la différentiation des cellules souches hématopoïétiques en précurseurs monocytaires et l'expression du récepteur RANK à leur surface. L'action simultanée du M-CSF et du RANKL produit par les ostéoblastes assure la formation d'ostéoclastes matures multinucléés capables de synthétiser l'enzyme TRAP et la cathepsin K.

4.1.2. Dégradation de la matrice osseuse

Dès lors qu'ils sont actifs, les ostéoclastes migrent en direction de la matrice et fusionnent pour former des cellules multinucléées et polarisées. Un réarrangement du cytosquelette d'actine et l'intervention de protéines membranaires, comme l'intégrine αvβ3, et de la matrice extracellulaire telles que le collagène de type I et l'OPN (Ostéopontine), permettent l'adhérence des ostéoclastes sur la surface osseuse. Cette fixation entraîne la formation d'un compartiment étanche entre la surface de l'os et la membrane basale [8]. La dissolution minérale résulte de l'acidification du milieu par le relargage d'ions hydrogènes tandis que la dégradation de la matrice organique est assurée par des enzymes protéolytiques comme la cathépsine K, le TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase) et MMP9 (Matrix Metalloprotease) [9], [10]. Leur action simultanée crée une fosse osseuse nommée lacune de Howship. **(Figure 3)**.

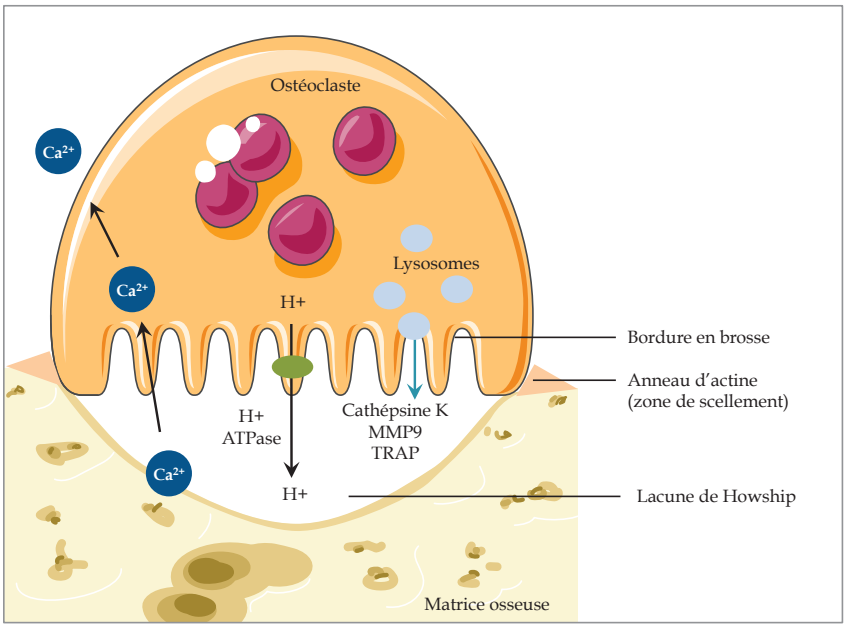


Figure 3. Résorption de la matrice osseuse.

Lors de la dégradation osseuse, les ostéoclastes présents sur la surface osseuse sont polarisés et présentent des structures membranaires typiques. Une zone de scellement, composée d'un anneau d'actine associé à des intégrines, va permettre l'adhérence de l'ostéoclaste et l'isolement de la surface à résorber. La bordure en brosse libère des ions H+ et des enzymes protéolytiques qui vont permettre la dégradation minérale et organique de l'os.

4.2. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules spécialisées dans la production de la matrice osseuse minéralisée qui participent aussi à la régulation du remodelage osseux. Cette population cellulaire représente 4 à 6 % des cellules résidentes de la moelle osseuse. Les ostéoblastes sont des cellules polarisées, de forme cuboïdale qui se retrouvent principalement le long de la surface osseuse.

4.2.1. Différenciation des ostéoblastes

Les ostéoblastes sont issus des CSM (Cellule Souche Mésenchymateuse) qui durant leur différenciation génèrent un panel hétérogène de cellules comprenant les pré-ostéoblastes, les ostéoblastes immatures et les ostéoblastes matures capables de produire de la matrice osseuse. La transition entre ces différents stades est régulée par l'action de deux facteurs de transcription : RUNX2 (Runt-Related Transcription Factor 2) et OSX (Osterix). La délétion homozygote des gènes codant ces deux protéines aboutit à une absence d'ostéoblaste chez la souris [11], [12]. RUNX2 permet

la différenciation des CSM en pré-ostéoblastes au détriment des lignées chondrocytaires et adipocytaires. Il permet également l'expression des gènes de la chaîne α1 du collagène de type I, de l'OPN et de l'ostéocalcine [13]. OSX est exprimé à des stades plus tardifs et agit en aval de RUNX2. OSX permet la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures capable de synthétiser du collagène de type I et de l'ALP (Alkalin Phosphatase) [12] **(Figure 4).**

La voie Wnt/β-caténine ainsi que les BMP (Bone Morphogenetic Protein) sont des acteurs fondamentaux dans le contrôle de l'ostéoblastogenèse en agissant notamment sur l'expression de *RUNX2* [14] [15]. Inversement, les facteurs SOST (sclerostin) et DKK-1 (dickkopf-1) sont des antagonistes de la voie Wnt/β-caténine et régulent négativement la différentiation et l'activité des ostéoblastes [16].

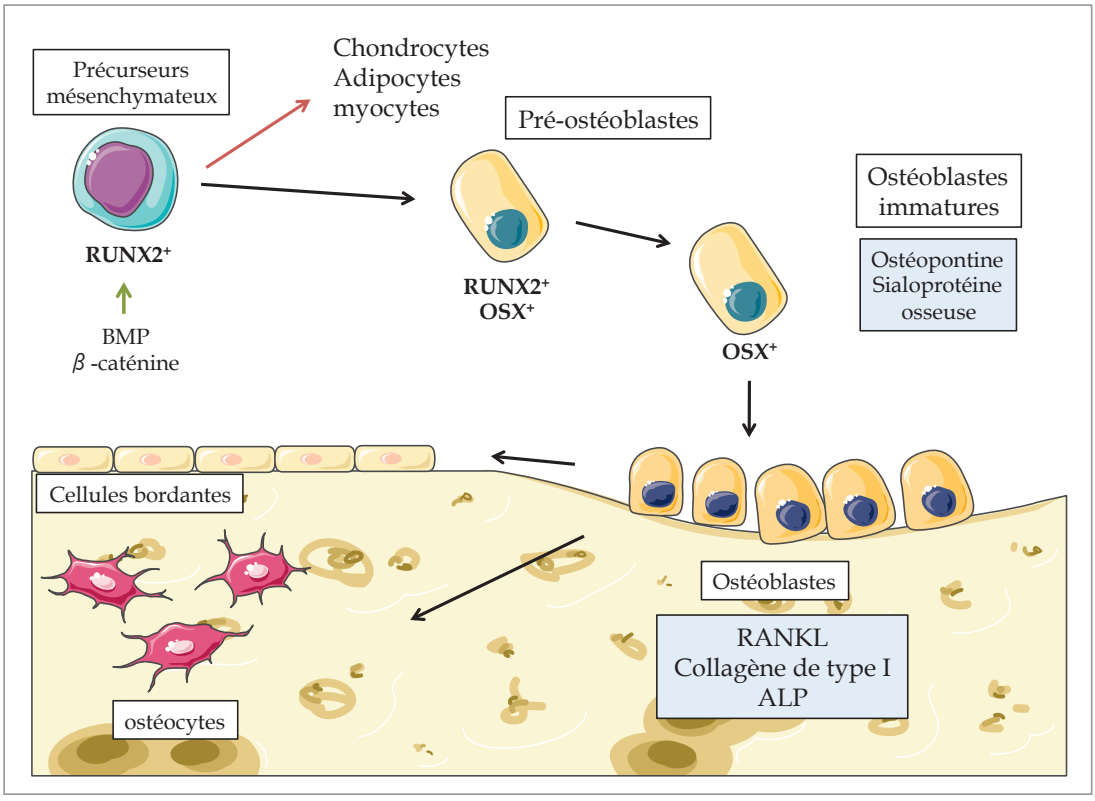


Figure 4. Ostéoblastogenèse.

La voie Wnt/β-caténine stimule l'expression du facteur de transcription RUNX2 qui va permettre la différenciation des précurseurs mésenchymateux en pré-ostéoblastes au détriment des lignées chondrocytaires et adipocytaires. OSX permet la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures capables de synthétiser la matrice osseuse et de minéraliser cette dernière. Les ostéoblastes peuvent se retrouver piégés dans la matrice osseuse. Ils se différencient alors en ostéocytes ou dans d'autres conditions en cellules bordantes.

4.2.2. Production de la matrice osseuse

Dans l'os, les ostéoblastes synthétisent la matrice organique et assurent sa minéralisation par la production de cristaux d'hydroxyapatite.

Durant la formation de la matrice organique, les ostéoblastes secrètent du collagène de type I et des protéines non collagéniques. Parmi elles se trouvent :

- des glycoprotéines représentées par l'ALP et l'ostéonectine qui interviennent dans la minéralisation de l'os.

- des glycoprotéines contenant des séquences consensus de liaison aux intégrines (séquences RGD pour Arg-Gly-Asp) comme la sialoprotéine osseuse et l'OPN. Elles interviennent dans l'interaction cellules/matrice.

- des protéoglycanes tels que la décorine, possédant une chaîne glycosaminoglycane. Cette particularité biochimique leur permet de fixer et réguler la formation et l'organisation des fibres de collagène.

- des Gla-protéines comme l'ostéocalcine qui présentent une forte affinité pour le calcium.

La production d'hydroxyapatite s'effectue suite à l'association du Pi (Phosphate Inorganique) et du calcium. Deux mécanismes propres aux ostéoblastes permettent de produire du Pi. Le premier est intracellulaire et fait intervenir la protéine PHOSPHO1 (Phosphate, Orphan 1) qui, à partir de phosphoéthanolamine, et de la phosphocholine va permettre la production de Pi [17]. Le Pi produit s'accumule et s'associe aux ions calcium dans une vésicule matricielle qui, à terme, va se rompre et libérer des cristaux d'hydroxyapatite. Le second mécanisme est extracellulaire et complémentaire du précédent. Il fait intervenir l'ALP qui transforme le pyro-phosphate inorganique présent dans la milieu extracellulaire en Pi [18]. Cette production enrichit les cristaux nouvellement formés qui se déposent alors sur les fibres de collagène et calcifient la matrice **(Figure 5)**.

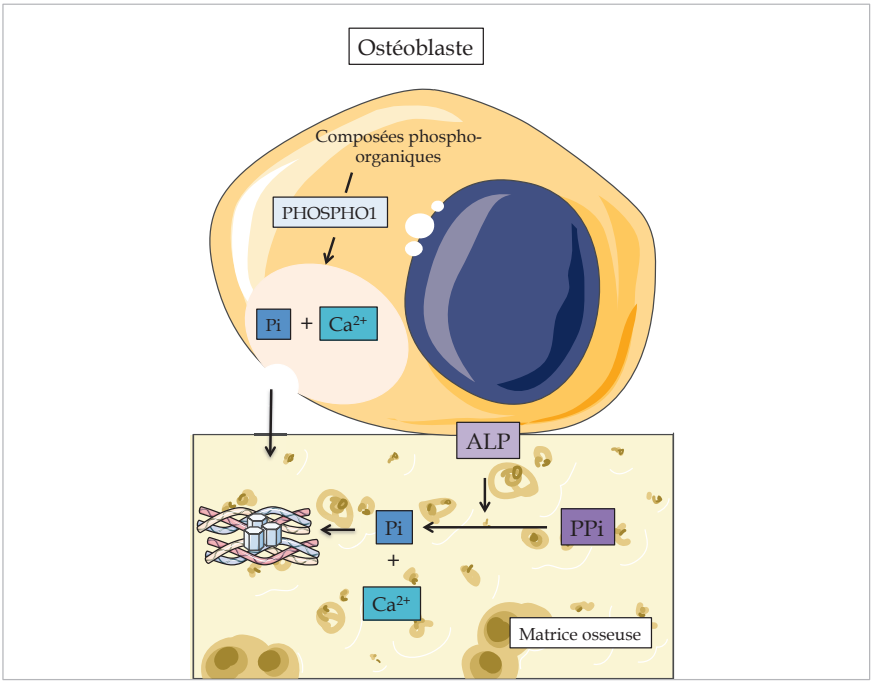


Figure 5. Minéralisation osseuse.

4.3.Les ostéocytes

Les ostéocytes sont une catégorie particulière de cellules puisqu'il s'agit en réalité d'ostéoblastes emmurés dans la matrice osseuse. En effet, à la fin d'un cycle de formation, les ostéoblastes peuvent se différencier en cellules bordantes, en ostéocytes ou bien entrer en apoptose [19] **(Figure 4)**. Lors de la différenciation en ostéocytes, l'expression des marqueurs ostéoblastiques comme l'ALP et l'ostéocalcine diminuent pour laisser place à des marqueurs ostéocytaires spécifiques tels que SOST [20]. Les ostéocytes sont considérés comme des régulateurs puissants du remodelage osseux car ils sont en mesure de stimuler l'ostéoclastogenèse par l'apport de RANKL mais aussi d'inhiber la différenciation ostéoblastique par la production de SOST [21], [22].

5. NICHES HEMATOPOÏETIQUES

5.1. Les cellules souches hématopoïétiques

Voilà maintenant de nombreuses années que des expériences d'irradiation de moelle osseuse ont permis de mettre en évidence la capacité des CSH à coloniser l'environnement osseux et assurer la production de l'intégralité des cellules

sanguines par le biais des précurseurs myéloïdes et lymphoïdes. Même si les CSH ne représentent qu'une faible proportion des cellules de la moelle osseuse (0,005% à 0,01%) [23], leurs propriétés de quiescence, d'auto-renouvellement et de prolifération durant le processus de différenciation fait de l'hématopoïèse un mécanisme extrêmement efficace. Cette efficacité implique une régulation stricte par de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques. Ensemble, ils participent à la migration ainsi qu'à la rétention des CSH dans l'os et déterminent également la levée de la dormance pour activer la prolifération et la différenciation en cellules matures fonctionnelles [24].

La régulation physiologique des CSH dépend de l'expression de facteurs provenant de l'environnement osseux. Le couple SCF (Stem Cell Factor) et son récepteur c-Kit interviennent dans la prolifération et l'auto-renouvellement des CSH. L'invalidation génétique de ces deux gènes, chez la souris, réduit la capacité des CSH à produire des progéniteurs et maintenir un pool de cellules primitives [25], [26]. La chimiokine CXCL12 (CXC-type Chemokine Ligand 12) est déterminante dans la régulation de l'hématopoïèse puisque sa fixation sur l'un de ses récepteurs physiologiques CXCR4 (CXC-type Receptor 4) favorise la migration, l'ancrage et la quiescence des CSH. La déplétion de CXCL12 chez la souris ne permet plus la colonisation de l'os par les CSH [27] tandis que l'inactivation de CXCR4 aboutit à une prolifération excessive [28]. Le ciblage de l'axe CXCL12/CXCR4 par un inhibiteur pharmacologique spécifique, l'AMD3100, confirme l'implication de ce couple dans l'ancrage des CSH dans l'os [29] **(Figure 6)**.

Le récepteur de guidage axonal ROBO4 (Roundabout 4) serait également impliqué dans la physiologie des CSH. En effet, le gène *ROBO4* est exprimé par les CSH les plus primitives mais également par les cellules endothéliales des vaisseaux sinusoïdes [30], [31]. ROBO4 régulerait les CSH à deux niveaux. D'une part, produit par les CSH, il permettrait, en coopération avec CXCR4, l'ancrage des CSH dans l'os [32]. D'autre part, sa présence membranaire serait essentiel pour la trans-migration endothéliale des CSH de la circulation sanguine vers l'os [31] **(Figure 6)**.

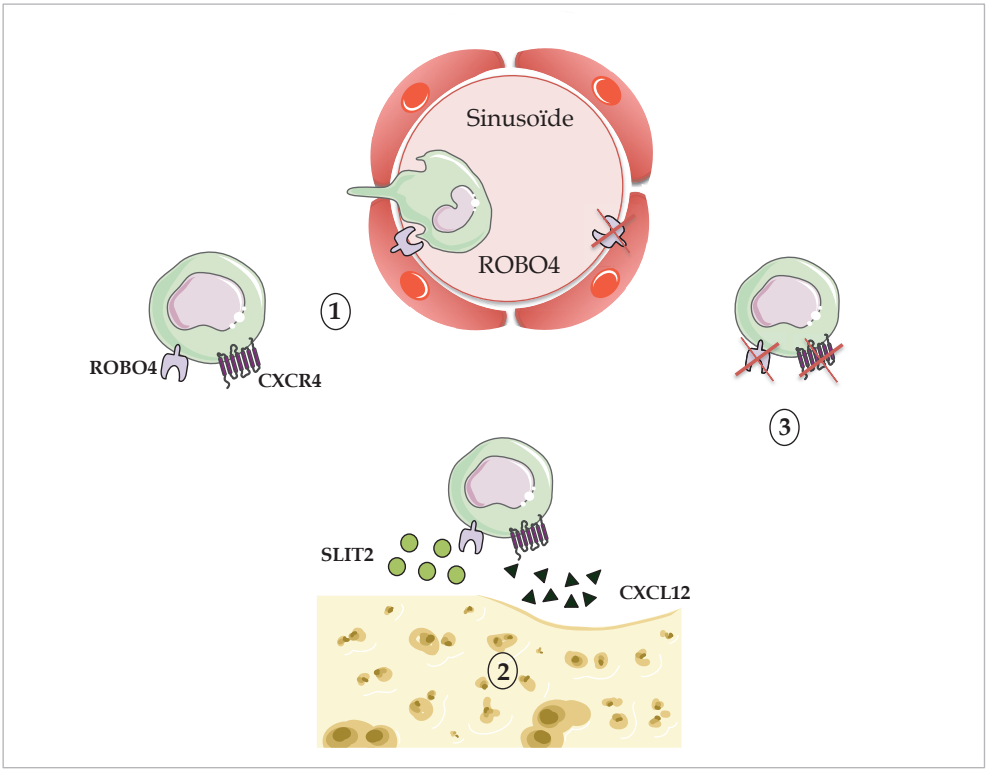


Figure 6. Rôle des récepteurs ROBO4 et CXCR4 dans l'ancrage des cellules souches hématopoïétiques.

1 : Les CSH qui produisent le récepteur CXCR4 migrent vers la moelle osseuse en réponse au CXCL12 sécrété par le microenvironnement osseux. Le récepteur ROBO4 produit par les cellules endothéliales des vaisseaux sinusoïdes favorise l'extravasation des CSH du sang vers la moelle osseuse. **2** : Dans l'environnement osseux ROBO4 participe en coopération avec CXCR4 à l'ancrage des CSH dans l'os. **3** : L'inhibition de CXCR4 et ROBO4 mobilise rapidement les CSH de l'os vers le sang. **(Modifié d'après : Smith-Berdan *et al.*, 2011)**

5.2. Concept de «niche hématopoïétique»

L'hypothèse d'un microenvironnement spécialisé capable de réguler la survie, la quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH a été proposée il y a de nombreuses années par Schofield [33]. Depuis, cette thématique connaît un essor considérable et des faisceaux d'arguments semblent converger sur l'existence de niches distinctes : la niche endostéale ou encore ostéoblastique, la niche vasculaire et plus récemment la niche mésenchymateuse ou périvasculaire. L'amélioration des techniques d'imagerie et la découverte de nouveaux marqueurs cellulaires et génétiques montrent que ce système ne serait pas aussi cloisonné mais qu'il s'agirait plutôt d'un processus physiologique continu dans lequel le réseau vasculaire

endostéal et centromédullaire ainsi que les cellules mésenchymateuses associées seraient les principaux acteurs [34] (**Figure 7)**.

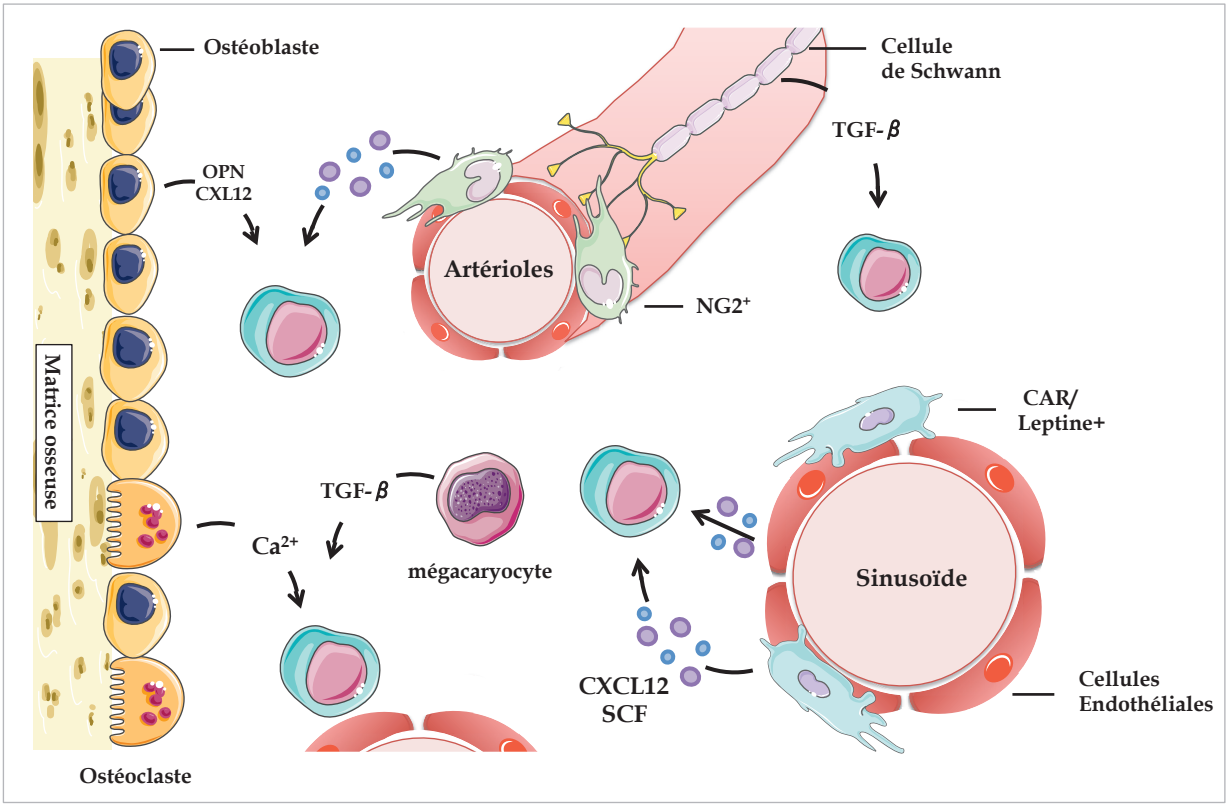


Figure 7. Niches hématopoïétiques.

Les cellules souches hématopoïétiques résident à proximité des vaisseaux sinusoïdes et des artérioles retrouvés dans l'endoste. Les facteurs CXCL12 et SCF produits par les cellules périvasculaires et les cellules endothéliales favorisent le maintien des CSH. D'autres populations cellulaires participent à la régulation des CSH par la sécrétion de facteurs qui favorisent la colonisation (Ca^{2+}) et la quiescence (TGF-β). **(Modifié d'après Boulais and Frenette., 2015).**

5.3.Niche endostéale

L'endoste constitue l'interface entre l'os et la moelle osseuse. C'est une région tapissée de cellules de la lignée ostéoblastique à différents stades de différenciation, d'ostéoclastes et de fibroblastes. Seulement, leur implication directe dans le maintien des CSH reste vivement controversée [34], [35], [36]. En effet, les données d'imagerie récentes montrent que la faible proportion de CSH retrouvées dans la région endostéale se trouve à proximité des vaisseaux sanguins [37], [38]. Il ne serait donc pas certain que les cellules endostéales, comme les ostéoblastes participent, par le biais d'un contact cellules/cellules, au maintien des CSH. Néanmoins, des facteurs sécrétés par les ostéoblastes, comme CXCL12, l'angiopoïétine [39] et l'OPN [40], [41],

influencent l'ancrage et la quiescence des CSH. De plus, la resorption osseuse médiée par les ostéoclastes enrichit l'endoste en Ca^{2+}, en protéase et en facteur de croissance provenant de la matrice osseuse qui participent à la régulation des CSH dans la niche osseuse [42].

5.4. Niche vasculaire et périvasculaire

L'identification de marqueurs cellulaires [43] et génétiques [38] de plus en plus spécifiques a considérablement amélioré les techniques de détection des CSH les plus primitives au sein de la moelle osseuse et a permis de montrer que la majorité d'entre elles résideraient à proximités des capillaires sinusoïdes et des artérioles endostéales [37], [44].

Le système vasculaire osseux semble être un élément important dans l'homéostasie des CSH et la composition des niches. La perte de l'intégrité vasculaire induite, dans des modèles murins, par la déplétion du récepteur VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) ou bien du récepteur ROBO4 altère la colonisation des CSH lors d'une greffe myéoloablative [31], [45]. De plus, Les cellules endothéliales sinusoïdes et artériolaires sont une source de CXCL12 et de SCF qui favorisent l'ancrage et le maintien des CSH [26].

Les capillaires sanguins sont étroitement associés à des sous-populations de CSM. Une des particularités de ces cellules est qu'elles produisent en forte quantité les deux facteurs cruciaux pour le maintien des CSH dans cet environnement: CXCL12 et SCF. Les cellules périvasculaires CAR (CXCL12-abundant reticular) ainsi que les cellules positives pour la leptine (LEPR+) en sont les sources principales et leur déplétion conditionnelle induit une déplétion en CSH [46], [47]. Des péricytes positifs pour le marqueur NG2 (Neural-Glial antigen 2) exclusivement associés aux artérioles semblent quant à eux promouvoir la quiescence des CSH [44]. La déplétion des cellules périvasculaires $NG2^+$ relocalise les CSH dans les niches sinusoïdales, lesquelles stimulent leur prolifération. Ces données supportent l'hypothèse selon laquelle les CSH prolifératives résideraient à proximité des vaisseaux sinusoïdes tandis que les CSH quiescentes seraient davantage associées aux artérioles proches de l'endoste (**Figure 7).**

D'autres cellules participent indirectement à la régulation des CSH. Les cellules de Schwann non myélinisantes, un type de cellules gliales enveloppant les cellules nerveuses, participent à la quiescence des CSH en régulant l'activation du TGF-β latent [48]. Les mégacaryocytes sont un autre exemple de cellules localisées proches des sinusoïdes et capables de promouvoir la quiescence des CSH à travers la production de TGF-β [49].

6. MECANISME DU REMODELAGE OSSEUX

L'os est un tissu dynamique constamment remodelé par des mécanismes de dégradation et de formation qui renouvellent chaque année 10% du squelette adulte. Un tandem de deux types cellulaires orchestre le processus dans le temps et l'espace : les ostéoclastes qui éliment périodiquement l'os ancien et les ostéoblastes qui, sur le même site, produisent la nouvelle matrice osseuse. Dans des conditions physiologiques, les quantités d'os résorbées et formées sont équivalentes. La survenue d'un déséquilibre en faveur de la dégradation ou de la formation aboutit à l'émergence de pathologies. C'est le cas de l'ostéoporose caractérisée par une perte osseuse importante.

6.1. Processus général

Lors du remodelage osseux, le couplage fonctionnel des ostéoblastes et des ostéoclastes sur le site à remodeler forme des unités multicellulaires de base (BMU : Basic Multicellular Units). L'organisation de cette entité multicellulaire aboutit à l'enchaînement successif de quatre étapes du remodelage.

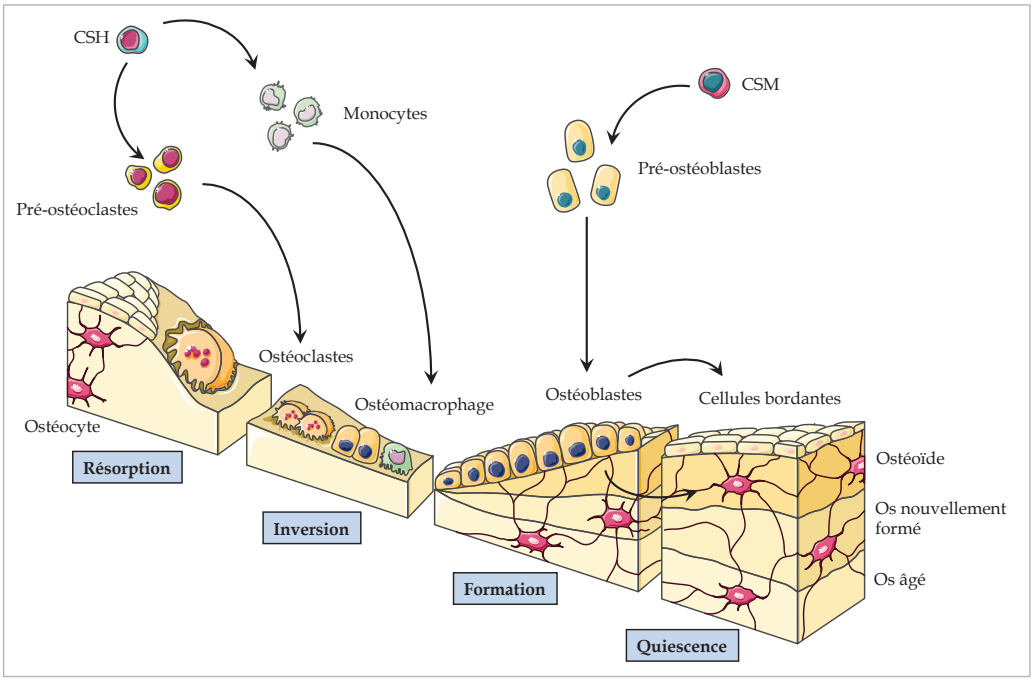


Figure 8. Les étapes du remodelage osseux.

La première phase est celle de la résorption où des stimuli mécaniques, hormonaux ou nerveux permettent le recrutement et l'activation des ostéoclastes au niveau de la surface osseuse à résorber : la dégradation de l'os débute. La deuxième est la phase d'inversion qui définit littéralement le moment où la dégradation médiée par les ostéoclastes se termine et permet le recrutement des précurseurs ostéoblastiques dans la lacune de Howship. La phase de formation, qui correspond à la troisième étape, est alors initiée par la division et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques en ostéoblastes matures capables de synthétiser l'ostéoïde et de le minéraliser. La phase de quiescence est l'ultime étape caractérisée par la mort apoptotique des ostéoblastes ou bien leur différenciation en ostéocytes et en cellules bordantes [3] **(Figure 8).**

6.2. Régulation du remodelage osseux

Le remodelage osseux médié par les ostéoclastes et les ostéoblastes est un mécanisme complexe régulé par des facteurs systémiques tels que les hormones oestrogéniques et parathyroïdiennes. Les facteurs de croissance et les cytokines retrouvés dans l'os participent quant à eux à la régulation locale du remodelage. Le

trio moléculaire RANK/RANKL/OPG constitue le mécanisme de régulation central du processus de remodelage osseux **(Figure 9).**

6.2.1. Facteurs systémiques

La vitamine D est un acteur important de la régulation du remodelage. A des doses physiologiques, l'effet de la vitamine D est anabolique car elle stimule, en présence de PTH (Hormone Parathyroïdienne), la différenciation et la maturation des ostéoblastes. A des doses plus importantes, l'effet de la vitamine D est catabolique par son action sur l'activation et la différenciation des ostéoclastes, ce qui permet la mobilisation du calcium [50].

La calcitonine régule négativement la dégradation osseuse en se fixant sur sont récepteur CTR (Calcitonine Receptor) présent à la surface des ostéoclastes. Cette association inhibe l'activité des ostéoclastes en altérant l'organisation du cytosquelette d'actine [51].

La PTH est déterminante dans l'homéostasie phosphocalcique car elle stimule, d'une part, l'ostéoclastogenèse en favorisant l'expression du M-CSF et du RANK et en inhibant la production d'OPG [52]. D'autre part, la PTH est capable d'activer l'expression de RUNX2 et d'inhiber la production de SOST par les ostéocytes ce qui stimule la différenciation ostéoblastique [53], [54].

Les œstrogènes sont des régulateurs négatifs de la résorption osseuse. En se fixant sur leur récepteur présent à la surface des ostéoblastes, ils stimulent leur prolifération et leur survie mais aussi la production de protéines de la matrice extracellulaire et de facteurs de croissance tels que l'IGF et le TGF-β. Les œstrogènes régulent simultanément la dégradation osseuse en inhibant la production des principales cytokines pro-ostéoclastiques comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF-α [55].

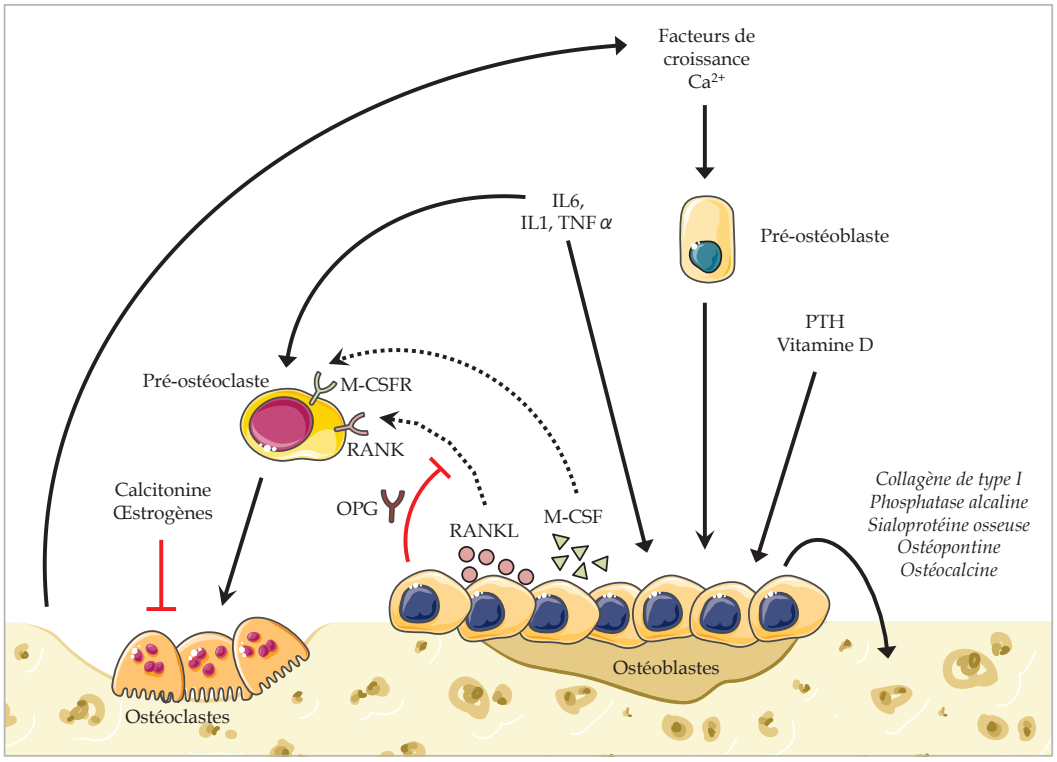


Figure 9. Régulation du remodelage osseux.

6.2.2. Facteurs locaux

Ils incluent des acteurs autocrines et paracrines comme des facteurs de croissance et certaines cytokines produites par les cellules de l'os et libérées de la matrice durant la résorption osseuse. Parmi ces facteurs, BMP2 et BMP4 régulent positivement la différenciation ostéoblastique en favorisant l'expression des facteurs RUNX2 et OSX [15]. Le rôle du TGF-β n'est pas très clair. Ses effets sur le remodelage osseux sont contradictoires car *in vitro,* le TGF-β stimule la production d'OPG et inhibe la synthèse du RANKL tandis qu'*in vivo* son action serait préférentiellement pro-ostéoclastique [15], [56].

L'accumulation de ces facteurs de croissance dans le microenvironnement osseux induit l'expression de cytokines par les ostéoblastes. L'IL-1, l'IL-6 et le TNF-α participent fortement à la différenciation ostéoclastique puisqu'ils stimulent la production par les ostéoblastes du M-CSF et du RANKL. L'IL-11 quant à elle favorise la différenciation ostéoblastique *via* une activation de la production de BMP2 [57].

6.2.3. Système RANK/RANKL/OPG

L'axe principal de signalisation participant à la régulation du remodelage osseux fait intervenir trois acteurs moléculaires : RANK, RANKL et OPG. Au cours du remodelage osseux, l'association du RANKL avec son récepteur RANK favorise l'ostéoclastogenèse et en conséquence la dégradation osseuse. L'OPG produite par les ostéoblastes va cependant agir comme un récepteur leurre et piéger le RANKL de l'environnement inhibant ainsi la différenciation des ostéoclastes [58]. Leurs rôles dans la régulation du remodelage osseux sont illustrés par des modèles murins KI (Knock-In) ou KO (Knock-Out) pour chacun de ces gènes. La production excessive de l'OPG par des souris transgéniques permet la séquestration de RANKL et aboutit à une ostéopétrose (pathologie caractérisée par un excès de formation osseuse) tandis que sa déplétion va induire une ostéoporose sévère [59].

6.2.4. Régulation médiée par des molécules de guidage axonal

L'expression par les ostéoblastes et par les ostéoclastes de molécules de guidage des axones apporte une dimension neuronale aux mécanismes de régulation qui gouvernent le remodelage osseux. Parmi elles, on retrouve les éphrines et les sémaphorines.

Dans l'os, les ostéoblastes produisent les récepteurs EphB4 et EphB2 tandis que les ostéoclastes expriment les ligands transmembranaires Ephrine-B2 et Ephrine-A2. L'association du récepteur EphB4 et de son ligand Ephrine-B2 active un signal bidirectionnel qui stimule la différenciation ostéoblastique et inhibe l'ostéoclastogenèse. A l'inverse, la signalisation bidirectionnelle du couple Ephrine-A2/EphA2 stimule la dégradation en favorisant l'ostéoclastogenèse au détriment de la différenciation ostéoblastique [60].

Les molécules sémaphorines régulent l'homéostasie osseuse médiée par l'interaction des ostéoblastes avec les ostéoclastes [61]. Chez la souris, SEMA3A est produite par les ostéoblastes et inhibe l'ostéoclastogenèse en se fixant sur la neuropiline 1 des précurseurs ostéoclastiques [62]. A l'inverse SEMA4D, exclusivement produite par les ostéoclastes, s'associe avec la plexine B1 et inhibe non seulement la minéralisation des ostéoblastes mais active également la formation des ostéoclastes [63].

II. Métastases osseuses du cancer du sein

1. CANCER DU SEIN

Le cancer du sein est le plus largement représenté chez la femme avec 54 000 nouveaux cas chaque année, soit un tiers des nouveaux cas de cancers, et près de 12 000 décès estimés en 2015 [64]. Le cancer du sein est considéré comme une pathologie multifactorielle car sa survenue est influencée par plusieurs facteurs de risque dont l'âge, le mode de vie (habitudes alimentaires, tabagisme, alcool) et les antécédents génétiques [65]. Même si une connaissance accrue de ces facteurs ne permet pas de prédire individuellement qui développera un cancer, elle a considérablement amélioré les mesures de prévention des cancers ainsi que le développement de dépistages ciblés. Le décryptage moléculaire des cancers du sein a lui aussi enrichi les connaissances que nous avions sur le développement des tumeurs et a permis leur classification moléculaire ainsi que leur évaluation pronostique.

En effet, au-delà des paramètres d'évaluation clinique habituels (taille de la tumeur, statut ganglionnaire, grade de la tumeur), l'étude du statut hormonal des tumeurs mammaires a permis leur classement moléculairement. Quatre sous-types ont alors été déterminés sur la base de l'expression du récepteur aux œstrogènes (ER), du récepteur à la progestérone (PR) et du récepteur au facteur de croissance épidermique humain (HER2) [66] **(Tableau 1).**

	caractéristiques moléculaires			probabilités de survenue de métastases			
	ER	PR	HER2	osseuses	pulmonaires	cérébrales	hépatiques
Luminal A	+	+	–	67%	14%	8%	29%
Luminal B	+	+	+	71%	30%	11%	32%
HER2 +	–	–	+	62%	42%	23%	45%
Triple négatives	–	–	–	43%	42%	25%	27%

Tableau 1. Statut hormonal et fréquence des sites métastatiques chez les patientes avec un cancer du sein invasif.

(D'après Kennecke *et al.*, 2010)

Le type luminal A est caractérisé par la présence du récepteur aux œstrogènes et à la progestérone et par l'absence du récepteur HER2 (ER+/PR+/HER2-). Ce sont des tumeurs faiblement prolifératives où l'on observe un faible taux de mutation pour le gène suppresseur de tumeur p53. Le type luminal B possède des caractéristiques similaires concernant l'expression des récepteurs hormonaux ER et PR mais présente souvent une sur-expression du gène *HER2* (ER+/PR+/HER2+). Les tumeurs HER2+ présentent une sur-expression du récepteur HER2 mais n'expriment pas les récepteurs hormonaux ER et PR (ER-/PR-/HER2+). Enfin, les tumeurs qui n'expriment aucun de ces récepteurs (ER-/PR-/HER2-) sont dites « triple négatives ». Ce sont ce type de tumeur qui sont le plus proliférative [66].

L'identification de cette diversité moléculaire a permis un diagnostic plus efficace et l'émergence de thérapies ciblées plus spécifiques améliorant ainsi la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein. Malgré ceci, les thérapies actuelles sont beaucoup moins efficaces dans le cas de cancers avec métastases, qui représentent la principale cause de mortalité chez les patientes. C'est le cas des métastases osseuses qui surviennent dans 60% des formes avancées de carcinome mammaire **(Tableau 1).**

2. PROCESSUS METASTATIQUE

La formation de métastase est la conséquence directe de la migration, par voie sanguine ou lymphatique, des cellules tumorales depuis leur site d'origine vers un organe à distance. Les mécanismes mis en place par les cellules tumorales pour rejoindre le foyer secondaire sont littéralement définis par le terme de « cascade métastatique ». Ce terme traduit les étapes se produisant successivement dans la tumeur primaire, la circulation sanguine puis dans l'organe cible **(Figure 10)**.

Le franchissement de chacune de ces étapes est crucial pour la formation de métastases et dépend de l'acquisition, par les cellules tumorales, de nouvelles propriétés. La formation de métastases a été initialement considérée comme un processus tardif lié à la sélection d'une sous-population de cellules présentes dans la tumeur primaire. Il est maintenant admis que la dissémination des cellules tumorales a lieu précocement parfois avant même la détection d'une tumeur primaire ce qui est déterminant dans les approches prédictives et thérapeutiques.

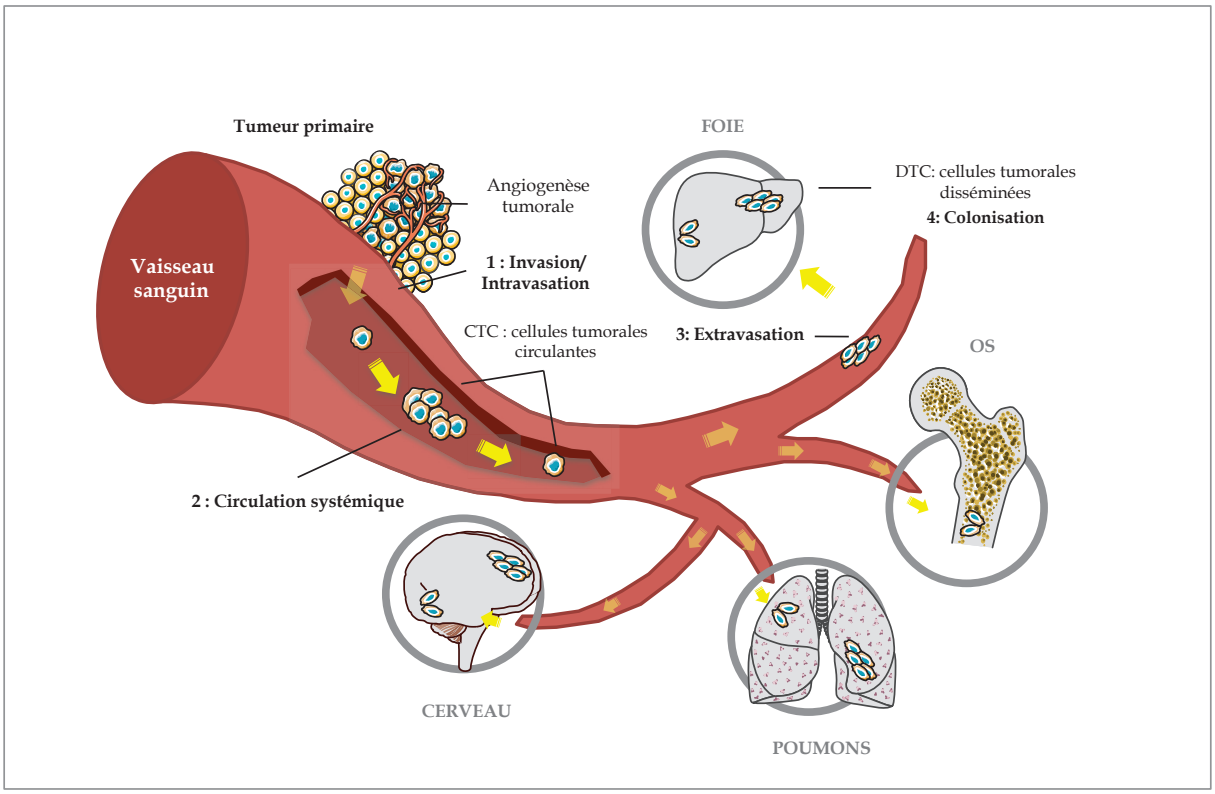


Figure 10. Principales étapes de la cascade métastatique du cancer du sein.

1 : Les cellules de la tumeur primaire induisent la formation de nouveaux vaisseaux et, en perdant leur capacité d'adhésion, acquièrent un phénotype migratoire qui leur permet d'envahir le système vasculaire. **2** : Les cellules tumorales circulantes (CTC) peuvent alors coloniser d'autres organes grâce à la circulation sanguine et leur association avec les plaquettes sanguines. **3 :** Au niveau de l'organe cible, les cellules métastatiques interagissent avec les cellules endothéliales sur la paroi vasculaire ce qui permet leur extravasation. **4 :** Les cellules tumorales disséminées (DTC) colonisent le nouvel environnement pour former des métastases **(Modifié d'après, Science et Avenir, 2016).**

2.1. Transition épithélio-mésenchymateuse et invasion locale (EMT)

L'échappement de la tumeur primaire par l'invasion du réseau sanguin et/ou lymphatique est la première étape à franchir pour amorcer le processus métastatique. Seules les cellules tumorales ayant acquis des propriétés migratoires et protéolytiques peuvent réaliser cette première phase. La transition d'un phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux est l'un des mécanismes d'invasion déployés par les cellules tumorales pour se désolidariser de la tumeur primaire. Elle est accompagnée de la dégradation du stroma péri-tumoral par des protéases.

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un exemple de mécanisme physiologique mis en place durant l'embryogenèse qui est réactivé durant le processus tumoral. Il induit le passage d'un phénotype épithélial prolifératif à un

phénotype mésenchymateux invasif. Cette transition est marquée moléculairement par la perte de protéines impliquées dans les jonctions d'adhérence comme l'E-cadhérine et la β-caténine membranaire [67]. La régulation négative de l'expression de ces protéines d'adhérence est induite par les facteurs de transcription SNAIL, ZEB 1 (zinc-finger E-box-binding) ainsi que TWIST et est accompagnée de l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine et la vimentine. Ces deux molécules active un réarrangement du cytosquelette d'actine *via* l'activation de RAC1 (Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1) et CDC42 (Cell Division Control Protein 42 Homolog) [67]. De nombreux arguments expérimentaux montrent que l'EMT précède et accompagne l'acquisition de propriétés invasives. En effet, l'accumulation du facteur TWIST est directement corrélée aux capacités invasives dans des cellules de carcinomes mammaires murins [68]. De manière similaire, une augmentation du facteur TWIST induite par l'activation du récepteur HER2, favorise la dissémination métastatique précoce des cellules de cancer du sein murines par la régulation négative de l'E-cadhérine et de la β-caténine membranaire [69].

L'accessibilité aux tissus voisins et à la circulation sanguine est également déterminée par la capacité des cellules tumorales à dégrader la matrice extracellulaire sur laquelle elles reposent. Cette dégradation repose essentiellement sur l'activité des MMP d'origine tumorale (MMP7 et MMP3) et stromale (MMP2 et MMP9). La sécrétion d'interleukines et de facteurs de croissance par les cellules tumorales stimule la production de MMP par les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules du système immunitaire [70]. Le niveau de production des MMP est d'ailleurs corrélé au potentiel invasif et agressif des cellules tumorales [71].

2.2. Intravasation : Cellules tumorales circulantes (CTCs)

Lorsque les cellules tumorales acquièrent une phénotype migratoire, celles-ci migrent vers les tissus voisins et la circulation sanguine périphérique et/ou intra-tumorale mise en place lors de l'angiogenèse tumorale [72]. En effet, les cellules tumorales sont capables, pour leurs besoins métaboliques, d'induire la formation de nouveaux vaisseaux au sein de la tumeur par la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Cette néovascularisation tumorale est caractérisée par

une organisation et des dimensions vasculaires anarchiques ainsi qu'une perméabilité vasculaire accrue. Ces caractéristiques morphologiques facilitent la dissémination des cellules tumorales dans la circulation sanguine [73].

La demi-vie des CTCs est relativement courte. Elles doivent, en effet, résister à la pression élevée de la circulation sanguine et échapper à la surveillance exercée par le système immunitaire. De plus, les CTCs doivent devenir insensibles aux signaux de mort programmée induits par la perte d'adhérence sur un substrat, mécanisme connu sous le nom d'anoïkis [74]. Dans la circulation, les CTCs sont en contact avec les éléments figurés du sang (plaquettes sanguines et leucocytes). La constitution d'agrégats plaquettaires permettrait aux cellules tumorales de résister aux forces de cisaillement exercés par la pression sanguine et d'échapper à une reconnaissance par le système immunitaire [75]. La détection des CTCs dans la circulation sanguine est une fenêtre d'étude supplémentaire de la dissémination métastatique, notamment dans le cas de tumeurs discrètes. Dans le cancer du sein, la présence de CTCs est d'ailleurs corrélée à un mauvais pronostique chez les patientes [76].

2.3. Extravasation et invasion : Cellules tumorales disséminées (DTCs)

La colonisation d'un nouvel organe depuis la circulation sanguine nécessite l'arrêt et la traversée, une nouvelle fois, de la barrière endothéliale par les CTCs. Pour envahir le tissu, les cellules tumorales semblent capables de mimer partiellement les mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales lors du processus d'inflammation. Les CTCs produisent certaines cytokines inflammatoires comme le TNF-α qui stimulent la production de E-selectine par les cellules endothéliales et l'interaction des CTC avec la paroi vasculaire. L'arrêt des CTC serait quant à elle médiée par l'interaction des intégrines tumorales capable d'adhérer à un endothélium activé [77].

Dans l'organe secondaire, les cellules tumorales sont confrontées à un environnement différent de celui de la tumeur primaire. Plusieurs phénomènes biologiques peuvent se produire. Les cellules tumorales peuvent être éliminées par le système immunitaire présent dans le tissu hôte, ou bien par apoptose et dans le cas contraire, entrer dans un état de dormance cellulaire dans lequel elles vont persister sans proliférer. Dans le cas de micrométastases osseuses provenant de cancer du sein,

cet état peut perdurer des années après la détection des lésions primaires [78]. Au cours de la dormance dans le tissu hôte, les DTCs ne sont pas détectables par les techniques d'imagerie conventionnelle et ne génèrent aucune lésion ce qui rend complexe le diagnostic et la prise en charge des patientes. Grâce aux innovations techniques, il est maintenant possible de détecter et d'isoler les DTCs dans la moelle osseuse de patientes atteintes de carcinomes mammaires [79].

Contrairement aux CTCs, les macrométastases induites dans les carcinomes présentent les mêmes traits phénotypiques épithéliaux que la tumeur primaire. Le concept de transition mésenchymo-épithéliale a donc été envisagé et des données expérimentales ont permis d'appuyer l'existence et la nécessité de ce mécanisme. En effet, l'utilisation d'un système inductible pour TWIST dans un modèle de carcinome murin montre que l'activation de l'EMT favorise l'invasion. Cependant, sa répression est essentielle au niveau de l'organe secondaire pour former des macrométastases [80]. De la même manière, la répression d'un autre inducteur de l'EMT, le facteur de transcription PRRx1 (Paired-Related Homeobox 1) dans une lignée de cancer du sein est nécessaire pour un retour vers un phénotype épithélial et la formation de métastases [81].

3. DISSEMINATION METASTATIQUE OSSEUSE

L'apparition de métastases osseuses peut résulter de la dissémination métastatique de tumeurs primaires provenant de différents cancers dont ceux du sein et de la prostate. En effet, une grande majorité des patientes avec un cancer du sein à un stade avancé développeront des métastases osseuses. Cet ostéotropisme implique des mécanismes communs aux autres tropismes métastatiques, comme ceux cités dans les paragraphes précédents, mais aussi des mécanismes très spécifiques qui détermineront le tropisme (niche pré-métastatique, chimiotactisme et nidation) l'adaptation et l'interaction des cellules tumorales avec le microenvironnement osseux permettant la formation des macrométastases osseuses.

La localisation préférentielle des cellules tumorales issues d'un cancer du sein a été premièrement abordée par Paget en 1889. Sa théorie du « seed and soil » suggérait que la localisation des métastases n'était pas un évènement aléatoire mais que les cellules tumorales disséminées ne pouvaient se développer que dans les

organes favorables à leur croissance [82]. Depuis, d'autres études ont renforcé cette théorie et montrent que la localisation des futures métastases peut être déterminée par des facteurs secrétés depuis la tumeur primaire qui créent dans le futur organe un environnement favorable à la colonisation métastatique [83]. La localisation spécifique des cellules tumorales serait également associée à une signature moléculaire spécifique de la tumeur primitive. L'équipe du Dr. Massagué a effectivement démontré que l'expression de gènes initialement identifiés pour leur implication dans la physiologie osseuse comme CXCR4, l'IL-11 et le CTGF (Connective Tissue Growth Factor) pouvait être responsable de l'adressage spécifique des cellules tumorales dans le tissu osseux [84].

3.1. Niche pré-métastatique

La notion de niche pré-métastatique décrit la préparation à distance, du futur foyer métastatique par l'action de facteurs dérivés de la tumeur primaire. Ces composants tumoraux vont agir sur les cellules résidentes de l'organe secondaire et vont conduire à une modulation du stroma local et de la matrice extracellulaire créant un micro-environnement approprié pour la colonisation des cellules métastatiques. Le modèle expérimental du Dr. Kaplan illustre cette notion et montre que les cellules métastatiques de carcinomes pulmonaires injectées dans des souris traitées avec du milieu conditionné de mélanome métastasent dans des organes habituellement ciblés par les cellules métastatiques de mélanome [85]. Au niveau cellulaire, les facteurs tels que le VEGF-A et le PlGF (Placental Growth Factor), produits par la tumeur primaire, induisent le recrutement, dans l'organe secondaire, de précurseurs hématopoïétiques exprimant le récepteur VEGFR1 ainsi que des progéniteurs endothéliaux et des macrophages. Ce regroupement cellulaire dans l'organe secondaire modifie le microenvironnement local et entraîne la production d'autres molécules comme MMP9 et CXCL12 qui seraient responsables du recrutement local des cellules tumorales circulantes [85].

L'OPN produit par les cellules tumorales de carcinome mammaire module également l'environnement local en recrutant les cellules dans la moelle osseuse [86] tandis que la PTHrP (Parathyroid Hormone-Related Protein) favorise la dégradation osseuse et l'accumulation de facteurs locaux comme la chimiokine pro-inflammatoire

CCL2 (C-C Motif Ligand 2), [87]. La LOX (Lysyl oxydase) est un autre facteur bien décrit dans la formation de la niche pré-métastatique, notamment par la capacité de cette enzyme à rigidifier et réticuler les fibres de collagène dans l'os. Cette réorganisation architecturale fournit aux cellules tumorales un point d'ancrage et facilite ainsi la colonisation métastatique [88]. De plus, la présence de la LOX dans l'environnement osseux induit le recrutement de cellules précurseur myéloïdes CD11b+. Ces cellules présentent la particularité de sécréter la MMP2 qui clive le collagène et favorise l'invasion des cellules tumorales [88].

3.2.Migration des cellules tumorales vers le tissu osseux

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la migration des cellules tumorales métastatiques font intervenir des récepteurs dont les ligands sont abondamment produits dans la moelle osseuse. La chimiokine CXCL12 est fortement impliquée dans ce processus, elle est produite par de nombreuses cellules au sein de l'os, comme les ostéoblastes, les cellules endothéliales et les CSM [34]. Cette chimiokine confère aux cellules tumorales qui expriment le récepteur CXCR4 à leur surface une propension à migrer vers le tissu osseux à travers l'activation du cytosquelette d'actine et la formation de pseudopodes. CXCR4 est d'ailleurs associé au caractère métastatique des cellules tumorales puisqu'il n'est pas détecté dans les cellules épithéliales mammaires saines tandis qu'il est retrouvé fortement exprimé dans les cellules tumorales qui colonisent l'os [84]. Cette observation est d'ailleurs confirmée en clinique où l'expression de CXCR4 est corrélée à un mauvais pronostic et un risque élevé de rechute métastatique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein [89]. Expérimentalement, son inhibition par un agent pharmacologique, le CTCE-9908, ou bien par un anticorps neutralisant, diminue la formation de métastases osseuses chez la souris [90], [91]. A l'inverse, sa sur-expression augmente la capacité des cellules tumorales à coloniser l'os [84].

La molécule RANKL, produite par les ostéoblastes, est également impliquée dans le tropisme osseux des cellules tumorales. Elle existe sous une forme soluble grâce à l'action de métalloprotéases matricielles (MMP-7 et MMP-13) ou membranaire (MT-MMP-1) et permettrait la stimulation de la migration et l'attraction des cellules tumorales qui possèdent le récepteur RANK [92], [93]. *In*

vitro, l'équipe du Dr. Jones a mis en évidence le pouvoir chimio-attractant du RANKL sur des cellules tumorales originaires de la prostate et du sein [94]. De la même manière que CXCR4, la détection du récepteur RANK est corrélée à un diagnostic défavorable dans le cas de cancers du sein [95].

Enfin, le calcium qui est libéré de la matrice osseuse lors du remodelage, est un autre médiateur de la migration des cellules tumorales vers l'os. Ceci est illustré *in vitro* où le calcium stimule la migration des cellules de cancer du sein et de la prostate qui expriment le récepteur CASR [96].

3.3. Nidation des cellules tumorales dans la moelle osseuse

A l'instar des mécanismes activés lors du tropisme osseux, une hypothèse propose que les DTCs et les CSH utilisent des mécanismes moléculaires similaires pour se loger dans les niches de la moelle osseuse. Des arguments expérimentaux montrent en effet que les cellules tumorales dans l'os entrent en concurrence pour occuper les mêmes sites que les CSH. Ce phénomène de compétition est bien démontré dans l'étude du Dr. Shiozawa où une diminution de la colonisation de l'os par les CSH est observée lorsque celles-ci sont injectées simultanément avec des cellules cancéreuses de prostate possédant le récepteur CXCR4 [97]. Les antagonistes de la voie CXCR4/CXCL12 tels que l'AMD3100 et le G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) mobilisent les CSH dans la circulation sanguine et augmente le développement des métastases osseuses. De plus, les CSH sont davantage détectées dans la circulation sanguine chez les souris présentant des micrométastases osseuses [97].

La mobilisation des cellules cancéreuses hors de la moelle osseuse de souris métastatiques par des antagonistes de la voie CXCR4/CXCL12 montre l'importance de ce couple dans l'ancrage des cellules tumorales dans l'os [97]. Ce n'est cependant pas le seul récepteur impliqué dans ce processus. Les intégrines αVβ3 et αVβ5 sont également des médiateurs importants de l'ancrage osseux car elles sont capables de se lier à l'OPN et aux sialoprotéines osseuses largement présentes dans la matrice minéralisée [98]. L'intégrine αVβ3 est exprimée par les cellules cancéreuses de la prostate et du sein. Son inhibition par un antagoniste pharmacologique inhibe la formation des métastases osseuses [99]. A l'inverse, sa sur-expression favorise la

formation de lésions osseuses et confère un tropisme osseux aux cellules tumorales, ne ciblant habituellement pas l'os [100]. Une étude récente montre que les DTC exprimant l'E-Cadhérine s'associent aux cellules stromales mésenchymateuses qui expriment la N-Cadhérine. Cette liaison hétérotypique montrée *in vitro* par co-culture et *in vivo* par co-injection favoriserait l'adhésion des cellules tumorales et leur prolifération dans la niche ostéogénique osseuse [101].

3.4. Ostéomimétisme et dormance

La survie et le développement des cellules tumorales dans l'organe secondaire sont les étapes les plus sélectives du processus métastatique. L'adaptation des cellules tumorales dans l'environnement osseux est donc une condition essentielle pour la formation de macrométastases. L'étude immunohistochimique et transcriptomique des tumeurs primaires et des métastases associées montre que les DTCs de cancer du sein sont capables d'acquérir un phénotype osseux principalement ostéoblastique, on parle d'ostéomimétisme. Ce phénotype marqué par la production ectopique de protéines spécifiques des ostéoblastes (OPN, OPG, cadhérine 11, RUNX2) favoriserait l'adaptation des cellules tumorales et la colonisation de l'environnement osseux [102]. L'importance de l'ostéomimétisme dans le développement de métastases osseuses n'est pas clairement définie. Néanmoins, la modulation de l'activité du facteur de transcription RUNX2 dans les cellules tumorales semble influencer la survenue des métastases osseuses. En effet, son inhibition dans des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 réduit l'apparition de lésions ostéolytiques [103] tandis que sa modulation dans les cellules tumorales de la prostate PC3 présente des effets inverses [104]. De plus, RUNX2 favoriserait la colonisation osseuse des cellules de cancer du sein à travers l'activation de l'expression de l'intégrine α5 [105].

Les observations cliniques montrent que les DTCs ne prolifèrent pas immédiatement une fois dans l'organe secondaire. Actuellement, trois principaux mécanismes sont proposés pour expliquer l'existence d'une « pause » au cours de la prolifération tumorale : (i) une immunosurveillance par le système immunitaire [106] ; (ii) une modification de l'environnement angiogénique (switch angiogénique) [107] ; (iii) un effet inhibiteur du nouveau microenvironnement tumoral [108].

Le passage d'une vasculature stable à prolifération connu sous le nom de « switch angiogénique » régule la dormance des DTCs dans l'environnement osseux. En effet, une étude récente montre que l'endothélium stable produit de la TSP1 (Thrombospondine 1) qui inhibe la prolifération des cellules tumorales et les maintient dans un état de dormance cellulaire tandis que l'endothélium actif produit abondamment du TGF-β1 et de la périostine qui activent la prolifération des DTCs [107]. L'environnement stromal participe également à la dormance des cellules cancéreuses originaires de la prostate à travers la signalisation du TGF-β2 et de BMP7 et l'induction de la MAP Kinase P38 [109], [110]. Enfin la production de la protéine GAS6 (Growth Arrest-Specific 6) par les ostéoblastes favorise la quiescence des cellules tumorales de la prostate qui présentent les récepteurs Axl, Sky et Mer à leur surface [111].

L'ensemble des molécules décrites précédemment et leurs interactions sont résumés dans la **figure 11**.

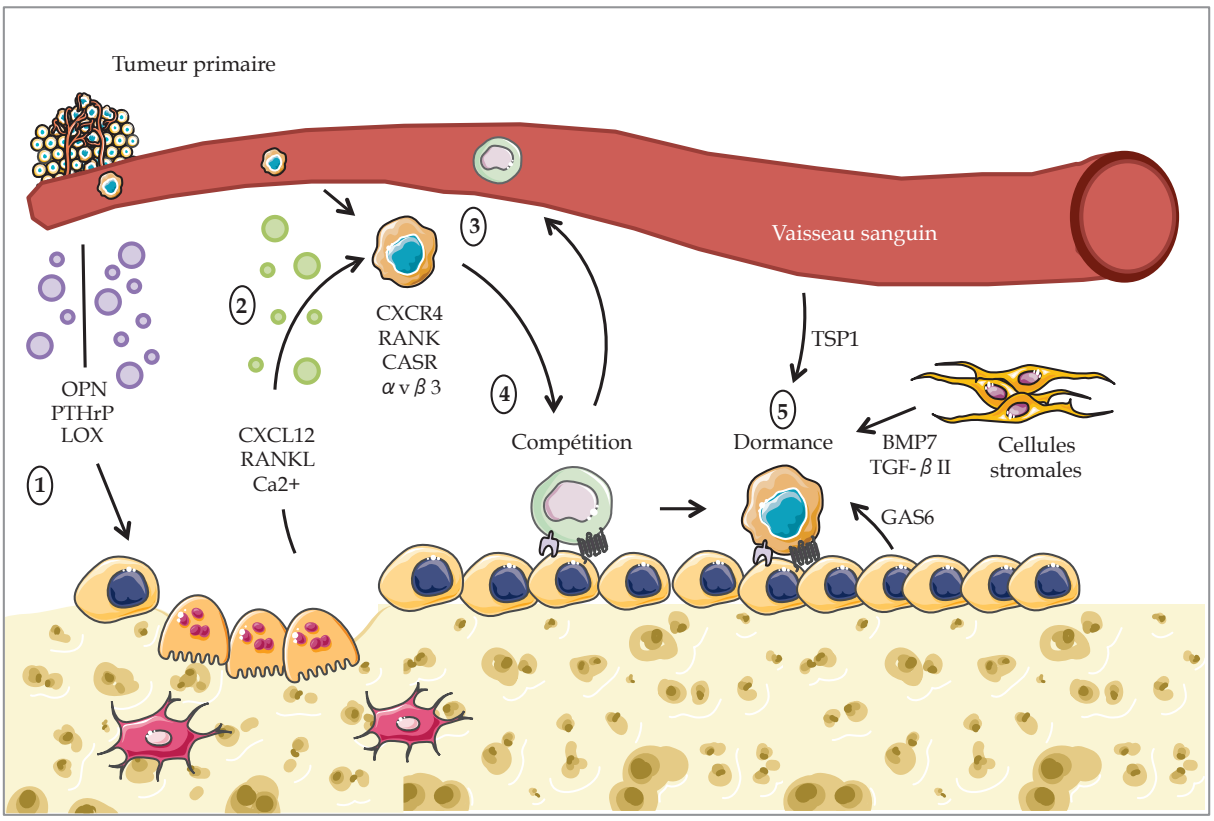


Figure 11. Les étapes de la colonisation osseuse par les cellules tumorales.

1 : Les cellules tumorales depuis la tumeur primaire produisent des facteurs qui modulent l'environnement osseux et favorisent la colonisation métastatique. **2 et 3 :** Les cellules tumorales sont attirées par des niveaux élevés de chimioattractant produit par l'environnement osseux comme CXCL12, RANKL et le calcium. **4 :** Dans la niche ostéogénique, les cellules tumorales et les cellules souches hématopoïétiques entrent en compétition pour leur fixation aux ostéoblastes *via* le couple CXCL12/CXCR4. Les récepteurs comme la E-cadhérine et RANK participent également à l'adhérence des cellules tumorales au site osseux à travers leur fixation avec la N-cadhérine et RANKL produits par les ostéoblastes. **5 :** les DTCs, une fois dans l'os, sont soumises à des signaux environnementaux qui régulent leur prolifération et les maintiennent dans un état de dormance cellulaire. C'est le cas de la Thrombospondine 1 produite par la niche vasculaire, mais aussi d'autres molécules produites par l'environnement stromal telles que BMP7, le TGF-βII et GAS6.

4. FORMATION DES METASTASES OSTEOLYTIQUES

Les DTCs qui survivent et s'adaptent à l'environnement osseux vont ensuite proliférer et former des macrométastases. Deux types de métastases osseuses existent selon les interactions qu'entretiennent les cellules tumorales avec les ostéoclastes et les ostéoblastes. Les métastases sont dites ostéolytiques lorsque leur présence stimule la résorption osseuse au détriment de la formation osseuse. C'est principalement ce

qui se produit dans les carcinomes mammaires et les myélomes multiples. Dans le cas contraire, lorsque la résorption osseuse est inhibée en faveur de la formation osseuse, les métastases sont alors ostéocondensantes. Ce type de lésions est plus fréquemment associé au cancer de la prostate **(Figure 12)**.

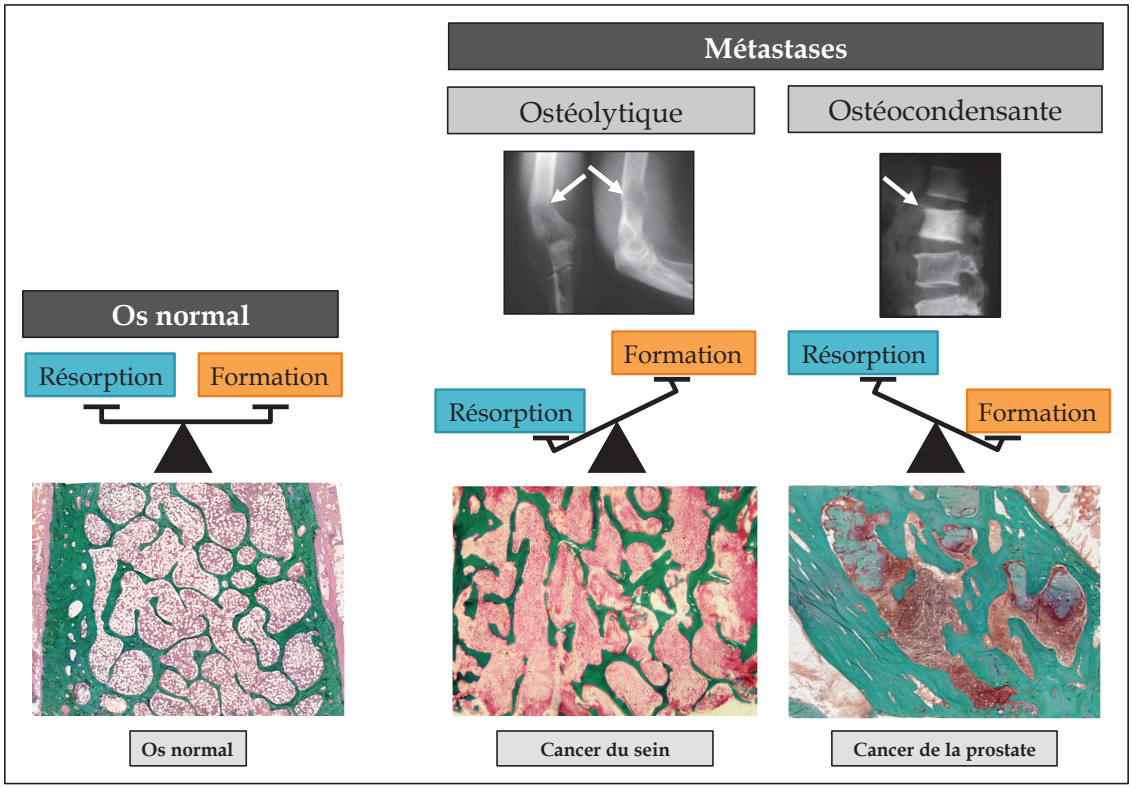


Figure 12. Visualisation de l'os en conditions physiologiques et métastatiques en radiographie et en histologie.

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

Dans le cas des métastases ostéolytiques, les cellules de cancer du sein dans l'os altèrent les signaux moléculaires qui régulent habituellement le remodelage osseux. La conséquence est une stimulation accrue de l'ostéoclastogenèse et de la résorption osseuse et une inhibition de la formation osseuse. Cette destruction massive de l'os entraîne la libération de facteurs emprisonnés dans la matrice osseuse qui stimuleront à leur tour la croissance des cellules tumorales. Cet entretien mutuel entre croissance tumorale et résorption osseuse est nommé « cercle vicieux » **(Figure 13).**

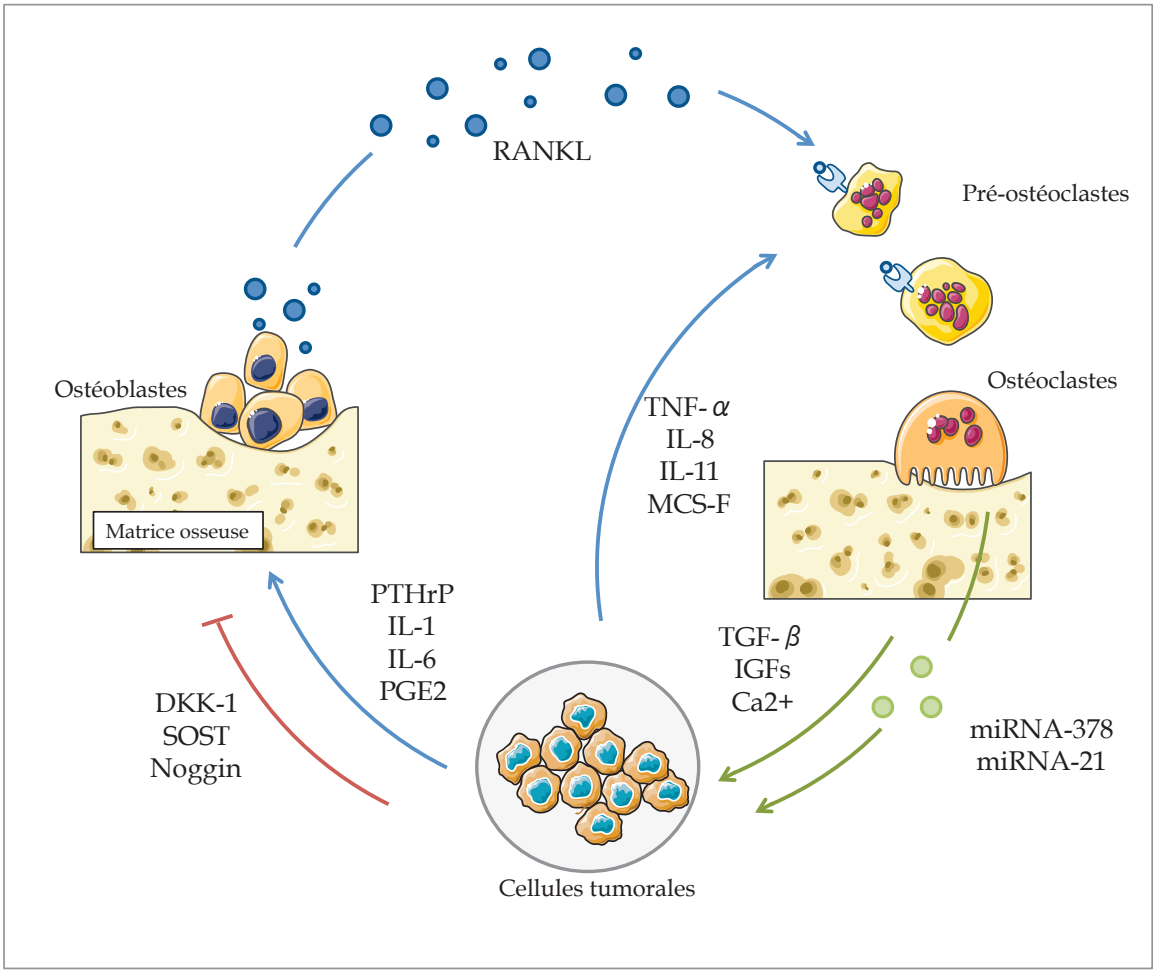


Figure 13. Cercle vicieux des métastases osseuses ostéolytiques.

Dans l'os, les cellules métastatiques produisent différents facteurs qui stimulent la différentiation et l'activité des ostéoclastes (flèches bleues) et favorisent la résorption osseuse. Les facteurs de croissance osseux libérés lors de la résorption ainsi que des miRNA sécrétés par les ostéoclastes favorisent la croissance tumorale (flèches vertes). En parallèle, les cellules tumorales produisent des facteurs (DKK-1, SOST et Noggin) qui inhibent la différenciation ostéoblastique et la formation osseuse ce qui contribue à la perte osseuse (flèches rouges).

4.1. Activation de la résorption osseuse

Le mécanisme de régulation de la résorption osseuse, composé du trio moléculaire RANK/RANKL et OPG, est le médiateur principal de la perte osseuse induite par les métastases. Dans des conditions physiologiques, un rapport équilibré entre RANKL et l'OPG permet une régulation de l'ostéoclastogenèse et de la résorption osseuse. Seulement, lors de la formation de métastases ostéolytique cet équilibre est altéré. En effet, les cellules tumorales sécrètent des facteurs qui stimulent la production de RANKL par les ostéoblastes et parallèlement inhibent la synthèse d'OPG, ce qui conduit à une différentiation et une activation exacerbée des

ostéoclastes **(Figure 14)**. Ce détournement moléculaire est confirmé expérimentalement : lors du traitement de souris métastatiques avec un anticorps dirigé contre RANKL une diminution des lésions osseuses est observée [112]. Les cellules tumorales stimulent également la résorption osseuse indépendamment de la voie RANK/RANKL par la production de facteurs qui favorisent directement la différentiation et l'activité des ostéoclastes.

La PTHrP est un des facteurs dérivés des cellules tumorales qui va stimuler indirectement la dégradation osseuse. Sa forte homologie de séquence avec la PTH lui permet de fixer le récepteur PTH1R à la surface des ostéoblastes ce qui induit la production de RANKL et stimule la différentiation ostéoclastique et la résorption osseuse [113]. De plus, le traitement par un anticorps ciblant la PTHrP entrave la formation de métastases osseuses tandis que sa sur-expression dans des cellules de carcinome mammaire MDA-MB-231 entraîne la formation de lésions ostéolytiques dans un modèle murin de métastases osseuses [114], [115].

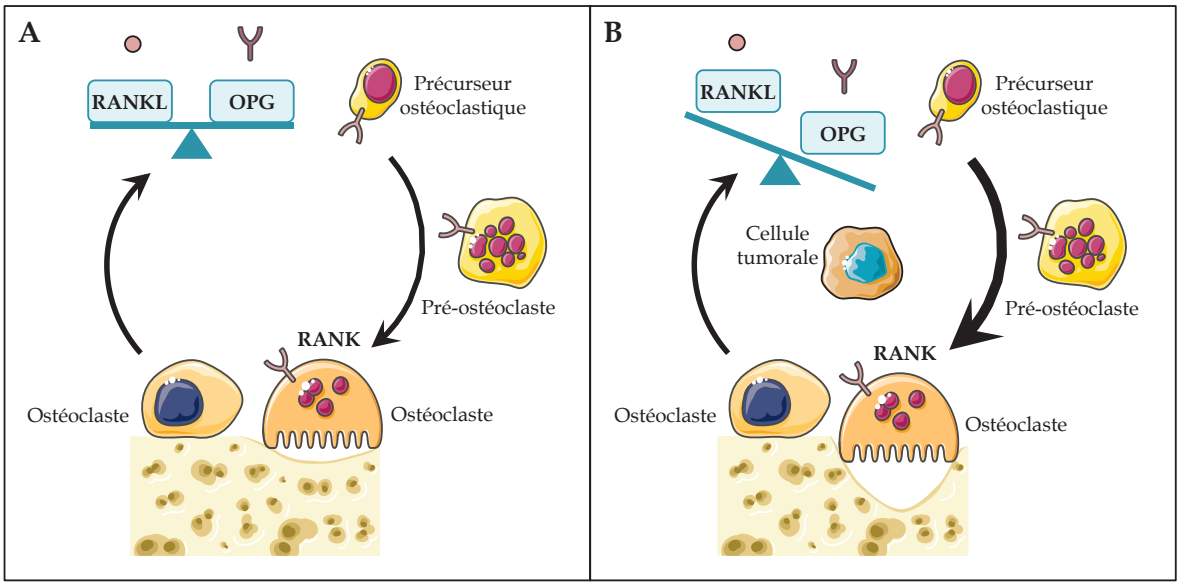


Figure 14. Rôle de la triade RANK/RANKL/OPG dans la formation des métastases osseuses.

A. Au cours du remodelage osseux, RANKL, qui est exprimé à la surface des ostéoblastes, s'associe au récepteur membranaire RANK présent à la surface des ostéoclastes et de ses précurseurs. Cette interaction stimule la différenciation et l'activité des ostéoclastes qui conduit à la résorption osseuse. Cette activité de résorption est régulée négativement par l'ostéoprotégérine (OPG) qui, en piégeant le RANKL, bloque l'interaction RANK/RANKL. **B.** Au cours de la formation des métastases osseuses, la balance RANKL/OPG est déséquilibrée. Les cellules tumorales stimulent la production de RANKL par les ostéoblastes et inhibent celle de l'OPG ce qui augmente la résorption osseuse. **(Modifié d'après Clézardin 2011)**

Les interleukines comme l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-11 impliquées physiologiquement dans l'ostéoclastogenèse [116] sont également fortement produites par les cellules tumorales qui métastasent spécifiquement à l'os [84], [117], [118]. Ces interleukines stimulent la résorption osseuse de deux façons : indirectement où elles vont agir sur les ostéoblastes en stimulant l'expression de RANKL et en inhibant la synthèse d'OPG ou bien directement en stimulant la différentiation ostéoclastique [118], [119].

Les MMPs, produites par les cellules tumorales, influencent la destruction osseuse médiée par les ostéoclastes en déséquilibrant le ratio RANKL/OPG dans l'environnement osseux. MMP-7 favorise l'augmentation locale de RANKL actif lors de son clivage à la surface des ostéoblastes et des cellules tumorales [92] tandis que les MMP-1 et ADAMTS1 (ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif) solubilisent des ligands de l'EGFR qui vont réduire la production d'OPG en se fixant sur les ostéoblastes [120].

D'autres mécanismes impliquant des communications juxtacrines sont décrits pour induire l'ostéolyse tumorale. Les cellules MDA-B02, qui sont fortement ostéotropiques, peuvent s'associer et activer les plaquettes sanguines qui vont alors produire du LPA (Lysophosphatidic Acid). Le LPA va alors stimuler la prolifération et la sécrétion d'interleukines pro-ostéoclastiques telles que l'IL-6 et IL-8 [121]. La libération d'IL-6 est également stimulée par la liaison de Jagged1 présent à la surface des cellules tumorales avec son récepteur Notch produit par les ostéoblastes. L'association de Jagged1 avec Notch peut aussi directement promouvoir la différentiation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures [122]. Ces données sont cohérentes avec ce qui est observé en clinique puisque l'augmentation de Jagged1 est corrélée avec un risque de rechute métastatique à l'os [122].

4.2. Inhibition de la formation osseuse

Lors de la formation des métastases osseuses, les ostéolyses sont le résultat d'une différenciation et d'une activation excessive des ostéoclastes, mais pas seulement. L'inhibition des ostéoblastes par des facteurs dérivés des cellules tumorales contribue également au déséquilibre entre résorption et formation osseuse conduisant à la destruction massive de l'os. L'inhibition de la différentiation ostéoblastique est liée à la production par les cellules tumorales de cancer du sein et

de la prostate de la protéine DKK-1 et de SOST, deux inhibiteurs de la voie WNT [123]. Le traitement par des anticorps neutralisants ciblant l'une ou l'autre de ces protéines, dans des modèles de myélomes multiples, est suffisant pour restaurer les fonctions ostéoblastiques et prévenir le développement d'ostéolyse [124], [125].

Les cellules tumorales ostéolytiques du sein et de la prostate produisent également un facteur soluble, Noggin [126]. Il s'agit d'un antagoniste des BMPs, lesquelles favorisent physiologiquement la translocation nucléaire de SMAD1 et SMAD5, décrite pour activer l'expression des gènes codant pour les facteurs de transcription RUNX2 et OSX [127]. Il est d'ailleurs observé une croissance réduite des métastases osseuses formées par les cellules métastatiques de la prostate PC3 lorsque celles-ci sont déplétées en Noggin [128].

4.3. Contribution du tissu osseux

Le tissu osseux est un réservoir important de facteurs de croissance représenté principalement par le TGF-β et l'IGF. Lors de la résorption osseuse, le TGF-β libéré de la matrice agit sur les cellules tumorales et stimule, à travers la signalisation des SMAD, la production des facteurs pro-ostéoclastiques comme l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-11 mais aussi de la PTHrP [129]. Le TGF-β actif libéré stimule également l'expression de Jagged 1 par les cellules tumorales ce qui active, par le biais de Notch présent sur les ostéoblastes et les ostéoclastes, la croissance tumorale [122]. Physiologiquement le TGFβ inhibe l'ostéoblastogenèse et active l'ostéoclastogenèse [130]. Dans un contexte métastatique, l'accumulation de TGF-β dans l'environnement osseux, contribuerait donc à la destruction osseuse médiée par les ostéoclastes et à l'alimentation du « cercle vicieux ».

Les IGFs libérés lors de la dégradation osseuse sont également impliqués dans la progression du cancer du sein [131]. Leur fixation sur les récepteurs IGFR de type I à la surface des cellules tumorales favorise la prolifération, l'invasion et l'inhibition de l'apoptose lors de la formation de métastases osseuses induites par les cellules MDA-MB-231 [132]. De plus, l'inhibition de la voie IGF/IGFR par l'utilisation d'un dominant négatif du récepteur IGFRI réduit la formation de métastases osseuses chez la souris [133].

Outre les facteurs de croissance, le calcium est fortement présent dans la matrice osseuse et sa concentration peut être 40 fois plus importante lors de la résorption [134]. Le récepteur CASR est produit par les cellules cancéreuses du sein et de la prostate et son activité induite par le calcium stimule la synthèse de la PTHrP [135], [136] et la prolifération *in vitro* [137]. L'inhibition du récepteur CASR par l'expression d'un dominant négatif dans les cellules de cancer de la prostate inhibe la production de PTHrP et par conséquence la formation des métastases osseuses chez la souris [135]. La dégradation de la matrice osseuse n'est pas l'unique mécanisme par lequel les ostéoclastes participent à la formation des macrométastases osseuses. Ils sécrètent également des exosomes contenant des miRNA qui vont stimuler la prolifération des cellules tumorales. C'est le cas du miRNA-378 qui favorise l'angiogenèse et la survie des cellules tumorales *via* l'inhibition des suppresseurs de tumeur SuFu et Fus-1 [138], [139].

L'ensemble des évènements depuis l'échappement de la tumeur primaire jusqu'à la formation d'une métastase osseuse ostéolytique est récapitulé dans la **figure 15**.

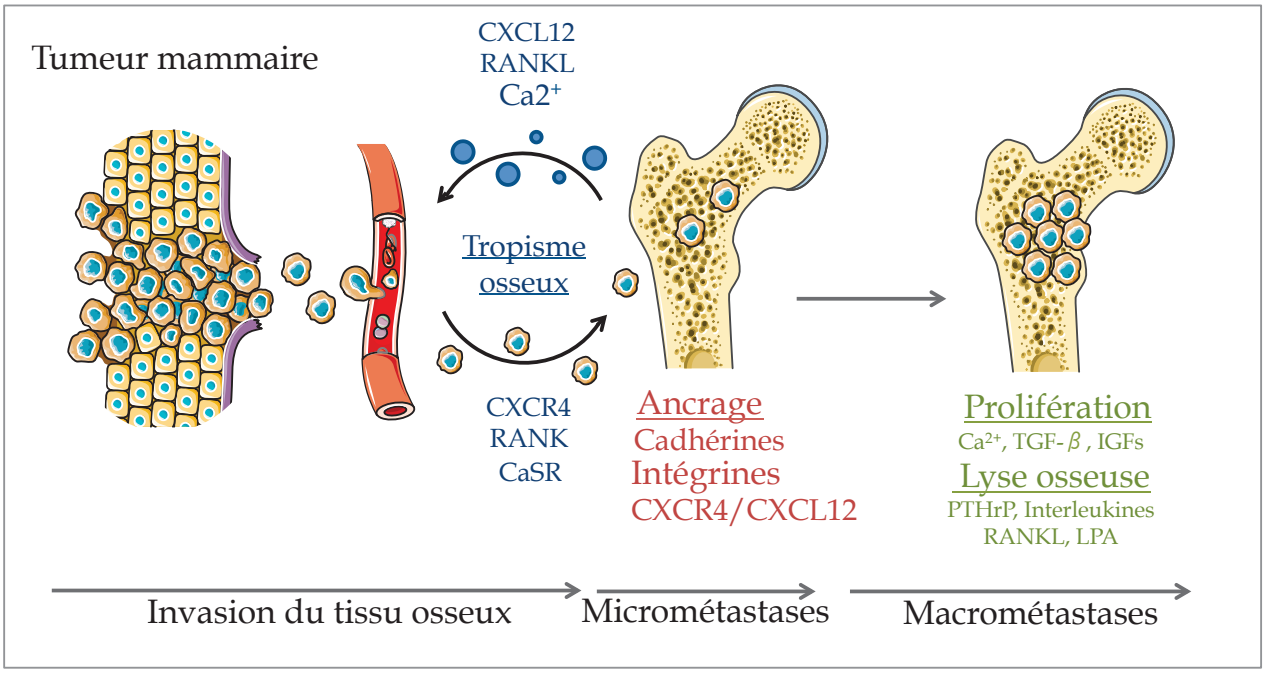


Figure 15. Les étapes et molécules clés du processus des métastases osseuses ostéolytiques. **(Facteurs bleus et rouges).** Mécanismes précoces de dissémination des cellules dans la moelle osseuse (chimiotactisme, invasion et ancrage). **(Facteurs verts).** Mécanismes mis en place dans l'environnement osseux (prolifération et lyse osseuse) responsables de la formation des métastases.

5. TRAITEMENTS DES METASTASES OSSEUSES

L'os est l'un des organes le plus fréquemment ciblé par les métastases. C'est le cas lorsque les patients développent un cancer du sein ou de la prostate. La morbidité liée à ces deux types de cancers n'est plus due au développement primaire de la tumeur mais à la formation de métastases osseuses qui causent chez les patients de graves complications métaboliques (hypercalcémie) et squelettiques (fracture, compression nerveuse). Malgré la fréquence d'apparition des métastases osseuses, les options de traitements proposés ne sont efficaces que pour traiter les symptômes et ne permettent actuellement pas d'éliminer complétement les métastases.

Les thérapies actuelles ciblent principalement les ostéoclastes pour retarder l'apparition de métastases osseuses et réduire la dégradation osseuse. Néanmoins, il est maintenant bien admis que les cellules tumorales orchestrent la destruction de l'os non seulement par l'activation des ostéoclastes mais aussi par l'inhibition des ostéoblastes. Une meilleure compréhension des relations qu'entretiennent les cellules tumorales avec l'environnement osseux pourrait donc permettre de dégager de nouvelles pistes thérapeutiques.

5.1. Thérapies actuelles

Lors de la prise en charge des patients présentant des métastases osseuses, deux classes de molécules peuvent être prescrites, toutes deux ralentissant l'action des ostéoclastes pour limiter la résorption du tissu osseux. Il s'agit des bisphosphonates et de l'anticorps monoclonal anti-RANKL commercialisé sous le nom de Dénosumab.

Les bisphosphonates de 3^{ième} génération, dont le zolédronate, sont des agents pharmacologiques analogues au pyrophosphate inorganique. Cette particularité structurale leur confère une affinité importante pour l'os et permet leur fixation sur les zones de remodelage osseux. Lors de la résorption, les bisphosphonates sont internalisés par les ostéoclastes et inhibent spécifiquement la farnésyl pyrophosphate synthase, une enzyme clé de la voie du mévalonate. L'inhibition de cette voie cellulaire ne permet plus la prénylation des petites GTPases impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine ce qui induit la perte d'adhérence et l'apoptose des ostéoclastes [140]. Les bisphosphonates sont prescrits en clinique pour

prévenir la perte osseuse médiée par les ostéoclastes, seulement, des évidences précliniques et cliniques suggèrent également un effet anti-tumoral des bisphosphonates. En situation néoadjuvante, l'utilisation du zolédronate réduit de 40% la survenue de métastases osseuses. De plus, son couplage thérapeutique avec une chimiothérapie réduit le nombre de patientes présentant des DTCs trois mois après leur détection [141], [142]. Il a été montré que le zolédronate est capable d'agir sur *in vitro* sur l'angiogenèse et activer une catégorie de lymphocytes T cytotoxiques, les Vγ9Vδ2 [143], [144]. De plus, il a récemment été montré que les bisphosphonates pouvaient aussi agir hors du site osseux en ciblant les macrophages associés aux tumeurs [145].

Le dénosumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre RANKL, fait l'objet depuis 2011 d'une autorisation de mise sur le marché. Il permet, comme les bisphosphonates, de réduire la lyse osseuse de patientes présentant des métastases notamment en inhibant la maturation des ostéoclastes médiée par la voie RANK/RANKL [146]. Cliniquement, le dénosumab permet de réduire efficacement la perte osseuse et la progression des métastases chez les patientes diagnostiquées pour un cancer du sein [147] et une récente étude clinique montre que son administration à long terme ne présente pas de risque supplémentaire y compris pour les patientes auparavant traitées au zolédronate [148].

Toutefois, ces deux traitements présentent des effets secondaires, comme une ostéonécrose de la mâchoire, de l'hypocalcémie et une insuffisance rénale dans le cas des biphosphonates [149].

5.2. Thérapies émergentes

D'autres thérapies ciblant les ostéoclastes (Src, cathépsine K) mais aussi les ostéoblastes (voie des Wnt) et les facteurs présents dans l'environnement osseux (TGF-β, CXCR4, VEGF) sont en cours d'évaluation clinique pour le traitement des métastases osseuses.

5.2.1. Traitement ciblant les ostéoclastes

La cathépsine K est une enzyme clé dans la dégradation de l'os conduite par les ostéoclastes. Puisque son inhibition n'induit pas la mort cellulaire, son ciblage

thérapeutique présente l'avantage de sauvegarder la stimulation de la formation osseuse induite par les ostéoclastes [150]. Malgré l'efficacité de l'odanacatib, un inhibiteur de la cathépsine K, à réduire la perte osseuse de patientes avec un cancer du sein métastatique, son développement a été stoppé prématurément pour les complications cardiovasculaires qu'il est susceptible d'entraîner [151], [152]. La tyrosine kinase Src est impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses mais elle est également essentielle à l'activité de résorption des ostéoclastes. Des études précliniques montrent que l'utilisation d'inhibiteurs de Src, réduit l'ostéolyse tumorale dans des modèles de cancer du sein [153] et de myélome multiple [154]. Le dasatinib, un inhibiteur de Src, a été étudié en essai clinique de phase II sur des cas de cancers du sein métastatiques mais il ne semble pas influencer l'ostéolyse tumorale et la survie des patientes [155]. Néanmoins, son utilisation couplée au zolédronate semble présenter un bénéfice pour les patientes hormono-sensibles [156] suggérant que, couplée à d'autres thérapies et dans des cas moléculaires spécifiques, l'inhibition de Src pourrait être bénéfique.

5.2.2. Traitement ciblant les ostéoblastes

L'inhibition de la formation osseuse est également responsable de la perte osseuse observée lors du développement des métastases du cancer du sein. Le rétablissement des fonctions ostéoblastiques est donc apparu comme une base prometteuse pour le développement de stratégies thérapeutiques. DDK-1 et SOST sont deux molécules dérivées des cellules tumorales qui entravent la différentiation ostéoblastiques à travers l'inhibition de la voie Wnt/βcaténine [157]. Des anticorps monoclonaux anti-DKK-1 (BHQ880) et anti-SOST (Romosozumab) sont actuellement développés et étudiés lors d'essais cliniques de phase II pour les myélomes multiples [158] et de phase III pour l'ostéoporose [159], respectivement. Bien que ces molécules ne fassent actuellement l'objet d'aucune étude clinique incluant des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique, elles pourraient représenter une solution thérapeutique alternative intéressante.

5.2.3. Traitement ciblant l'environnement osseux

Enfin, le ciblage de quelques molécules clés présentes dans l'environnement osseux et participant à la formation des métastases osseuses suscite un intérêt croissant en clinique. Le récepteur CXCR4 et les intégrines favorisent la migration, l'adhésion et la croissance métastatique. L'ulocuplumab, un anticorps monoclonal ciblant CXCR4, est actuellement étudié en phase I dans le cas de myélome multiple (NCT01359657) [160] tandis que plusieurs inhibiteurs des intégrines (anticorps et antagonistes peptidiques et non peptidiques) font l'objet d'essais cliniques pour le traitement des tumeurs solides dont le cancer du sein [161]. Le développement des métastases dans l'environnement osseux dépend aussi de la présence de vaisseaux sanguins. Plusieurs stratégies visent donc à inhiber soit la production de VEGF par les cellules tumorales et les cellules endothéliales à l'aide d'agents comme le thalidomide et le bevacizumab, soit l'activité du récepteur VEGFR à travers l'utilisation d'anticorps tels que le ramucirumab [162]. Dans le tissu osseux, le TGF-β est l'un des facteurs majeurs dérivés de la matrice osseuse qui favorise la croissance métastatique. Expérimentalement, l'inhibition du TGF-β bloque la formation des métastases osseuses. Sa dualité fonctionnelle dans les cellules saines comparée aux cellules cancéreuses rend difficile l'élaboration de thérapies efficaces en clinique [163]. Une étude récente a montré que la transition anti-métastatique/pro-métastatique du TGF-β qui s'opère dans les cellules cancéreuses est le résultat de la stabilisation du facteur de transcription GLI2 par la protéine 14-3-3ζ et son association avec les protéines SMAD2/3. Ce partenariat active alors la synthèse de la PTHrP favorisant la formation des métastases osseuses [164]. Cette découverte pourrait permettre la génération de thérapies plus spécifiques ciblant la voie du TGF-β.

III. Les récepteurs de guidage axonal Roundabout

Au cours du développement, les neurones du système nerveux central migrent, établissent des connexions spécifiques et forment ainsi un réseau fonctionnel. Cette croissance axonale n'est pas aléatoire mais guidée par des molécules produites dans l'environnement cellulaire. La présence de ces molécules attire, ou au contraire, éloigne les neurones qui présentent des récepteurs membranaires spécifiques à leur surface. Ce mécanisme nommé guidage axonal est particulièrement bien décrit dans le cas des neurones commissuraux qui assurent la communication entre le côté droit et gauche des organismes bilatéraux. Ces deux moitiés sont séparées de manière symétrique par un axe longitudinal appelé ligne médiane. Ainsi, pour élaborer des connexions viables, cette ligne ne peut être traversée qu'une seule fois par les neurones.

Le guidage des axones à travers le système nerveux central implique quatre grandes familles de molécules : les nétrines, les sémaphorines, les éphrines et les molécules SLIT. Couplées à leur récepteur, ces molécules engagent des signaux chimio-attractants ou chimio-répulsifs. C'est le cas lorsque les nétrines se fixent sur les récepteurs UNC (Un-Coordinated) et DCC (Deleted In Colorectal Cancer), les éphrines sur les récepteurs Ephs, les sémaphorines sur les neuropilines et les plexines et enfin les molécules SLIT sur les récepteurs ROBO **(Figure 16)**.

La voie SLIT/ROBO a été initialement décrite pour son rôle dans la répulsion des neurones commissuraux lorsqu'ils traversent la ligne médiane. Cette fonction est illustrée par le phénotype des drosophiles mutées pour le gène *ROBO1* chez lesquelles les neurones commissuraux forment un rond-point axonal induit par la traversée intempestive de la ligne médiane [165] **(Figure 17).** Cependant, leur action ne se limite pas au système nerveux puisqu'ils influencent également des processus tels que l'angiogenèse et sont impliqués dans les mécanismes tumoraux.

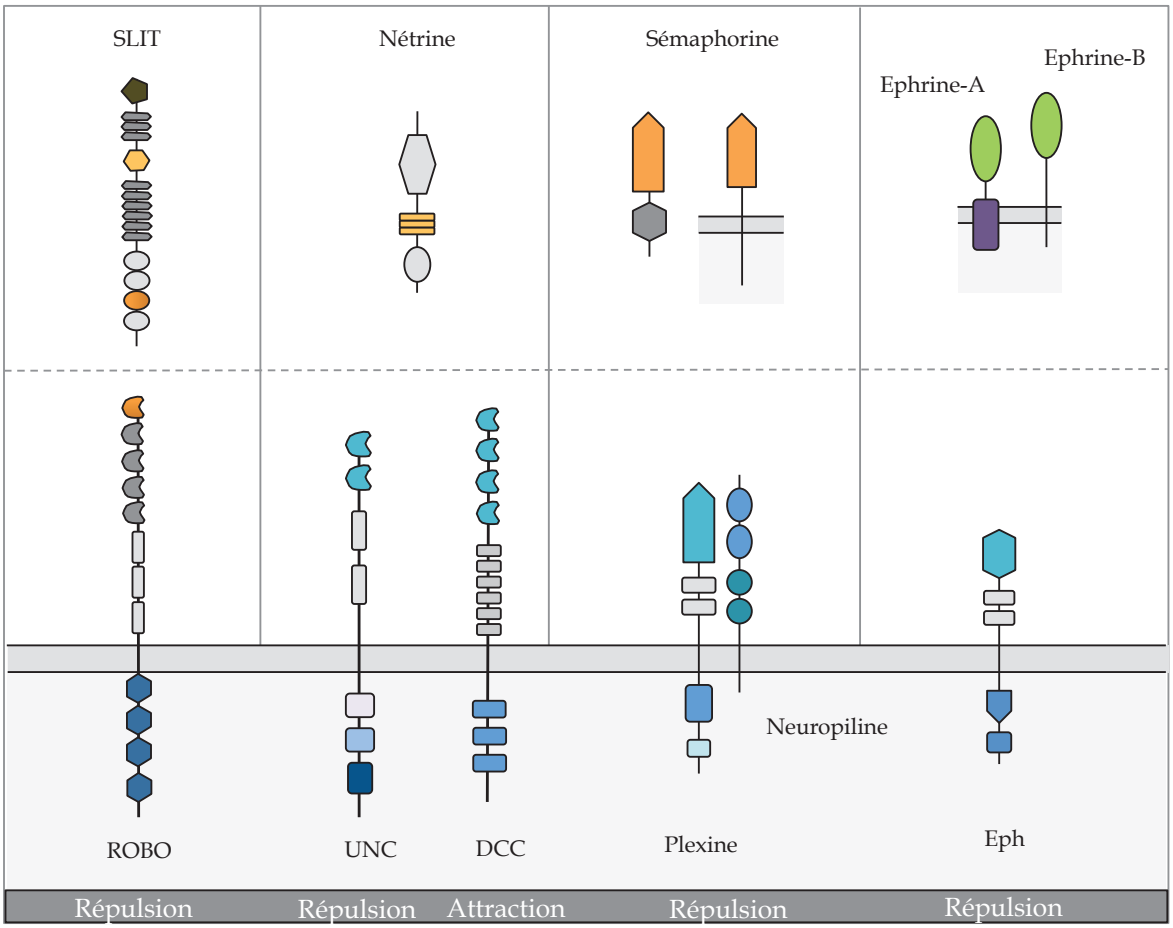


Figure 16. Les récepteurs de guidage axonal.

(Modifié d'après T. W. Yu, et al. Nature Neuroscience, 2001)

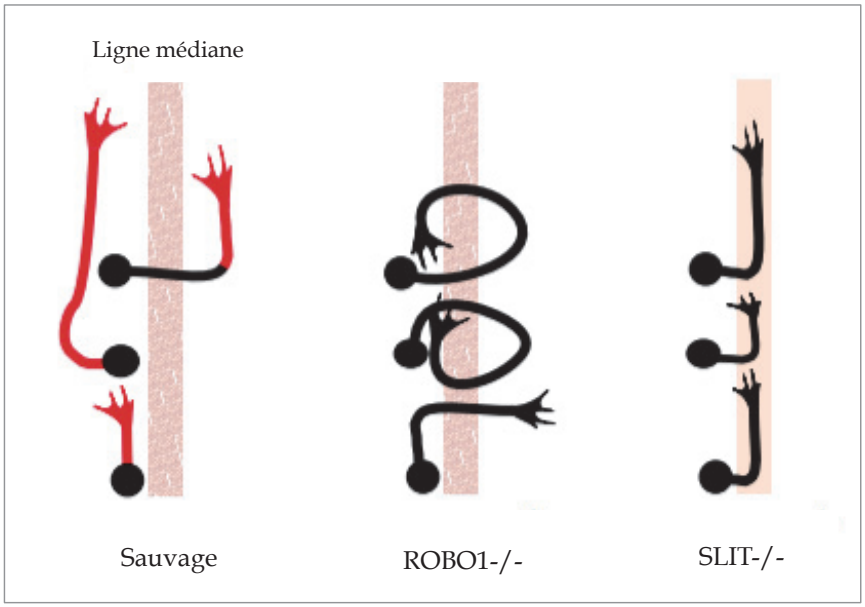


Figure 17. Phénotype des axones commissuraux chez la drosophile sauvage ou mutée pour les gènes *ROBO* et *SLIT*.

(Modifié d'après A. Chedotal, MS, 1999)

1. LES RECEPTEURS ROBO ET LES LIGANDS SLIT

1.1. Structure

Les protéines Slit sont les principaux ligands des récepteurs ROBO et sont hautement conservées entre les espèces [166]. Il s'agit de protéines secrétées mais retrouvées le plus souvent associées aux membranes et à la matrice extracellulaire. Alors que la drosophile ne possède qu'une seule protéine SLIT, les mammifères tels que l'homme et la souris produisent trois protéines SLIT : 1, 2 et 3. Structuralement, les trois membres de cette famille sont relativement semblables. Ils sont constitués de quatre domaines riches en leucine (LLR, aussi appelé D1-4) suivis de 7 à 8 domaines EGF, un domaine comparable à la laminine G (Laminin G-like) ainsi qu'un domaine C-terminal comprenant un ancrage cystéine [167] **(Figure 18)**.

Les récepteurs ROBO, qui font partie de la super famille des immunoglobulines (IgCAM : Ig Cellular Adhesion Molecule), sont retrouvés chez la plupart des espèces mais ne sont pas équivalents en termes d'expression, de fonction et de structure. La drosophile synthétise les trois premiers membres des récepteurs ROBO (ROBO1-3) tandis qu'on dénombre quatre récepteurs chez le Zebrafish et les mammifères (ROBO1-4) [168]. Les récepteurs ROBO 1 à 3 partagent des caractéristiques structurales similaires. Ils sont constitués d'une région extracellulaire composée de cinq domaines immunoglobuline (Ig 1-5) et de trois régions fibronectine de type III (FNIII 1-3). Le domaine transmembranaire (TM) est suivi d'une partie cytosolique contenant plusieurs régions conservées, riches en proline (3 à 4), nommée CC (Cytoplasmic Conserved) [169] **(Figure 18)**.

Le récepteur ROBO4 initialement appelé « Magic Roundabout » a été découvert plus tardivement par homologie de séquence. ROBO4 diverge nettement des autres récepteurs tant au niveau structural que fonctionnel. En effet, ROBO4 ne contient que deux domaines Ig (Ig 1-2), deux domaines FNIII correspondant aux FNIII 2 et 3 des autres récepteurs ROBO, ainsi qu'un domaine intracellulaire riche en proline [170] **(Figure 21)**. Contrairement aux autres récepteurs ROBO dont l'expression est majoritairement neuronale, ROBO4 assure des fonctions dans l'angiogenèse et a souvent été décrit comme spécifique des cellules endothéliales [170] et des CSH [30]. Toutefois, l'implication de ce récepteur dans la physiologie

nerveuse ne peut pas être définitivement exclue puisqu'il est également détecté dans les tissus neuronaux de la souris [171] et du rat [172].

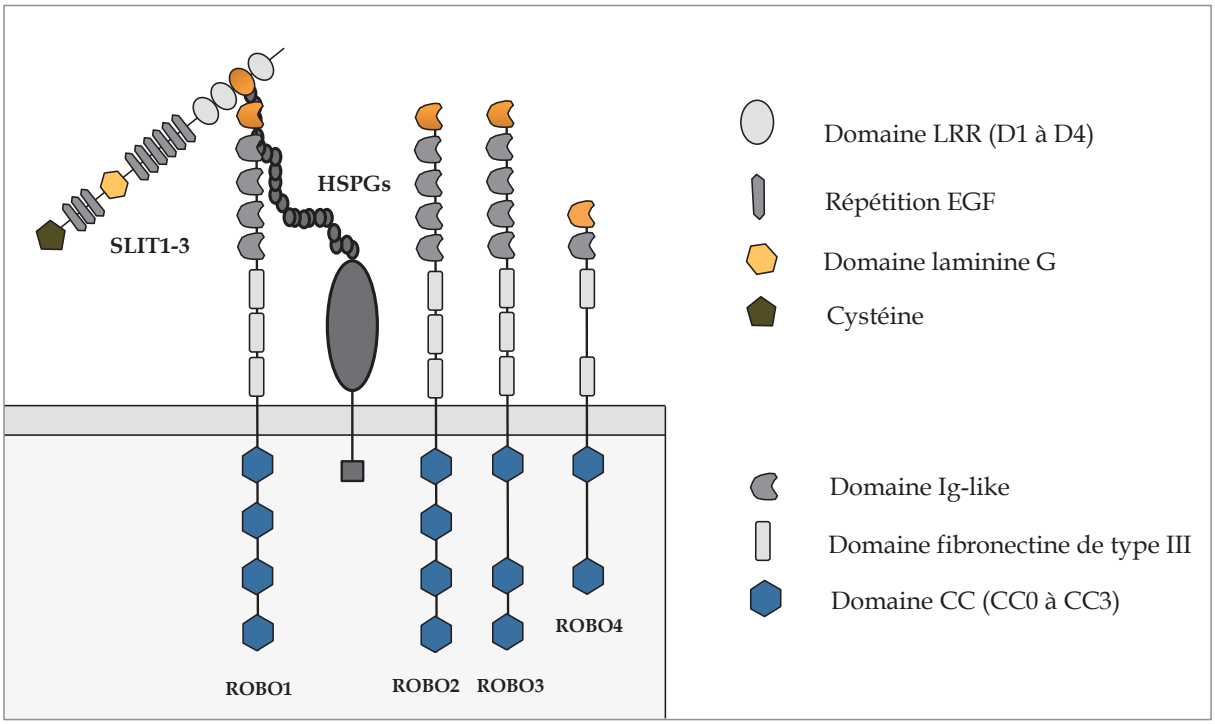


Figure 18. Structure des protéines SLIT et ROBO.
(Modifié d'après Blockus and Chedotal 2016)

1.2. Interaction ligand/récepteur

1.2.1. Liaison SLIT/ROBO

L'interaction SLIT/ROBO fait intervenir le domaine Ig1 des récepteurs ROBO et la région LRR2 (D2) des protéines SLIT chez la drosophile [173] et chez l'homme [174]. Cette association assurée par la présence d'acides aminés hautement conservés est illustrée par la capacité du SLIT2 humain à se fixer sur le récepteur ROBO1 de la drosophile [175]. Cette liaison a été démontrée pour le récepteur ROBO1/2 et pour ROBO3 chez les non-mammifères. Le fait que ROBO3 et ROBO4 chez les mammifères ne possèdent pas les acides aminés essentiels permettant une interaction avec les protéines SLIT [176], [170] suggère une interaction indirecte par le biais d'un co-récepteur ou bien l'intervention d'un ligand différent.

Pour être fonctionnelle, la signalisation SLIT/ROBO dépend de l'action des protéoglycanes à héparane-sulfate (HSPG) en tant que co-récepteur [177]. Les HSPG

constituent un groupe de glycoprotéines qui incluent les syndécans et les glypicans, et sont présents dans les membranes cellulaires et dans la matrice extracellulaire. *In vitro* SLIT2 se fixe à l'héparine et au glypican-1 [178], tandis que l'association de ROBO1 avec le syndécan a été montrée par résonnance des plasmons de surface (Biacore) [179]. L'activité de l'héparinase III sur des cellules nerveuses en culture inhibe l'effet de chimio-répulsion induit par SLIT, ce qui montre l'importance de ce trio moléculaire [180].

1.2.2. Dimérisation des récepteurs ROBO

Les récepteurs ROBO présentent également la particularité de former des complexes homériques et hétérométriques permettant ainsi leur interaction avec d'autres récepteurs membranaires en *cis* ou en *trans*, ce qui ajoute une complexité supplémentaire dans la régulation et les fonctions des récepteurs de guidage axonal. Une récente étude, réalisée par des analyses en FRET (fluorescence resonance energy transfer), suggère que la conformation du récepteur ROBO1 serait majoritairement dimérique. La formation de ce complexe serait fonctionnelle et indépendante de la liaison de ROBO1 avec SLIT2 [181]. ROBO1 et ROBO3 sont également décrits pour s'associer avec le récepteur de guidage axonal DCC. L'association de ROBO1 avec DCC entrave l'action chimio-attractante de la nétrine tandis que sa liaison avec ROBO3 favorise cette action [182], [176]. Enfin, chez la drosophile ROBO2 interagirait en *trans* avec ROBO1 pour inhiber l'effet répulsif induit par SLIT dans les axones commissuraux qui n'ont pas encore traversé la ligne médiane [183].

1.2.3. Cas particulier du récepteur ROBO4

ROBO4 diffère des autres récepteurs ROBO. Par conséquence, la liaison avec les protéines SLIT est vivement controversée du fait que la structure de ROBO4 soit différente des autres récepteurs ROBO. Les domaines Ig1 des récepteurs ROBO1 et ROBO4 sont identiques à 42% mais aucun des acides aminés impliqués dans la liaison avec les protéines SLIT ou les héparanes sulfates n'est conservé chez ROBO4 [178], [170]. Une seule étude décrit une liaison directe de SLIT2 avec ROBO4 par co-immunoprécipitation en conditions non-dénaturantes [184] mais cette observation n'a jamais été reproduite, ni par co-immunoprécipitation, ni par résonance des

plasmons de surfaces (biacore) [185]. Pourtant, de nombreuses études semblent démontrer une activité inhibitrice de SLIT2 sur l'angiogenèse de manière dépendante de ROBO4. Les résultats d'une de ces études montrent, en effet, que la déplétion de ROBO4 dans un modèle murin de pathologie vasculaire rétinienne inhibe l'effet inhibiteur de SLIT2 [186]. ROBO1 est également produit par les cellules endothéliales [187] et plusieurs études indépendantes ont conduit à mettre en évidence une association de ROBO4 avec ROBO1 par co-immunoprécipitation. Le résultat de ces études suggère que l'hétérodimérisation des deux récepteurs permettrait l'activation de ROBO4 par SLIT [188], [189]. Une autre interaction impliquant ROBO4 et le récepteur de guidage axonal UNC5B a récemment été mis en évidence. Les résultats de l'équipe du Dr Koch montrent en effet que le premier domaine Ig de ROBO4 est suffisant pour assurer une liaison à UNC5B. Cependant, ce partenariat serait à sens unique car seul le récepteur UNC5B est biologiquement activé lors de son association avec ROBO4 [190].

2. REGULATION DES PROTEINES ROBO ET SLIT

2.1. Régulation épigénétique

2.1.1. Méthylation des promoteurs

La méthylation de l'ADN est un mécanisme physiologique de régulation de l'expression génique qui se produit à proximité des îlots CpG (régions du génome riche en cytosine et guanine). Cette modification conduit à la compaction de la chromatine au niveau des régions promotrices des gènes inhibant ainsi leur transcription. Bien qu'aucune donnée scientifique ne fait état d'une régulation par méthylation de l'expression des gènes ROBO, dans un contexte tumoral, les promoteurs des gènes SLIT et du récepteur ROBO1 sont fréquemment retrouvés hyperméthylés. L'expression de SLIT est d'ailleurs restaurée dans des lignées tumorales fortement méthylées après traitement au 5-aza-2'-déoxycytidine [191], [192], [193].

Dans le cas du récepteur ROBO4, la méthylation de son promoteur pourrait être à l'origine de son expression spécifique dans les cellules endothéliales. En effet, tandis que la partie proximale du récepteur ROBO4 n'est jamais méthylée dans les

cellules HUVEC (Human Umbilical vein Endothelial Cell) ou HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cell), elle est retrouvée hyperméthylées dans des types cellulaires qui ne sont pas d'origine endothéliale tels que les HEK-293 (Human Embryonic Kidney), les NHDF (Normal Human Dermal Fibroblasts) et les HCASmC (Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells) [194]. Un traitement au 5-aza-2'-déoxycytidine des cellules dont le promoteur est méthylé entraîne l'accumulation du transcrit de ROBO4 mesuré par RTqPCR. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la déméthylation spécifique des cellules endothéliales n'ont pas été étudiés.

2.1.2. Régulation par les miRNA

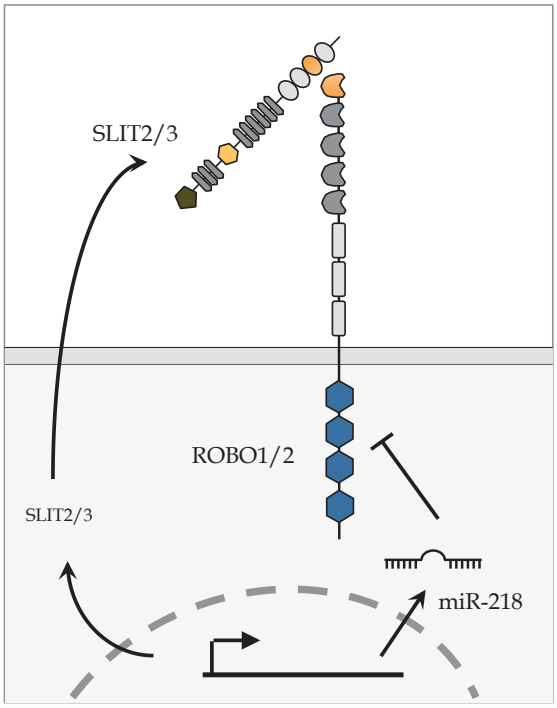


Figure 19. Régulation des protéines ROBO par le miRNA-218.

Le miRNA-218 est synthétisé à partir d'introns des pré-messagers des gènes *SLIT2* et *SLIT3* et inhibe la synthèse des récepteurs ROBO1 et 2. **(Modifié d'après Small *et al.*, 2010).**

Le miRNA-218 est particulièrement bien décrit pour réguler, chez la plupart des espèces la production des protéines SLIT et ROBO. Le miR-218 cible le gène de *ROBO1* et *ROBO2* et des composants de la voie SLIT-ROBO comme SRGAP2 (SLIT-ROBO Rho GTPase Activating Protein 2). L'utilisation d'un inhibiteur du miR-218 augmente le taux des messagers du gène *ROBO1* et *ROBO2* [195]. Le miR-218-1 se

trouve dans l'intron 15 du gène *SLIT2* tandis que le miR-218-2 est codé dans l'intron 14 de *SLIT3,* suggérant une boucle de régulation de la voie SLIT/ROBO dépendante de la transcription des gènes *SLIT* [196] **(Figure 19)**. Etant associé aux gènes *SLIT*, le miRNA-218 est souvent dérégulé dans les cancers de l'œsophage [197], du sein [198], de l'estomac [199] et du colon [200].

Le miRNA-29a, décrit récemment, est également intéressant car il cible et inhibe expérimentalement la production du récepteur ROBO1 dans les cellules souches mésenchymateuses [201] et les MCF7, une lignée tumorale mammaire hormono-sensible [202].

2.2. Régulation transcriptionnelle

2.2.1. Régions promotrices

Parmi les récepteurs ROBO, la région promotrice de 3kb du récepteur ROBO4 est la seule particulièrement bien décrite. La transcription de ROBO4 est régulée, dans les cellules endothéliales, par deux régions promotrices sur lesquelles se fixent différents facteurs : une région proximale et une région distale. Les facteurs SP1 et GAPBα (GA-Binding Protein) régulent l'expression de ROBO4 en s'associant à la région proximale du promoteur. Des expériences de co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) montrent en effet leur fixation sur des domaines SP1 et ETS (E26 Transformation-Specific) dont les positions sont référencées dans la **figure 20**. De plus, l'utilisation d'un shRNA dirigé contre les facteurs SP1 ou GABPα diminue de moitié le taux endogène d'ARNm de ROBO4 [203]. Dans la région distale, le facteur de transcription AP-1 composé des sous-unités C-Jun et Fra-1 (Fos Related Antigen 1) permet l'activation de la transcription de ROBO4 en se fixant sur un motif conservé AP-1 **(Figure 20)**. Le rôle essentiel du complexe AP-1 dans l'activité du promoteur de ROBO4 a été confirmé par mutagenèse dirigée du motif AP-1 ainsi que par l'utilisation d'un siRNA ciblant C-jun et Fra-1 [204].

Dans un contexte inflammatoire, le TNF-α est également capable d'activer la transcription de ROBO4 *via* l'activation du facteur NFκB et la fixation de ce dernier sur deux motifs présents dans la région distale du promoteur **(Figure 23)**. En effet, la stimulation des cellules endothéliales HUVEC et HCAEC par le TNF-α entraîne une accumulation des transcrits de ROBO4 qui est inhibée en présence de PDTC

(Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate), un inhibiteur spécifique de NFκB [205]. Bien qu'une étude par RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), ait permis d'observer un site alternatif d'initiation de la transcription dans les HUVEC, aucune études publiées ne déterminent si la présence de deux régions promotrices autorise la génération de transcrits alternatifs ou alors de variants d'épissage [203].

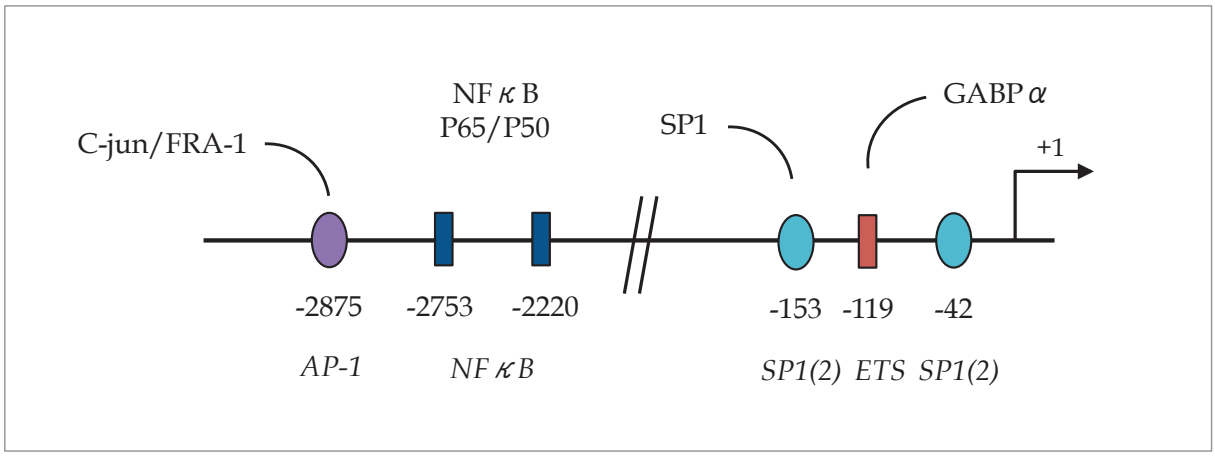


Figure 20. Séquence promotrice du gène *ROBO4*.

2.2.2. Epissage alternatif

Chez la souris et chez l'homme, les récepteurs ROBO1, ROBO2 et ROBO3 sont soumis à un épissage alternatif en 5' du transcrit qui génère deux isoformes protéiques avec une partie N-terminale et un peptide signal unique : les formes a et b [206], [207], [208]. Dans le cas de ROBO1, la présence d'un promoteur alternatif (DUTT1) est à l'origine de la synthèse de l'isoforme ROBO1b qui présente un profil spatial et temporel différent de ROBO1a. Alors que ROBO1b est synthétisé durant le développement ainsi que dans les tissus adultes, ROBO1a est lui produit strictement dans le cerveau des embryons, les yeux et les tissus rénaux [206], [209]. Cette expression différentielle est également observée et particulièrement marquée pour les isoformes ROBO2a et ROBO2b ainsi que ROBO3a et ROBO3b. L'ARNm de l'isoforme ROBO2a est restreint au tissu cérébral fœtal tandis que celui de ROBO2b est détecté dans un nombre important de tissus adultes dont le cerveau, le poumon et la rate [207]. Ceci est également observé pour ROBO3b dont la synthèse dans la majorité des

tissus est supérieure à celle de ROBO3a [208]. Ces données sont intéressantes car elles suggèrent l'existence d'un promoteur alternatif qui permettrait l'expression ectopique d'un gène dont l'expression est initialement spécifique d'un tissu.

Le récepteur ROBO4 est le seul pour lequel aucun transcrit alternatif et aucun variant protéique ne fait l'objet d'études publiées dans la littérature scientifique, bien que l'on en retrouve recensées dans les bases de données NCBI et UniProt.

2.3. Modification post-traductionnelle

2.3.1. Clivage

Les récepteurs ROBO ainsi que les ligands SLITs sont soumis à un processus protéolytique qui apparait important pour leur voie de signalisation. Le domaine extracellulaire de ROBO1 peut être successivement clivé par une métalloprotéase nommée ADAM10 puis par une γ-sécrétase ce qui génère un fragment N-terminal (NTF) et un fragment intracellulaire C-terminal (CTF). L'enzyme ADAM10 libère premièrement l'ectodomaine de ROBO1 (NTF) dans l'espace extracellulaire et produit le fragment CTF-1 incorporé dans la membrane plasmique. La γ-sécrétase à son tour clive ROBO-CTF1 pour produire ROBO1-CTF2 qui est libéré dans le cytoplasme et peut être transloqué dans le noyau [210] **(Figure 21).** Cependant le rôle du fragment C-terminal de ROBO1 n'a jamais été étudié. La création d'une forme non-clivable de ROBO1 (ROBO-U) confirme l'importance de ce processus pour la fonction répulsive du récepteur puisqu'elle ne permet pas la restauration d'un phénotype sauvage chez des mutants *ROBO1*-/-[210].

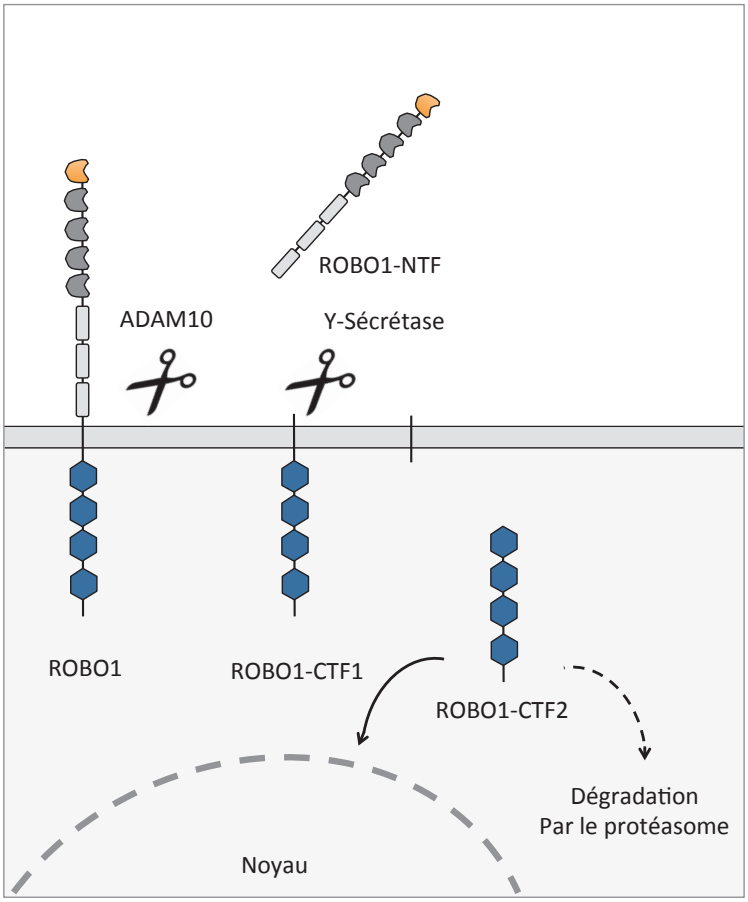


Figure 21. Clivage de ROBO1.

ROBO1 est clivé par la métalloprotéase ADAM10 dans le milieu extra-cellulaire ce qui conduit à la production des fragments ROBO1-NTF et ROBO1-CTF1. Le fragment ROBO1-CTF1 toujours lié à la membrane subit un second clivage par une γ-sécrétase aboutissant à la production du fragment ROBO1-CTF2. Libéré de la membrane, ce dernier est soit dégradé par le protéasome soit transloqué dans le noyau. **(Modifié d'après Seki *et al.*, 2010).**

Concernant la protéine ROBO4, une forme soluble d'environ 60kDa peut être immuno-précipitée à partir du surnageant des cellules endothéliales HUAEC (Human Umbilical Artery Endothelial Cell) et dans les cellules endothéliales aortiques porcines lorsque celles-ci sont transfectées avec la forme entière de la protéine ROBO4. De manière intéressante, cette forme soluble est également détectée dans le sérum murin et humain. Toutefois, les mécanismes menant à la production de cette forme et ses fonctions biologiques n'ont pas été décrits [211].

SLIT2, et probablement SLIT1 et SLIT3, sont clivés en un fragment N-terminal (SLIT-N) et un fragment C-terminal (SLIT-C) à la fois *in vitro* et *in vivo* par une enzyme non connue. Leur distribution n'est pas identique, SLIT2 et SLIT-N étant par

exemple davantage associés aux membranes tandis que SLIT2-C est retrouvé le plus souvent sécrété [175]. En termes de fonction, la quasi-totalité des activités de signalisation a été attribuée à SLIT-N car le fragment SLIT-C, qui n'est pas capable de se lier aux récepteurs ROBO, a longtemps été considéré comme biologiquement inactif. Cependant, il a été récemment démontré que le fragment SLIT-C s'associe à la plexine A1 et assure une fonction répulsive sur les axones commissuraux [212].

2.3.2. Glycosylation

La glycosylation est une modification post-traductionnelle courante pour les protéines membranaires et secrétées qui transitent par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Cette étape n'a jamais été étudiée dans les fonctions et la régulation des récepteurs ROBO. Au cours de la réaction de N-glycosylation, un sucre est liée de manière covalente à une asparagine (Asn) présente dans la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (X : tout acide aminé excepté la proline, Ser : Sérine, Thr : Thréonine) [213]. Ce motif est présent à de nombreuses reprises dans la partie extracellulaire des récepteurs ROBO indiquant qu'il s'agit de glycoprotéines potentielles. De plus, lors de l'identification bio-informatique de ROBO4, l'équipe du Dr. Huminiecki a décrit 4 sites potentiels de N-glycosylation [170]. Ces analyses *in silico* sont appuyées par des observations expérimentales dans lesquelles la masse moléculaire des protéines ROBO détectées par Western Blot ne correspond pas systématiquement aux tailles calculées à partir du nombre d'acides aminés. En effet, les protéines ROBO sont détectées à des masses moléculaires apparentes variants de 180kDa à 250kDa pour ROBO1 et de 107 et 170 kDa pour ROBO4. Bien que la N-glycosylation ne soit pas la seule maturation post-traductionnelle modifiant la masse moléculaire apparente d'une protéine, elle semble néanmoins se produire pour les récepteurs ROBO1 et ROBO4 puisque ces deux protéine sont détectées glycosylées à la surface des cellules endothéliales par spectrométrie de masse [214].

2.3.3. Déubiquitinylation par USP33

La production spatio-temporelle du récepteur ROBO1 lors du guidage axonal est également régulée par une enzyme de déubiquitinylation spécifique nommée USP33. En réponse à SLIT2, USP33 se lie au domaine CC3 du récepteur ROBO1 et

stabilise le récepteur en prévenant sa dégradation par le protéasome [215]. Cet aspect est d'ailleurs confirmé dans des cellules déplétées en USP33 et traitées au MG132, un inhibiteur du protéasome, où l'on observe une augmentation du taux de ROBO1 ubiquitinylé [216]. La dérégulation d'USP33 dans le processus tumoral a depuis été démontrée dans le cancer du poumon [216], du sein [217], et du colon [218].

3. FONCTION ET SIGNALISATION DES RECEPTEURS ROBO

Les récepteurs ROBO sont des régulateurs cruciaux de la migration axonale et vasculaire durant le développement. Cependant, leurs domaines intracellulaires ne possèdent pas d'activité catalytique. Leur action dans ces processus physiologiques est dépendante du recrutement de protéines adaptatrices et d'effecteurs cellulaires et/ou de leur association avec d'autres récepteurs et ligands.

L'inhibition ou la promotion de la mobilité axonale et endothéliale impliquent la modulation de protéines régulatrices du cytosquelette d'actine de la famille des Rho GTPases telles que RHO, RAC et CDC42, mais aussi de la protéine WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) [219]. Ces Rho GTPases sont activées lorsqu'elles sont liées au GTP (Guanosine Triphosphate) tandis qu'elles sont inactives lors de l'hydrolyse de ce dernier en GDP (Guanosine Diphosphate). Ainsi, liées au GTP, les protéines RHO, RAC et CDC42 activent la formation de fibres de stress, de filopodes et de lamellipodes permettant la migration cellulaire.

3.1. Contrôle de la migration axonale

La fonction majeure des récepteurs ROBO dans le système nerveux est le guidage des axones. Ce mécanisme est principalement médié par l'inhibition de l'activité des protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Cette fonction est d'ailleurs illustrée chez la drosophile exprimant les formes constitutionnellement actives de RAC1 et CDC42 où l'on observe une phénocopie des mutants *ROBO1-/-* [220].

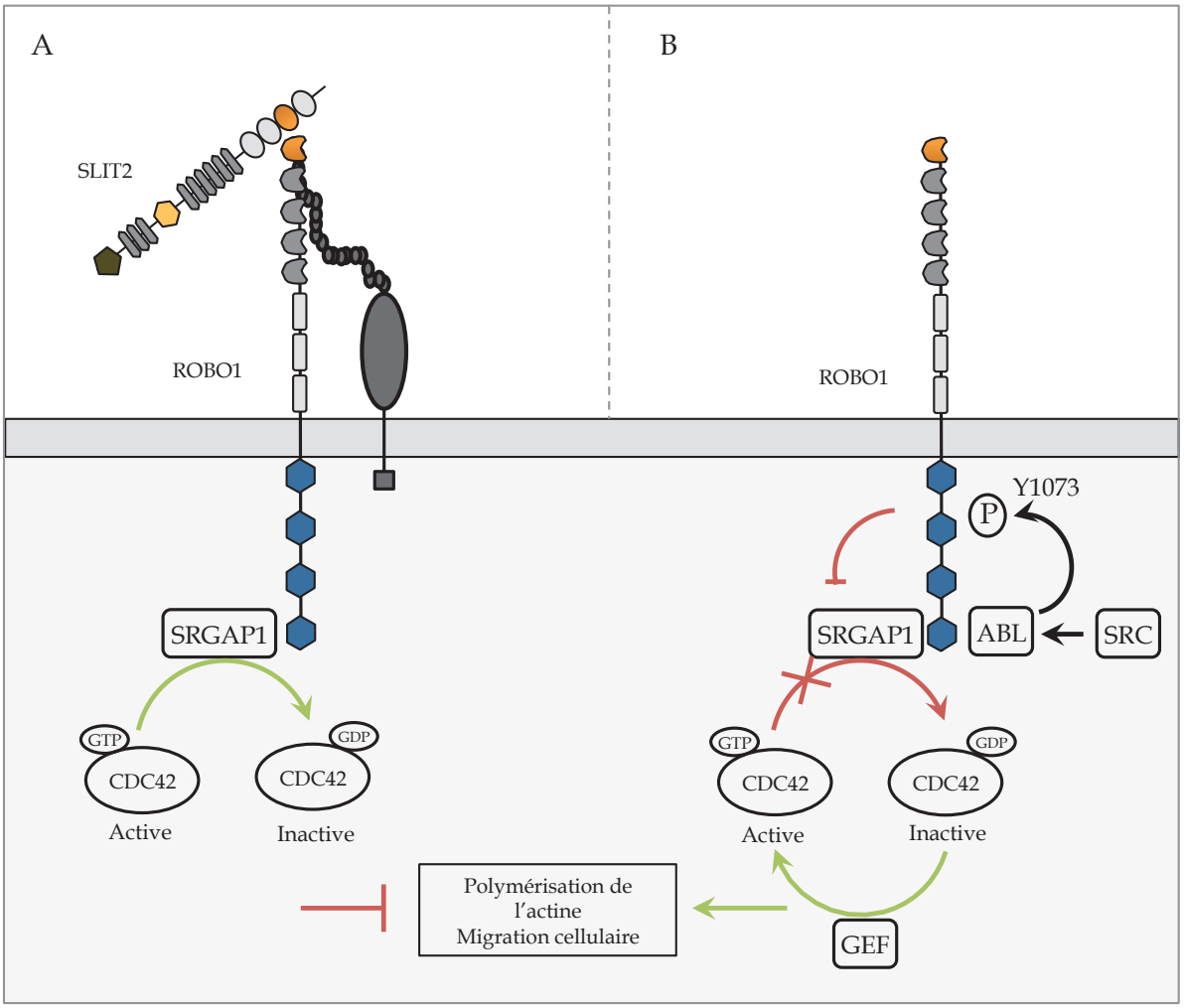


Figure 22. Régulation de la migration cellulaire par la voie de signalisation SLIT/ROBO.

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

Cette régulation passe par l'interaction des récepteurs ROBO avec des GTPases particulières, les SRGAP nommés SRGAP1, SRGAP2 et SRGAP3 [221]. Elles sont toutes pourvues d'un domaine SH3 leur permettant de se lier au domaine CC3 des récepteurs ROBO. Une fois recrutées au niveau des domaines intracellulaires, les SRGAP catalysent le GTP en GDP et inactivent la fonction des principales protéines contrôlant la dynamique du cytosquelette **(Figure 22)**. Ainsi, en présence de SLIT, SRGAP1 inactive CDC42 [221] tandis que SRGAP3 (également connu sous le nom MEGAP et WRP) régule l'activité de RAC1 et CDC42 ce qui perturbe la formation des

complexes focaux et la formation de filopodes [222]. SRGAP2, quant à elle, favorise l'extension des axones durant le développement de la souris, ce qui génère des protusions au niveau de la membrane neuronale et inhibe la migration des neurones [223]. De la même manière, une autre molécule de la famille des RhoGAP, la protéine Visle, se lie au domaine CC2 de ROBO et inhibe l'activité des protéines CDC42 et RAC1 [224]. A l'inverse, l'interaction de la protéine adaptatrice NCK avec les domaines CC2 et CC3 de ROBO active le recrutement des protéines PAK (P21-Activated Protein Kinase) et GEF-Sos (Guanosine exchange factor Son-Of-Sevenless). Cette dernière en activant RAC1, régule la répulsion et la dynamique du cytosquelette [225].

Cette voie de signalisation est régulée négativement par l'action de la tyrosine kinase Abl (Abelson) qui fixe et phosphoryle le domaine CC1 des récepteurs ROBO. A l'inverse, MENA (Mammalian Enabled), qui est le substrat de Abl, interagit directement avec ROBO au niveau de ses domaines CC1 et CC2 pour promouvoir le signal de répulsion [226]. **(Figure 22)**

3.2. Contrôle de la migration vasculaire

L'action des récepteurs ROBO est polyvalente puisqu'en plus de leur fonction bien décrite dans le système nerveux, ils régulent également la migration vasculaire au cours du développement et lors de conditions physiopathologiques. C'est particulièrement le cas pour le récepteur ROBO4 spécifiquement exprimé par les cellules endothéliales [170], [194]. ROBO4 est fortement détecté dans le réseau vasculaire et l'endothélium placentaire chez la souris en développement [184], [227] mais aussi dans les vaisseaux tumoraux [170]. ROBO4 semble être un élément clé dans la mise en place d'une vascularisation fonctionnelle car son inhibition comme sa sur-expression entraîne des défauts de vascularisation. Toutefois, son rôle dans l'angiogenèse est contradictoire, car ROBO4 est à la fois pro et anti-angiogénique. Cette dualité fonctionnelle qui semble liée au contexte vasculaire, peut être en partie expliquée par les interactions hétérogènes de ROBO4 avec divers partenaires. Son association avec SLIT2 ou encore ROBO1 et les mécanismes moléculaires impliqués dans la signalisation du récepteur ROBO4 restent néanmoins controversés.

D'autres membres de la famille ROBO, tels que ROBO1, ROBO2 et les ligands SLITs sont également produits par les cellules endothéliales et confirment la polyvalence fonctionnelle de ces récepteurs [187].

3.2.1. Migration des cellules endothéliales

Les études en faveur d'un rôle pro-angiogénique de ROBO4 sont peu nombreuses et ont principalement été réalisées *in vitro.* ROBO4 recrute et active, au niveau de son domaine extracellulaire, les Rho GTPases CDC42 et RAC1 permettant le contrôle du cytosquelette d'actine et la migration des cellules endothéliales [228], [229]. La migration endothéliale pourrait-être également médiée par l'association du récepteur ROBO4 avec le récepteur ROBO1. Dans cet exemple, SLIT2 est pro-angiogénique et se fixe, par l'intermédiaire de ROBO1, sur le complexe hétérodimérisé. Ce trio moléculaire active la protéine CDC42 permettant le recrutement de la protéine WASP par ROBO4 et initie ainsi la polymérisation d'actine nécessaire à la migration des cellules endothéliales [188]. Néanmoins, une récente étude *in vivo* démontre que l'invalidation de *ROBO4* inductible au tamoxifène n'influence pas la vascularisation de la rétine chez la souris [187] ce qui est en contradiction avec le rôle pro-angiogénique de ROBO4 dans un contexte vasculaire lié au développement. Cette même étude souligne cependant le rôle pro-angiogénique du couple SLIT2/ROBO1 dans l'angiogenèse murine postnatale puisque leur inactivation génétique induit des défauts sévères de vascularisation rétinienne [187].

3.2.2. Inhibition de l'angiogenèse et stabilisation de la vasculature

ROBO4 est détecté dans les cellules "stalk" (tige) et non dans les cellules « tips » (pointe). Les cellules stalk correspondent à des cellules endothéliales matures qui ne migrent pas et sont caractérisées par une baisse d'expression du récepteur VEGFR2. Les "tip-cell" quant à elles sont les analogues endothéliaux des cônes de croissance et migrent en réponse à des stimuli chimiotactiques. Cette observation a stimulé les recherches quant au rôle anti-angiogénique de ROBO4. Dans un contexte pathologique de vascularisation rétinienne, SLIT2 est anti-angiogénique et son association avec le récepteur ROBO4 entraîne l'inhibition de la voie du

VEGF/VEGFR2 et stabilise le réseau vasculaire [186] **(Figure 23)**. C'est également ce qui est observé *in vivo* lors de la néovascularisation cérébrale pathologique du rat induite par le diabète. Dans ce modèle, ROBO4 est régulé négativement dans les cellules endothéliales de rat diabétique et sa restauration conduit à l'inhibition de l'action pro-angiogénique du VEGF [230]. D'un point de vue moléculaire, la présence de SLIT2 entraîne la formation d'un complexe ROBO4/paxilline au niveau des adhésions focales, qui bloque l'activation de RAC via la GTPase ARF6 (ADP-Ribosylation Factor 6) et donc inhibe la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse [231] **(Figure 23)**.

La formation d'un complexe hétérodimérique ROBO1/ROBO4 dans les cellules endothéliales pourrait expliquer la réponse différentielle à SLIT2 observée. En effet, *in vitro* l'action pro-angiogénique de SLIT2 *via* ROBO1 n'est observée que lorsque *ROBO4* est déplété par un siRNA dans les cellules endothéliales HUVEC [229], [232], contredisant ainsi la précédente étude montrant que l'association de ROBO4 avec ROBO1 favorise la migration des cellules endothéliales [188]. Ces observations supportent toutefois le rôle anti-angiogénique de ROBO4 et l'hypothèse selon laquelle la migration endothéliale serait contrôlée par le rapport ROBO1/ROBO4. L'étude de la migration des cellules endothéliales lymphatiques dérivées du poumon renforce cette hypothèse puisque l'effet pro-angiogénique de SLIT2 et du VEGF-C n'est possible que lorsque ROBO4 est inhibé [233].

L'association de ROBO4 avec le récepteur à la nétrine, UNC5B, est également proposée comme mécanisme inhibiteur de l'angiogenèse [190], [211]. Contrairement au mécanisme impliquant SLIT2, ROBO4 agirait lui-même comme ligand de UNC5B. Cette interaction peut avoir lieu entre deux cellules voisines (trans) ou sur une même cellule (cis). Cette particularité est confirmée *in vivo* où la production d'une forme de ROBO4 sans domaine cytoplasmique suffit à inhiber la perméabilité vasculaire et la néovascularisation de la rétine suite à une lésion induite par l'oxygène, tandis que la partie intracellulaire de UNC5B est essentielle à l'inhibition de l'angiogenèse [211]. En se fixant sur le récepteur UNC5B, ROBO4 inhibe la phosphorylation de la tyrosine Y951 du récepteur VEGFR2 entraînant une diminution de son association avec la kinase SRC et l'inhibition de l'angiogenèse ainsi que de la perméabilité vasculaire [190], [211] **(Figure 23)**.

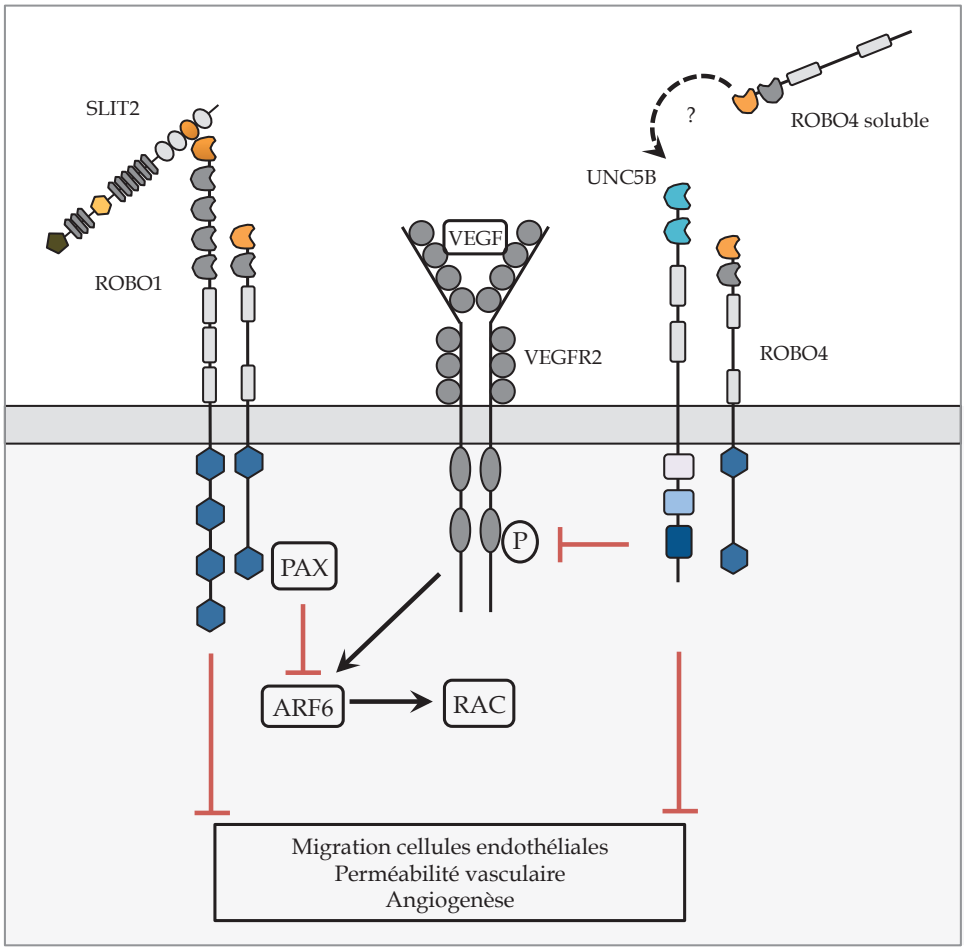


Figure 23. Régulation par le récepteur ROBO4 de la migration vasculaire induite par la voie du VEGF.

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

3.3. Physiologie des cellules souches hématopoïétiques

Comme décrit précédemment ROBO4 a une double fonction dans la physiologie des cellules souches hématopoïétiques. Lorsqu'il est produit par les cellules endothéliales des vaisseaux sinusoïdes, ROBO4 contrôle la perméabilité vasculaire et participe à la transmigration endothéliale guidée des CSH du sang vers l'os. Sa déplétion spécifique dans les cellules endothéliales ne permet d'ailleurs plus la colonisation de l'os par les CSH et augmente la perméabilité des vaisseaux induisant une mobilisation rapide des CSH provenant de l'os [31]. Lorsqu'il est produit par les

CSH, ROBO4 coopère avec CXCR4 pour maintenir les cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la niche osseuse. En effet, l'absence de ROBO4 dans les CSH induit une perte de la localisation de ces cellules au sein de la niche. De plus, SLIT2 est spécifiquement exprimé dans les ostéoblastes [32], ce qui suppose un rôle de la voie de signalisation SLIT/ROBO dans l'homéostasie des CSH en renforçant l'ancrage des CSH en plus du couple CXCXL12/CXCR4.

4. LES RECEPTEURS ROBO DANS LA PROGRESSION TUMORALE

4.1. Dérégulation génétique

Les cartographies génétiques puis transcriptomiques des cellules cancéreuses ont permis de mieux caractériser le rôle des récepteurs ROBO et des protéines SLIT dans le processus tumoral. En effet, les gènes codant pour les protéines ROBO1 et SLIT2 sont considérés comme des suppresseurs de tumeurs car ils sont fréquemment inactivés dans de nombreux cancers [191], [192]. Cette inactivation est principalement induite par la perte d'hétérozygotie ou alors par l'hyperméthylation des régions promotrices. L'altération de l'expression des gènes *SLIT2* et *ROBO1* est particulièrement marquée dans le cancer du sein [234]. L'analyse des tumeurs mammaires d'une cohorte de 150 patientes montre que 80% d'entre elles présentent au moins une altération du gène *ROBO1* ou bien du gène *SLIT2* ce qui souligne leur importance dans le développement tumoral mammaire [234]. Les résultats expérimentaux et cliniques sont en adéquation avec ce constat génétique et épigénétique. Par exemple, l'inactivation génétique de *SLIT2* chez la souris est associée à la formation de lésions hyperplasiques mammaires [235] tandis qu'en clinique, la faible expression des gènes *ROBO1* et *SLIT2* est associée à une diminution de la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein et est corrélée à la rechute métastatique cérébrale [234], [236].

En clinique, l'étude de 150 échantillons de tumeurs mammaires montre que seulement 5 à 20% des patientes présentent une inactivation simultanée des gènes ROBO1 et SLIT2 sachant que la perte de SLIT2 (60%) est plus fréquente que celle de ROBO1 (26%) [234]. Ainsi, dans un contexte tumoral ou seul le gène *SLIT2* est inactivé, une sur-expression de *ROBO1* peut se produire par la perte d'expression du miRNA-218 codé par l'intron 15 du gène *SLIT2*. Cet aspect est vérifié

expérimentalement par l'invalidation génétique de *SLIT2* dans un modèle cellulaire de carcinome hépatique humain. La perte du gène *SLIT2* entraîne une sur-expression de *ROBO1* qui favorise à son tour la prolifération et la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* [237].

Si l'on prend en considération le type tumoral, les protéines ROBO et SLIT ne sont pas systématiquement des suppresseurs de tumeur. ROBO1 est d'ailleurs sur-exprimé dans les cancers humains de la prostate [238], du colon [239] ainsi que dans les gliomes [240] tandis qu'une sur-expression de SLIT2 est observée dans le cancer de la prostate [238].

En cancérologie, les études mécanistiques s'intéressent principalement au récepteur ROBO4 produit par les cellules endothéliales mais peu, voire pas du tout à celui présent dans les cellules cancéreuses. Ainsi, aucune donnée ne décrit une sur-expression ou bien une inactivation du gène *ROBO4* dans les tissus tumoraux. La méthylation du promoteur proximale du gène *ROBO4* inhiberait son expression dans les cellules qui ne sont pas d'origine endothéliale comme les HEK-293 [194]. Pour autant, le transcrit du gène *ROBO4* est détecté par RTqPCR dans des cellules de cancer du foie [237] et de la vessie [241] suggérant une déméthylation de la région promotrice proximal du gène ou bien l'utilisation d'un promoteur alternatif.

4.2. Implication dans la tumorigenèse et la formation de métastases

La progression des cellules malignes en cellules métastatiques dépend d'un processus multi-étapes impliquant des mécanismes de survie, de prolifération et d'invasion. Plusieurs résultats expérimentaux démontrent l'implication de la signalisation SLIT2/ROBO1 dans les mécanismes qui favorisent la tumorigenèse et le développement des métastases.

4.2.1. Prolifération et survie des cellules tumorales

Les études s'intéressant au rôle de la voie SLIT/ROBO dans la survie et la prolifération des cellules tumorales sont peu nombreuses en dépit de quelques arguments qui prédisent leur implication dans ce processus. En effet, dans les fibrosarcomes, la sur-expression du gène *SLIT2* régule négativement des molécules anti-apoptotiques telles que BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) et BCL-XL (B-Cell

Lymphoma Extra Large) ce qui augmente *in vitro* l'apoptose des cellules cancéreuses et inhibe *in vivo* la croissance tumorale chez des souris *nude* [242]. Les cellules cancéreuses du sein et du poumon qui sur-expriment le gène *SLIT2* montrent une diminution de l'activation de la voie Akt (protein kinase B) impliquée dans la prolifération et la survie des cellules [243], [244]. Par ailleurs, l'invalidation du gène *SLIT2*, dans les cellules cancéreuses hépatiques, est associée à l'activation du facteur Akt et à une augmentation du volume tumoral chez la souris [237] tandis que, dans les cellules de cancer du sein, la sur-expression du gène *SLIT2* inhibe l'activité d'Akt ce qui réduit la croissance tumorale lors de xénogreffe chez la souris [244].

In vivo les résultats d'une étude ont cependant montré que l'injection locale d'anticorps neutralisants anti-ROBO1 et anti-ROBO4 diminue la croissance d'une xénogreffe sous-cutanée murine de cellules cancéreuses de la vessie [241], suggérant une régulation positive de la prolifération par la voie SLIT/ROBO. De plus, *in vitro* dans des cellules de rétine de poulet, l'effecteur de la tyrosine kinase Abl nommé Cables permet l'association de ROBO1/SLIT2 avec la N-cadhérine et entraîne la phosphorylation de la β-caténine et sa translocation nucléaire. Dans le noyau la β-caténine active alors la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, comme celui de la *cycline D1* [244].

4.2.2. Transition épithélio-mésenchymateuse

Plusieurs données en cancérologie démontrent l'implication des protéines SLIT et ROBO dans la régulation de l'expression de la E-cadhérine dont l'inhibition participe à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les cellules tumorales ce qui favorise la migration et l'invasion. Dans la littérature, deux modèles antagonistes de régulation ont été proposés selon le type de cancer et le contexte environnemental de la tumeur.

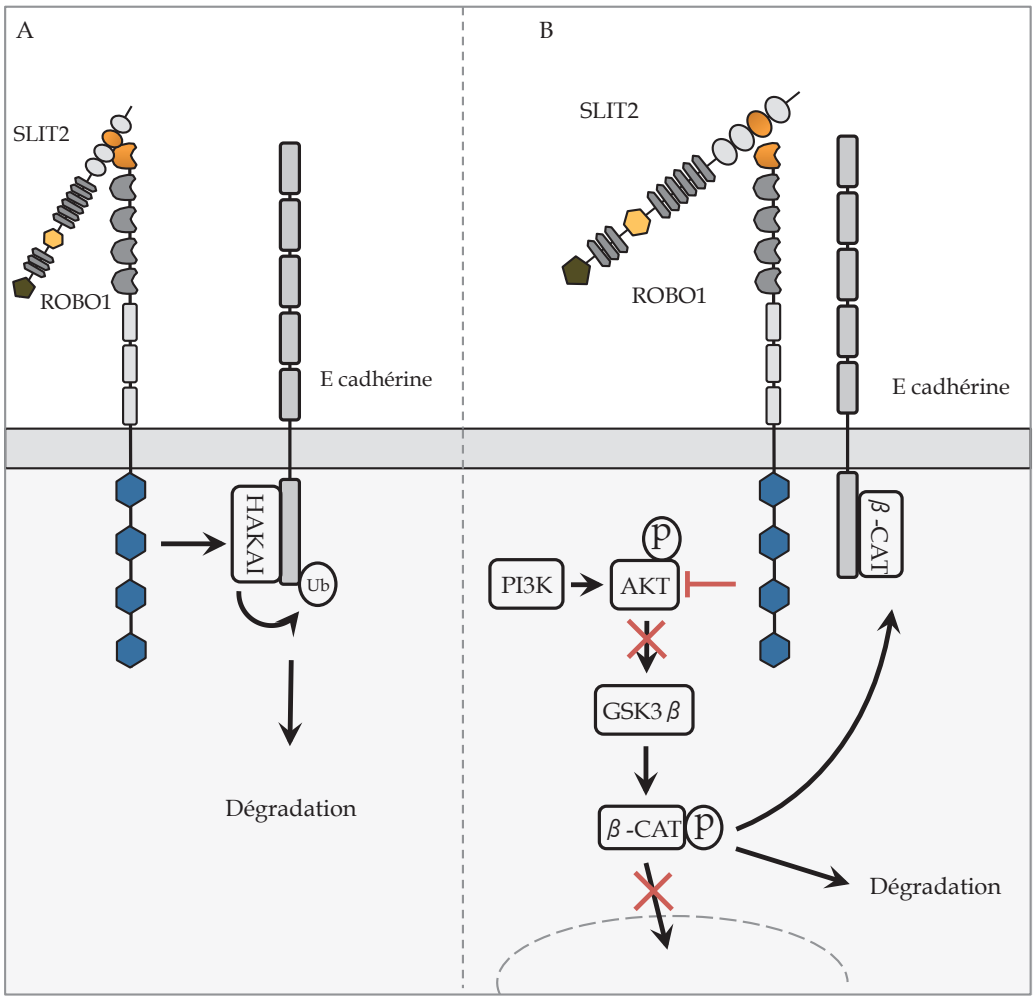


Figure 24. Rôle de la voie SLIT/ROBO dans la transition épithélio-mésenchymateuse.

A. L'interaction SLIT2/ROBO1 permet la fixation de l'ubiquitine ligase HAKAI sur la E-cadhérine ce qui entraîne sa dégradation par le lysosome. La perte d'E-cadhérine entraîne la dissociation des interactions cellule/cellule et l'acquisition d'un phénotype migratoire. **B.** L'interaction SLIT2/ROBO1 inhibe la protéine kinase AKT et par conséquent laisse la GSK3β dans sa forme active non phosphorylée. La β-caténine est alors phosphorylée ce qui l'exclue du noyau et empêche ainsi son activité transcriptionnelle. La β-caténine cytoplasmique est transférée à la membrane où elle interagit avec la E- cadhérine, ce qui stabilise les interactions cellule/cellule et bloque la migration cellulaire.

Dans le premier modèle SLIT2 favorise l'EMT. Dans les cellules de cancer colorectal, la fixation de SLIT2 à ROBO1 entraîne le recrutement de l'ubiquitine ligase HAKAI par la E-cadhérine ce qui induit l'ubiquitination puis la dégradation lysosomale de la E-cadhérine. L'expression ectopique des gènes *SLIT2* et *ROBO1* induit un phénotype mésenchymateux (N-cadhérine+ vimentine+), alors que l'invalidation du gène *ROBO1* ou l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-ROBO1

reverse l'EMT et favorise l'acquisition d'un phénotype épithéliale (E-cadhérine+α-caténine+) [245] **(Figure 24A)**.

Dans le second modèle SLIT2 inhibe l'EMT. La délétion du gène *SLIT2*, dans des cellules de carcinome pulmonaire CL1-5, inhibe l'activité de la GSK-3β, *via* la voie PI3K/Akt ce qui aboutit à la stabilisation et à l'accumulation nucléaire de la β-caténine. Dans le noyau, la β-caténine en stimulant la synthèse du facteur de transcription SNAIL, un régulateur crucial de l'EMT, régule négativement la production de l'E-cadhérine et favorise l'invasion des cellules tumorales [243], [244]. La sur-expression du gène *SLIT2* dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 entraîne une diminution du taux de β-caténine nucléaire et favorise la formation du complexe β-caténine/E-cadhérine ce qui inhibe l'invasion des cellules tumorales [244] **(Figure 24B)**. L'hyperméthylation du promoteur des gènes SLIT fréquemment observée dans les tumeurs primaires de cancers du poumon et du sein pourrait donc promouvoir l'EMT alors que dans les sites métastatiques secondaires comme l'os ou le cerveau, qui expriment fortement SLIT2, cela pourrait au contraire l'inhiber et favoriser la MET qui est un processus agressif de la formation des métastases.

4.2.3. Migration et chimiotactisme

A l'instar du mécanisme très bien décrit pour les cellules du système nerveux, la voie de signalisation SLIT2/ROBO1 régule négativement la mobilité des cellules tumorales en contrôlant l'activité de plusieurs protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, telle que la Rho GTPase CDC42. Cette voie est également décrite pour interférer dans la voie CXCL12/CXCR4 très largement impliquée dans la formation des métastases osseuses du cancer du sein.

L'activité des protéines Rho tels que CDC42 et RAC1 est inhibée par la voie SLIT2/ROBO1 à travers l'activation des SRGAP. Dans les tissus cancéreux du colon, la production de la protéine SRGAP1 est réduite de moitié et sa faible expression est associée à un risque élevé de rechute métastatique [246]. Ce constat clinique est vérifié expérimentalement, en effet le traitement par du SLIT2 recombinant réduit l'activation de CDC42 ce qui inhibe la migration des cellules cancéreuses du colon [247]. De manière similaire, dans des cellules d'ostéosarcomes, la délétion génétique du gène *SRGAP2* par l'utilisation du système CRISPR/Cas9 favorise la migration des

cellules K12 tandis que sa sur-expression entrave ce mécanisme [248]. Une autre protéine GAP nommé Myo9B (Myosin IXB), qui régule la polymérisation d'actine à travers la modulation de RhoA, se fixe sur le domaine extracellulaire de ROBO1. Dans les cellules tumorales pulmonaires, ROBO1 s'associe avec Myo9B et l'inactive, entraînant une inhibition de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses H1299 [249].

Les résultats d'autres études ont mis en évidence la capacité de la voie SLIT2/ROBO1 à inhiber l'effet pro-métastatique de l'axe chimioattractant CXCL12/CXCR4 impliqué dans la formation de métastases [90]. SLIT2 inactive le chimiotactisme induit par CXCL12 des cellules de cancer du sein présentant les récepteurs CXCR4 et ROBO1, en inhibant la phosphorylation et l'activation de la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase), la paxilline, la PI3K, les MAPK ou bien les MMP2/9 [250]. La dérégulation de l'expression de SLIT2 dans les cancers du sein est souvent associée à une sur-expression du couple CXCL12/CXCR4, ce qui contribue au développement de lésions hyperplasiques de la glande mammaire chez des souris invalidées pour les gènes *SLIT2* ou *ROBO1* [235].

4.2.4. Angiogenèse tumorale

ROBO4 est un régulateur négatif de l'angiogenèse pathologique. La croissance tumorale et la formation de métastases sont dépendantes de l'apport d'oxygène et de nutriment par la vasculature. C'est pour cette raison que l'angiogenèse est l'un des mécanismes dérégulés au cours de la croissance tumorale. ROBO4 contrôle deux mécanismes au niveau de l'endothélium pour réguler négativement l'angiogenèse : la perméabilité vasculaire, médiée principalement par les protéines des jonctions serrées comme l'occludine et ZO-1 (Zona Occludin), et la migration endothéliale activée par la voie VEGF/VEGFR. Son implication récemment décrite dans l'angiogenèse tumorale est en adéquation avec son rôle inhibiteur observé dans un contexte de pathologie vasculaire. Dans un modèle *in vitro* de co-culture constitué d'une lignée de cellules endothéliales cérébrales et de cellules tumorales de gliome, ROBO4 est sur-exprimé et inhibe la perméabilité vasculaire par l'inhibition de la voie Src/Erk1, 2/MMP9. Cette inactivation prévient la dégradation de l'occludin et ZO-1 par MMP9 ce qui stabilise la vasculature [251] **(Figure 25A)**. *In vivo,* ROBO4 inhibe la

perméabilité des vaisseaux tumoraux par les mêmes mécanismes. La croissance tumorale des cellules cancéreuses mammaires et la formation de métastases pulmonaires sont accrues chez des souris invalidées pour *ROBO4* tandis que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de Src, la SecinH3, restaure la fonction de ROBO4 et inhibe l'angiogenèse tumorale [252]. Dans un modèle de gliome, ROBO4 inhibe la prolifération des cellules endothéliales induite par les cellules tumorales par l'inhibition de la signalisation du récepteur VEGFR2 **(Figure 25B)**. En effet, la phosphorylation du VEGFR2 ainsi que des protéines PI3K, Akt et FAK en aval sont augmentée lors de la déplétion de *ROBO4*. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces effecteurs contrecarre l'inactivation de ROBO4 [253].

A l'inverse de ROBO4, ROBO1 favoriserait l'angiogenèse tumorale. Les résultats de l'équipe du Dr. Wang montrent que ROBO1 est exprimé dans les cellules endothéliales tumorales et favorise la formation de nouveaux vaisseaux dans les tumeurs présentant une sur-expression de SLIT2. L'utilisation d'un anticorps bloquant dirigé contre ROBO1, inhibe la migration des cellules endothéliales en réponse au SLIT2 sécrété par des cellules humaines de mélanomes A375 [254]. Cette propriété pro-angiogénique est également inhibée *in vivo* lorsque le miRNA-218, qui cible ROBO1, est injecté directement dans la tumeur de cellules cancéreuses gastriques [199].

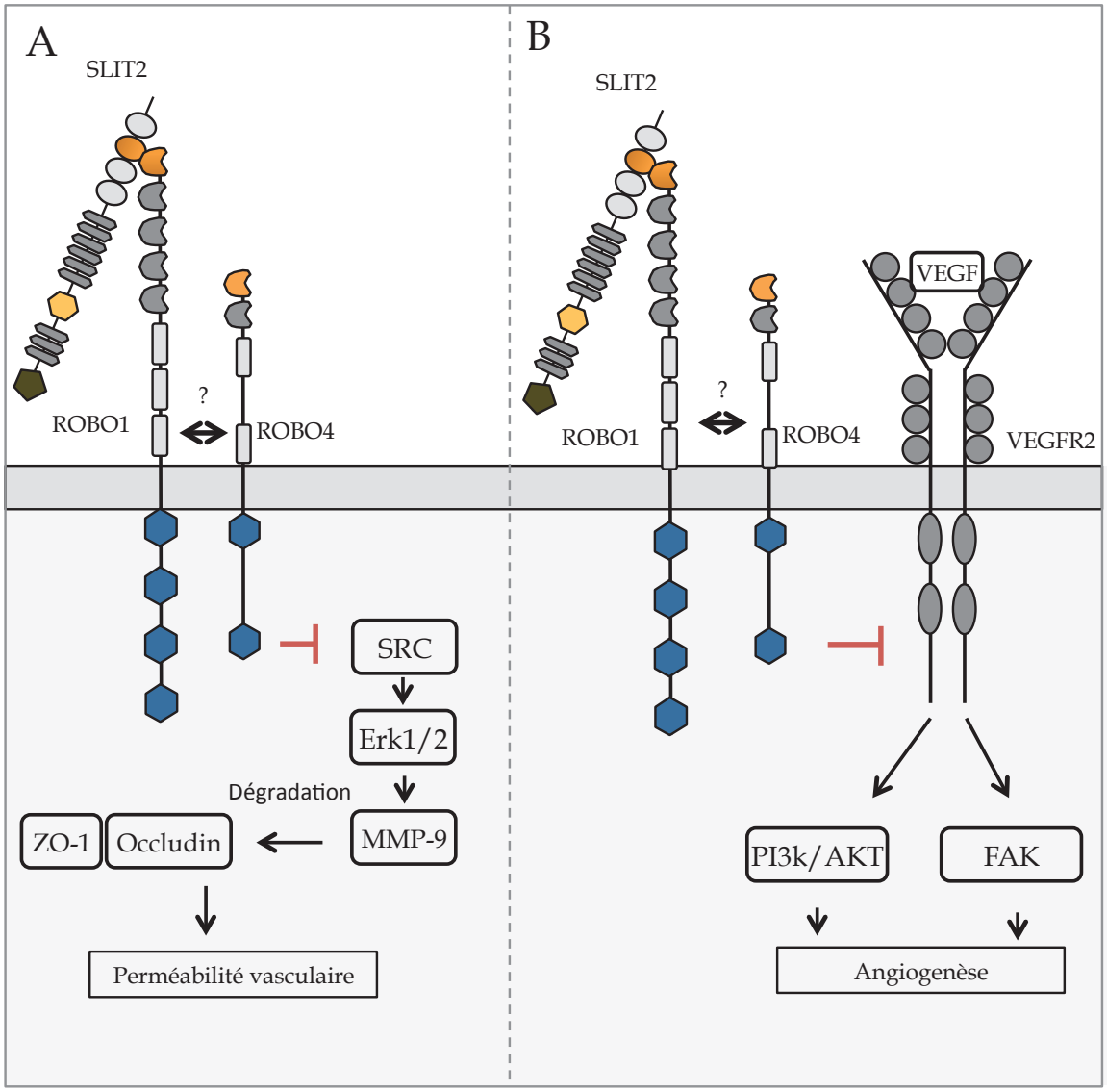


Figure 25. Inhibition de l'angiogenèse tumorale par la voie SLIT2/ROBO4.

A. L'interaction SLIT2/ROBO4 inhibe la perméabilité vasculaire par l'inactivation des protéines SRC, ERK et MMP9 ce qui prévient la dégradation des protéines impliquées dans les jonctions serrées **B.** L'interaction SLIT2/ROBO4 inhibe l'angiogenèse tumorale par l'inactivation de la voie VEGF/VEGFR2.

C. Travail expérimental

I. Introduction et hypothèse de travail

Le développement de métastases osseuses est une conséquence pathologique grave associée à certains cancers comme ceux du sein de la prostate et du poumon. Dans ce contexte pathologique, les cellules tumorales stimulent l'activité des ostéoclastes responsables de la résorption osseuse en inhibant parallèlement celle des ostéoblastes responsables de la formation osseuse. Cette perturbation de l'équilibre du remodelage osseux entraîne la dégradation massive de l'os par les ostéoclastes et libère des facteurs de croissance de la matrice osseuse ce qui favorise la croissance tumorale dans la moelle osseuse.

Le développement des métastases osseuses est à l'origine de complications squelettiques, tels que des fractures et des compressions nerveuses, qui entraînent une morbidité importante. Actuellement, du fait de la difficulté à inhiber la dissémination métastatique des cellules tumorales et leur ancrage dans l'os les traitements proposés aux patientes sont donc principalement des inhibiteurs de la résorption osseuse visant à réduire l'ostéolyse. C'est le cas des bisphosphonates et de l'anticorps anti-RANKL (denosumab). C'est pourquoi, la compréhension des mécanismes moléculaires activés depuis l'apparition de la tumeur primaire jusqu'à la formation des métastases osseuses est un enjeu majeur en cancérologie. L'amélioration des connaissances de ce processus métastatique devrait permettre de répondre à un double défi : détecter précocement les tumeurs présentant un risque de métastases osseuses mais également caractériser de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans les toutes premières étapes de la formation des métastases osseuses que sont la migration puis l'ancrage des cellules tumorales dans l'os.

Dans ce contexte, notre laboratoire s'intéresse particulièrement aux évènements moléculaires et cellulaires précoces aboutissant à l'émergence de métastases osseuses à partir des tumeurs mammaires. Il est actuellement admis que les cellules cancéreuses expriment une signature moléculaire identifiée comme un élément discriminant du potentiel métastatique des tumeurs solides. Ce constat a motivé notre équipe à analyser et comparer les transcriptomes de la lignée cellulaire métastatique MDA-MB-231, dérivée d'un carcinome mammaire humain, et de sa sous-population, la lignée MDA-B02, qui métastase fortement et spécifiquement à

l'os. De manière intéressante, le récepteur de la famille Roundabout, ROBO4, a été trouvé sur-exprimé dans la sous-population ostéotropique MDA-B02, suggérant un rôle potentiel du récepteur ROBO4 dans les étapes métastatiques permettant la formation de métastases osseuses.

Les récepteurs Roundabout (ROBO) ont été initialement décrits comme des régulateurs cruciaux de la migration neuronale et vasculaire lors du développement. ROBO4, qui a été mis en évidence plus tardivement, diverge des autres récepteurs ROBO, par sa structure et par son profil d'expression spécifique limité aux cellules endothéliales et hématopoïétiques. En cancérologie, l'implication de ROBO4 a été principalement décrite dans un contexte vasculaire d'angiogenèse alors que son rôle potentiel dans la biologie des DTCs et des métastases osseuses, n'a jamais été étudié. Le récepteur ROBO4 est également impliqué dans l'ancrage des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans l'os. Ce dernier aspect est d'importance car nous savons maintenant que les cellules tumorales, une fois dans la moelle osseuse, sont capables d'entrer en compétition avec les CSH déjà présentes. Notre hypothèse majeure est donc que la présence du récepteur ROBO4 à la surface des cellules tumorales pourrait favoriser leur ancrage dans la niche osseuse.

Les résultats des premiers travaux réalisés au laboratoire ont conforté cette hypothèse puisque l'invalidation de *ROBO4* par une stratégie de génétique inverse (shRNA) induit une diminution de la croissance tumorale lorsque les cellules MDA-B02 sont injectées dans la glande mammaire de souris *nude* **(Figure 26A)**. De plus, après une injection de ces mêmes cellules par voie intra-artérielle ou intra-tibiale, une diminution drastique de la colonisation et de l'ancrage osseux est observée **(Figure 26B)**. La mise en place d'une stratégie d'inhibition de ROBO4 par l'utilisation d'anticorps conduit aux mêmes résultats, soit, une diminution significative des capacités invasives *in vitro* **(Figure 26C)**, de l'adhérence des cellules tumorales lorsque celles-ci sont co-cultivées avec une lignée ostéoblastique (MC3T3-E1) **(Figure 26D)** ainsi que de l'ancrage des cellules tumorales dans l'os *in vivo* après incubation préalable avec un anticorps anti-ROBO4 **(Figure 26E)**. L'ensemble de ces résultats montre clairement l'implication du récepteur ROBO4 dans les mécanismes tumoraux et métastatiques précoces tels que la croissance tumorale mais aussi la colonisation et l'ancrage des cellules tumorales dans l'os.

Mon projet de thèse se place dans la continuité de ces travaux et a pour objectif d'analyser plus précisément l'implication du récepteur ROBO4 dans l'échappement tumoral et l'ostéotropisme des cellules cancéreuses d'origine mammaire. Pour répondre à cette question, nous avons sur-exprimé le gène humain de *ROBO4* au sein d'une lignée syngénique de carcinome mammaire murin, les cellules 4T1 qui n'expriment pas le récepteur ROBO4 et présentent l'avantage de former spontanément des métastases aux poumons mais aussi à l'os, contrairement aux cellules MDA-B02. Les résultats des analyses biochimiques et fonctionnelles des cellules 4T1 sur-exprimant *ROBO4* nous ont permis de mettre en évidence deux formes du récepteur ROBO4 présentant des propriétés différentes : (i) Une forme glycosylée produite naturellement par les cellules endothéliales HUVEC mais qui n'est pas détectée ni dans les cellules tumorales, telles que les MDA-B02, ni dans les CSH. Une forme de masse moléculaire plus faible, non glycosylée également présente dans les cellules endothéliales HUVEC et les cellules souches hématopoïétiques mais également produite en forte quantité par cellules tumorales ostéotropiques MDA-B02. Cette observation nous a conduit à : i) Caractériser les fonctions de la forme glycosylée dans les capacités invasives des cellules tumorales 4T1 ii) Identifier l'origine de la forme endogène pro-métastatique non glycosylée afin de la produire spécifiquement dans notre modèle.

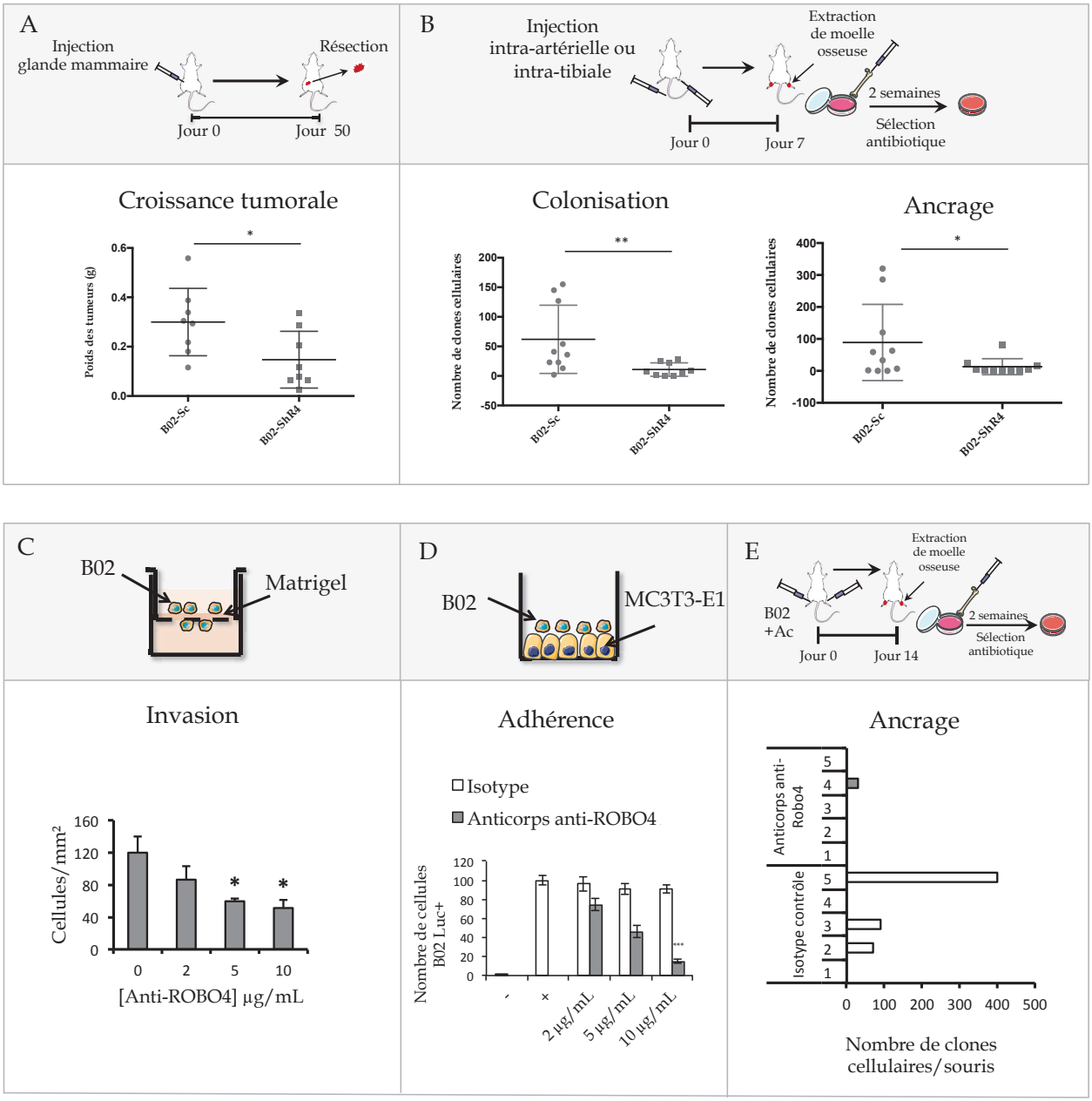


Figure 26. Rôle du récepteur ROBO4 dans les étapes précoces de la formation des métastases osseuses.

La déplétion de ROBO4 par l'utilisation d'un shRNA réduit la croissance tumorale *in vivo* des cellules MDA-B02 injectées dans la glande mammaire **(A)** mais également leur colonisation et leur ancrage dans l'environnement osseux lorsque elles sont respectivement injectées dans la circulation sanguine ou bien directement dans la cavité osseuse **(B)**. Le ciblage de ROBO4 par un anticorps spécifique réduit les capacités invasives **(C)** et l'adhérence **(D)** des cellules tumorales *in vitro* ainsi que leur ancrage dans la moelle osseuse *in vivo* **(E).** * p< 0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

II. Matériels et méthodes

1. BIOLOGIE MOLECULAIRE

1.1. RT-PCR quantitative

Les ARN totaux ont été extraits à partir de cellules en culture à l'aide du kit NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant. La transcription inverse a été réalisée à partir d'un µg d'ARN totaux en utilisant le kit de synthèse d'ADNc iScript (Biorad). La PCR en temps réel a été effectuée sur un système Mastercycler Realplex2 (Eppendorf) en utilisant du SYBR Green (Life technologies) ainsi que les amorces adéquates à 0,5 µM dans des plaques 96 puits (Eppendorf) selon le programme suivant : 2 minutes à 95°C suivie de 40 cycles de 15 secondes à 95°C, 15 secondes à Tm (voir tableau) et 20 secondes à 72°C. L'expression des différents gènes étudiés a été normalisée avec l'expression du gène codant pour la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP). L'analyse a ensuite été faite par la méthode des ΔΔCt (quantification relative normalisée par un rapport à un gène de ménage).

Gène	Référence NCBI	Séquences amorce	Taille de l'amplicon	Tm
hROBO4	NM_019055.5 NM_001301088.1	F- TTCCAgCTCAgACAgCCTCT R- AgTggggAACTgTTggCAT	123pb	67°C
hROBO4 Variant 1	NM_019055.5	F-gAGTAgCCATgggCTCTggAgg R-CTggggCggggAGTCCTG	107pb	64°C
hROBO4 Variant 2	NM_001301088.1	F-gCAggACAAAgTgCTCgggAC R-ggCAgggggCCATgAtgAgC	124pb	65°C
hROBO4 Variant 3		F-gCTCCACTTCACTCAgCCTCC R-gAgCCATgCCTCCTgCTAgAg	115pb	64°C
hROBO4 Variant 4		F-ggAAACTgACTTgCCCAAgTTCTCC R-gCCATgCCTCCACAgggTg	85pb	64°C
hROBO4 Variant 5		F-gCCCTggCCTggATgCTgTg R-gCCATgCCTCCTgggAggg	203pb	65°C
h/m TPB	NM_003194.4 NM_001172085.1 NM_013684.3	F-TggTgTgCACAggAgCCAAg R-TTCACATCACAgCTCCCCAC	139pb	67°C

Tableau 2. Liste des couples d'amorces utilisés pour les expériences de RT-qPCR.

1.2. Western Blot

Les cellules en culture ont été lysées dans un tampon RIPA (Sigma) additionné d'inhibiteurs de protéases (1 mM de sodium orthovanadate, 50 mM de fluorure de sodium, 1 mM de PMSF et 1 µg/mL d'aprotinine et de leupeptine). Les lysats ont été incubés 15 minutes sur glace avant d'être centrifugés à 18 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a été récolté et les protéines dosées à l'aide du kit DC protein Assay (Biorad). Les lysats associés aux membranes ont été extraits à l'aide du kit « ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit » selon les recommandations du fournisseur (Merck Millipore). Les extraits protéiques (20µg) ont été dénaturés à 95°C pendant 5 minutes avant d'être séparés sur un gel SDS-PAGE de concencentration en polyacrylamide de 8,5% puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (Millipore) via un système de transfert liquide pendant 1h à 200V. Les membranes ont été saturées 1h à température ambiante dans du TBS-T 0,02% + 5% de lait écrémé puis incubées 1h avec les anticorps primaires dirigés contre ROBO4 glycosylé (R&D MAB24541 ; 1/500 ; Ac2), ROBO4 non glycosylé (Abcam ab103674 ; 1/500 ; Ac1), α-tubuline (Sigma-Aldrich T5168 ; 1/5000). Après 30 minutes de rinçage dans du TBS-T 0,02%, les membranes ont été incubées 1h avec les anticorps secondaires anti-souris (GE Healthcare ; NA931) ou anti-lapin (GE Healthcare ; NA934) couplés au peroxyde de raifort (HRP). La révélation est effectuée grâce à un kit de détection de chimioluminescence (ECL) (Biorad).

1.3. RACE PCR

Les ARN totaux ont été extraits à partir de cellules en culture MDA-B02 et HUVEC à l'aide du kit NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant. Les ADNc ont été synthétisés par reverse transcription à l'aide d'une reverse transcriptase à activité terminal transférase fournie par le kit SMARTer RACE 5′/3′ (Clontech) et selon les conditions d'utilisation. L'amplification de l'ADNc produit a été réalisée par PCR à l'aide d'une amorce sens spécifique de la séquence nucléotidique ajoutée par la reverse transcriptase et d'une amorce anti-sens complémentaire d'une région de la séquence codante de ROBO4 : 5′ - GATTACGCCAAGCTTGAGCCCGGCCAGAAGATGGTCTCCGGCCGCT - 3′ selon le programme suivant : (30 sec à 94°C, 4 min à 72°C) x 5 (30 sec à 94°C, 30 sec à 70°C,

4 min à 72°C) x 5 (30 sec à 94°C, 30 sec à 68°C, 4 min à 72°C) x 25. Les amplifications ont été purifiées puis clonées par recombinaison homologue dans le plasmide pRACE à l'aide du kit In-Fusion HD Cloning (Clontech). Des bactéries compétentes Stellar (Clontech) ont été transformées par le produit de ligation selon les mêmes procédures que celles réalisées pour les clonages moléculaires de ROBO4. Les plasmides extraits ont été identifiés par séquençage (Cogenics, England) et les résultats analysés à l'aide du logiciel SeaView [255].

1.4. Mutagenèse dirigée

Les réactions de mutagenèse dirigée ont été réalisées par PCR à l'aide du kit Quick Change II XL Directed Site Mutagenesis (Agilent Technologies). Pour cela, le vecteur pLPCX contenant la séquence codante du récepteur ROBO4 a successivement été amplifié à l'aide de quatre couples d'amorces spécifiques contenant la mutation (caractères soulignés) permettant la substitution des résidus asparagines en alanine. Les vecteurs porteurs de la mutation ont ensuite été amplifiés dans des bactéries XL10 gold selon les recommandations du fournisseur. La présence des mutations a été vérifiée par séquençage (Cogenics, England) et les résultats analysés à l'aide du logiciel ApE (A Plasmid Editor).

Mutation	Amorces
N246A	F-GCGAATTCAGCTGGAAGCTGTGACACTGCTGAACC R-GGTTCAGCAGTGTCACAGCTTCCAGCTGAATTCGC
N360A	F--GACTCTAAAGCCTGGCGCTGGCACTGTCTTTGTG R-CACAAAGACAGTGCCAGCGCCAGGCTTTAGAGTC
N389A	F--CTGGAGCCTGGGCGCCACATCACTGCCAC R-GTGGCAGTGATGTGGCGCCCAGGCTCCAG
N396A	F--CACATCACTGCCACCAGCCGCCTGGACTGTAGTTGGTGAG R-CTCACCAACTACAGTCCAGGCGGCTGGTGGCAGTGATGTG

Tableau 3. Liste des couples d'amorces utilisés pour les expériences de mutagenèse dirigée.

1.5. Clonage moléculaire

Les ADNc ont été synthétisés par reverse transcription à l'aide de la M-MLV RT (Promega) à partir d'ARN polyA+ de cellule MDA-B02. Les ADNc codant pour les différentes formes de ROBO4 ont ensuite été amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques permettant la génération des sites de restriction NotI aux extrémités 5' et 3' de l'insert. Le fragment d'ADN double brin obtenu a été purifié et digéré par l'enzyme NotI (Life technologies) pendant 24h à 37°C. Parallèlement, le vecteur rétroviral destinataire pLPCX (Clontech) a été digéré par les mêmes enzymes pendant 3h à 37°C. Ce plasmide comporte : la région LTR 5' du Moloney murine sarcoma virus (MoMuSV) permettant l'expression du gène de résistance à la puromycine nécessaire pour une sélection antibiotique des cellules eucaryotes; une séquence d'encapsidation Ψ; le promoteur eucaryote du cytomégalovirus (CMV) permettant l'expression du transgène ; la région LTR 3' du Moloney Murine Leukemia Virus (MoMuLV) ; le gène de résistance à l'ampicilline permettant la selection positive des bactéries ayant intégrées le plasmide.

La réaction de ligation a été effectuée à l'aide d'une T4 DNA ligase (Promega). Le produit de ligation obtenu a été incubé 10 minutes dans la glace avec 50 µL de bactéries compétentes JM109 (Promega). Un choc thermique de 45 secondes à 42°C a été effectué, permettant l'entrée du plasmide dans les bactéries, suivi d'un retour sur glace pendant 2 minutes et un ajout de 500 µL de milieu LB liquide (Luria Bertani) à 4°C. Après 1h d'incubation à 37°C et sous agitation, les bactéries ont été étalées sur un milieu gélosé LB supplémenté de 100 µg/mL d'ampicilline pour une sélection sur la nuit, des clones porteurs du gène de résistance. Une dizaine de clones résistants ont été ensemencés dans 7 mL de milieu LB liquide supplémentés de 100 µg/mL d'ampicilline. Après une nuit à 37°C sous agitation, les plasmides ont été extraits à l'aide du kit « NucleoSpin ® plasmid » (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. La concentration d'ADN a été mesurée par absorbance à 260nm et sa pureté évaluée par le rapport des densités optiques à 260 et 280nm. La nature de l'insert a été vérifiée par séquençage (Cogenics, England) et les résultats analysés à l'aide du logiciel ApE (A Plasmid Editor).

Inserts	Amorces	TM
ROBO4 Variant 1 : NM_NM_019055.5	F-ATAAGAATGCGGCCGCAGAGTAGCCATGGGCTCTGGAGGAG R-ATAGTTTAGCGGCCGCCCCGTCTGGGAAGTCTCAGGG	65°C
ROBO4 Variant 2 : NM_001301088.1	F--ATAGTTTAGCGGCCGCCGGGACATGGTGGCTGTGGT R-ATAGTTTAGCGGCCGCCCCGTCTGGGAAGTCTCAGGG	64°C
ROBO4 Variant 3	F--ATAGTTTAGCGGCCGCCGGGACATGGTGGCTGTGGT R-ATAGTTTAGCGGCCGCCCCGTCTGGGAAGTCTCAGGG	64°C
ROBO4 Variant 4	F--ATAGTTTAGCGGCCGCCTGAATATGGACACACCCTGTGGAG R-ATAGTTTAGCGGCCGCCCCGTCTGGGAAGTCTCAGGG	65°C
ROBO4 Variant 5	F--ATAAGAATGCGGCCGCCATGCTATGCAAGCCCTGGCCTGG R-ATAGTTTAGCGGCCGCCCCGTCTGGGAAGTCTCAGGG	64°C

Tableau 4. Liste des couples d'amorces utilisés pour les expériences de clonage moléculaire.

2. BIOLOGIE CELLULAIRE

2.1. Culture cellulaire

L'ensemble des lignées tumorales ont été cultivées en milieu complet c'est-à-dire supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Lonza) et 1% (v/v) de pénicilline/streptomycine (Life technologies) à 37°C dans un incubateur à 5% de CO_2. Les cellules endothéliales ont été cultivées dans du milieu complet supplémenté par 0,02% de sérum de vœu fœtal, 5ng/mL du facteur de croissance épidermique (EGF), 10ng/mL de FGF, 20ng/mLd'IGF-1, 0,5ng/mL de VEGF-A165, 1µg/mL d'acide ascorbique, 22,5 µg/mL d'héparine et 0,2 µg/mL d'Hydrocortisone (Promocell).

Cellule	Type cellulaire	Référence	Milieu de culture
HUVEC	Cellules endothéliales de veine ombilicale humaine	PromoCell C-12203	Endothelial Cell Basal Medium 2 PromoCell #C-22111
HPMEC	Cellules endothéliales de microvaisseaux pulmonaires	PromoCell C-12203	Endothelial Cell Basal Medium 2 PromoCell #C-22111
MDA-MB-231	Lignée d'adénocarcinome mammaire humain (effusion pleurale)	ATCC HTB-26	DMEM Life technologies #31885-023
MDA-B02	Lignée ostéotropique dérivée de la lignée MDA-MB-231		DMEM Life technologies #31885-023
HEK-293	Lignée de cellules rénales embryonnaires humaines		DMEM Life technologies #31885-023
HeLa	Lignée cancéreuse du col de l'utérus		DMEM Life technologies #31885-023
4T1	Lignée d'adénocarcinome mammaire murin (tumeur spontanée BALB/c)	ATCC CRL-2539	RPMI-1640 Life technologies #A10491-01
66C14	Lignée d'adénocarcinome mammaire murin présentant un tropisme pulmonaire (tumeur spontanée BALB/c)	Cheryl L. Jorcyk (PhD)	MEM α Life technologies #22561-021

Tableau 5. Liste des lignées cellulaires cultivées.

2.2.Transduction

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

sous sélection antibiotique, puromycine à 2 µg/mL (GE Healthcare).

2.3. Transfection

Les lignées cellulaires utilisées pour les expériences de transfection ont été ensemencées à une densité de 2,5 10^5 cellules dans une plaque de culture 6 puits (Corning) dans du DMEM complet (Life technologies). Le lendemain, les cellules ont été transfectées en utilisant l l'agent de transfection X-tremeGENE HP DNA (Roche) et 1 µg des différentes constructions. 48h après la transfection, les lysats protéiques ont été récupérés et analysées par Western Blot.

2.4. Cytométrie de flux

Les cellules ont été décollées par l'action de la trypsine puis centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes. Le culot a ensuite été rincé dans du PBS-BSA 1% et $2 \cdot 10^5$ cellules ont été incubées pendant 40 minutes à 4°C soit avec un anticorps monoclonal anti-ROBO4 humain (R&D MAB265721 ; 1/200), soit avec l'isotype contrôle IgG2b (BD Pharmingen 556654 ; 1/200). Après un rinçage au PBS-BSA 1% et une centrifugation à 1700 rpm pendant 10 minutes, les cellules ont été incubées 40 minutes à 4°C avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) (Life technologies F-11021; 1/400). A nouveau, les cellules ont été lavées avec du PBS-BSA 1% puis centrifugées à 1700 rpm pendant 10 minutes. Le culot a été dilué dans 500 µL de PBS et les cellules ont été analysées à l'aide du cytomètre FACS Canto II (BD Biosciences).

2.5. Test de migration et d'invasion

Les expériences en chambre de Boyden modifiée ont été réalisées en plaque de culture cellulaire 24 puits avec des inserts contenant des pores de 8 µm de diamètre (Corning). Pour les tests d'invasion cellulaire, les inserts ont été préalablement « coatés » avec 100 µL de Matrigel déplété en facteurs de croissance à 0,3 µg/ml (Corning) et polymérisé 90 min à 37°C. Les cellules tumorales 4T1 ($6 \cdot 10^4$ cellules pour les tests de migration et 1.10^5 cellules pour les tests d'invasion) ont été diluées dans 300µL du milieu de culture contenant 0,1% (p/v) d'albumine de sérum bovin et ont été placées dans la partie supérieure tandis que 750 µL de chimioattractant (milieu de

culture supplémenté avec 2% (v/v) pour les tests de migration ou 10% pour les tests d'invasion de sérum de veau foetal) ont été ajoutés dans la partie inférieure. Après 24h d'incubation à 37°C sous 5% de CO_2, les cellules non migrantes ont été retirées et celles ayant migré ont été fixées et colorées au cristal violet. Afin de quantifier le nombre de cellules, les inserts ont été dissous dans 200 µL d'acide acétique 10% (v/v) et 150 µL de cette solution ont été utilisés pour une lecture à DO = 570 nm.

3. EXPERIMENTATION ANIMALE

Toutes les expériences menées sur les souris ont été effectuées suite à un avis favorable émis par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale de l'Université Claude Bernard Lyon1. Les expériences d'injection dans la glande mammaire (FatPad) ont été réalisées chez des souris femelles BALB/cByJ immunocompétentes âgées de 5 semaines. Les cellules 4T1 contrôle ou sur-exprimant le gène *ROBO4* ont été injectées (10^5 cellules dans 10µL) dans le tissu adipeux de la quatrième glande mammaire. Quatorze jours après l'injection, la tumeur engendrée a été réséquée, pesée à l'aide d'une balance de précision et mesurée à l'aide d'un pied à coulisse digitale. Une partie de la tumeur a été incluse en paraffine tandis que l'autre partie a été congelée. Les souris ont été mises à mort deux semaines après la résection et les pattes (fémurs et tibia) et les poumons ont été prélevés et découpés à l'aide d'un scalpel. Les broyats d'os et de poumons ont été incubés dans 1,5 mL de collagénase/hyaluronidase 1X (StemCell) pendant 2h à 37°C sous agitation (110 rpm) puis filtrés sur tamis cellulaire 100µm. Les cellules de la moelle osseuse et du tissu pulmonaire ainsi recueillies ont été mises en culture dans du milieu complet supplémenté de 10µg/mL de 6-thioguanine (Sigma) permettant une sélection des cellules tumorales résistantes a l'antibiotique. Après deux semaines de culture, les colonies de cellules tumorales ont été fixées et colorées au cristal violet puis comptées.

La différence statistique entre les groupes a été évaluée par le test de Mann-Whitney en utilisant le logiciel Graphpad PRISM6. Les données ont été présentées sous forme de moyenne ± écart-type (SD). Des valeurs p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$).

III. Résultats

1. SUR-EXPRESSION DU GENE *ROBO4* HUMAIN DANS LE MODELE MURIN DE METASTASES OSSEUSES 4T1

Les précédentes expériences d'inhibition de l'expression du récepteur ont permis de démontrer que ROBO4 favorise la migration, l'invasion et l'ancrage des cellules tumorales MDA-B02 dans l'environnement osseux. Pour approfondir l'étude du rôle de ROBO4 dans le tropisme osseux et la formation des métastases osseuses, nous avons choisi de sur-exprimer le gène humain *ROBO4* dans un modèle cellulaire murin de carcinome mammaire syngénique. Un tel modèle permet l'utilisation de souris immunocompétentes et autorise l'étude de la formation de métastases dans un contexte ou le système immunitaire est présent. La lignée 4T1 a été choisie notamment pour ses propriétés, similaires à celui du cancer du sein humain, à former des métastases spontanément aux poumons mais aussi à l'os une fois injectées dans la glande mammaire d'une souris Balb/c. De plus, la quantification de ROBO4 par PCR quantitative et Western Blot montre que le récepteur ROBO4 n'est que faiblement produit par cette lignée cellulaire. Nous considérons donc que la lignée 4T1 est un modèle approprié pour étudier les conséquences d'une sur-expression.

1.1. Construction des outils

Afin de produire la protéine humaine ROBO4 dans les cellules de carcinome mammaire murin 4T1, la séquence codante du transcrit humain de ROBO4 référencée dans la base de données du NCBI (NM_019055.5) et permettant la synthèse d'une protéine de 1007 acides aminés (UniProt : Q8WZ75) a été amplifiée du codon d'initiation au codon stop **(Figure 27)**. L'amplification nucléotidique a ensuite été insérée par clonage orienté dans le vecteur d'expression rétroviral pLPCX qui permet l'insertion du fragment d'ADN dans le génome des cellules hôtes par transduction. Cette technique de transfert de gènes présente l'avantage de produire une population hétérogène de cellules exprimant la forme humaine de ROBO4 évitant ainsi un potentiel effet clonal.

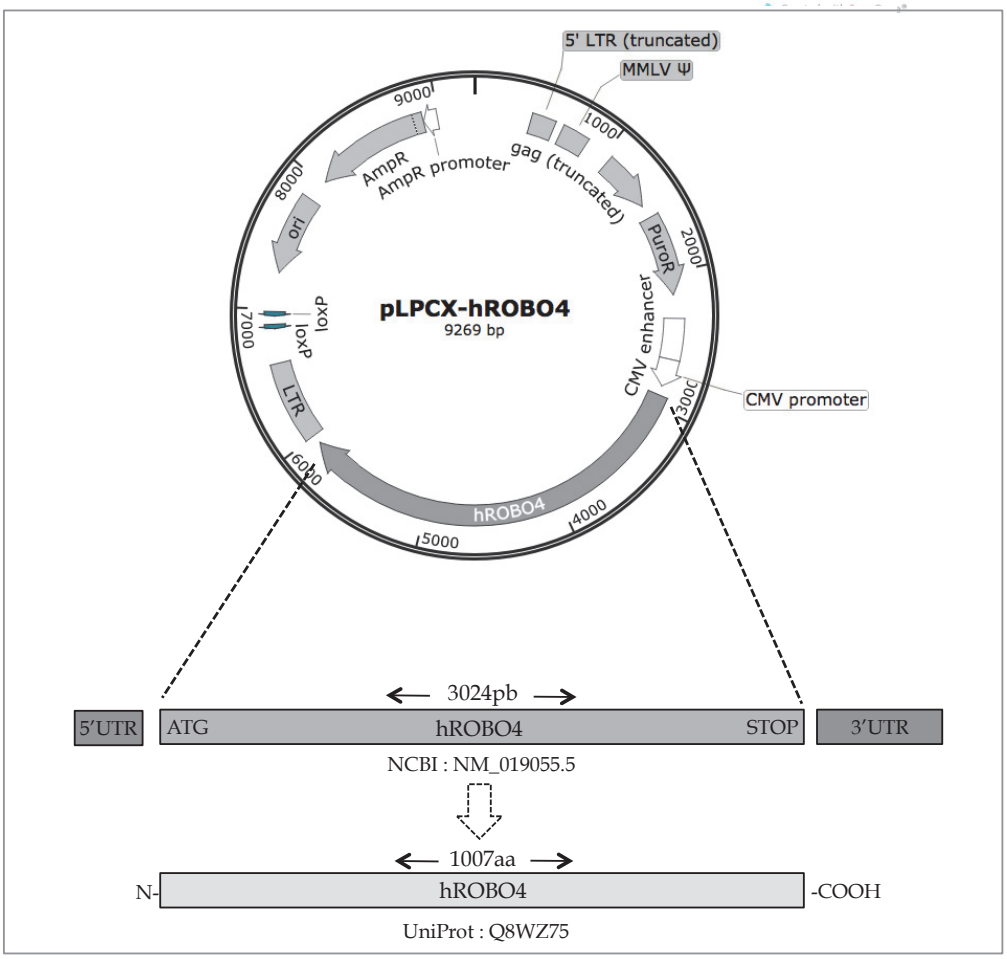


Figure 27. Vecteur d'expression rétroviral PLPCX-hROBO4.

Vecteur rétroviral pLPCX (Clontech) contenant la région codante du récepteur humain ROBO4 codant une protéine de 107kDa. Amp(R) : gène de résistance à l'ampicilline, Puro(R) : gène de résistance à la puromycine, pCMV : promoteur eucaryote du cytomégalovirus.

1.2. La sur-expression de *ROBO4* dans les lignées murines de carcinome mammaire aboutit à l'accumulation d'une forme protéique de masse moléculaire élevée

Les conséquences de la sur-expression de ROBO4 dans les mécanismes tumoraux et métastatiques ont été étudiées dans la lignée cellulaire 4T1 mais aussi dans la lignée 66C14 qui présente un tropisme pulmonaire et dérive de la même tumeur initiale. Ces cellules ont été transduites avec le vecteur pLPCX-hROBO4 et avec le vecteur pLPCX-Contrôle. Après une sélection antibiotique des cellules ayant intégré le transgène, les ARN totaux ainsi que les protéines totales des cellules de la lignée 4T1 et 66C14 ont été extraits. Les ADNc ont été amplifiés et quantifiés par PCR

à l'aide d'amorces spécifiques du gène *ROBO4* humain **(Figure 28A)** tandis que la protéine ROBO4 a été analysée par Western Blot à l'aide d'un anticorps polyclonal (Ac1) dirigé contre ROBO4 **(Figure 28B)**.

L'ARNm de ROBO4 humain est fortement détecté dans les lignées cellulaires 4T1 et 66C14 transduites avec le vecteur contenant le transgène (4T1-R4 et 66C14-R4) en comparaison de celles transduites avec le vecteur vide (4T1-CT et 66C14-CT) **(Figure 28A)**. Dans les mêmes cellules, la quantité de protéine ROBO4 détectée par Western Blot ne varie pas **(Figure 28B, piste 3-6)**. L'anticorps Ac1 détecte habituellement une protéine à une masse moléculaire apparente d'environ 110kDa dans les cellules MDA-B02 et les cellules HUVEC. Cette masse moléculaire est théoriquement attendue en raison du nombre de nucléotides présents dans la séquence codante de ROBO4 utilisée pour la construction dans le vecteur pLPCX **(Figure 28)**. L'utilisation d'un anticorps monoclonal (Ac2) a permis de détecter une accumulation protéique dans les cellules 4T1-R4 et 66C14-R4, à une masse moléculaire apparente d'environ 160 kDa **(Figure 28B, piste 4 et 6)**. Ce résultat indique que la construction est fonctionnelle et permet la synthèse du transcrit et sa traduction en protéine reconnue par l'anticorps anti-ROBO4 Ac2. Des cellules HUVEC exprimant fortement ROBO4 ont alors été analysées avec ce second anticorps, et de manière intéressante ces cellules contiennent naturellement les deux formes protéiques de ROBO4 comme montré dans la **figure 28B, piste 2**.

Des expériences de cytométrie en flux réalisées avec l'anticorps Ac2 confirment les résultats observés en Western Blot et indiquent que cette forme de masse moléculaire élevée de la protéine ROBO4 est fortement détectée à la membrane plasmique dans les lignées 4T1 et 66C14 transduites avec le vecteur contenant le transgène **(Figure 28E)**. L'observation d'une forme de masse moléculaire élevée suggère une modification post-traductionnelle de ROBO4. De plus, alors que cette forme de ROBO4 est naturellement produite par les cellules endothéliales HUVEC, elle n'est pas détectée dans les cellules tumorales MDA-B02 **(Figure 28, piste 1)**.

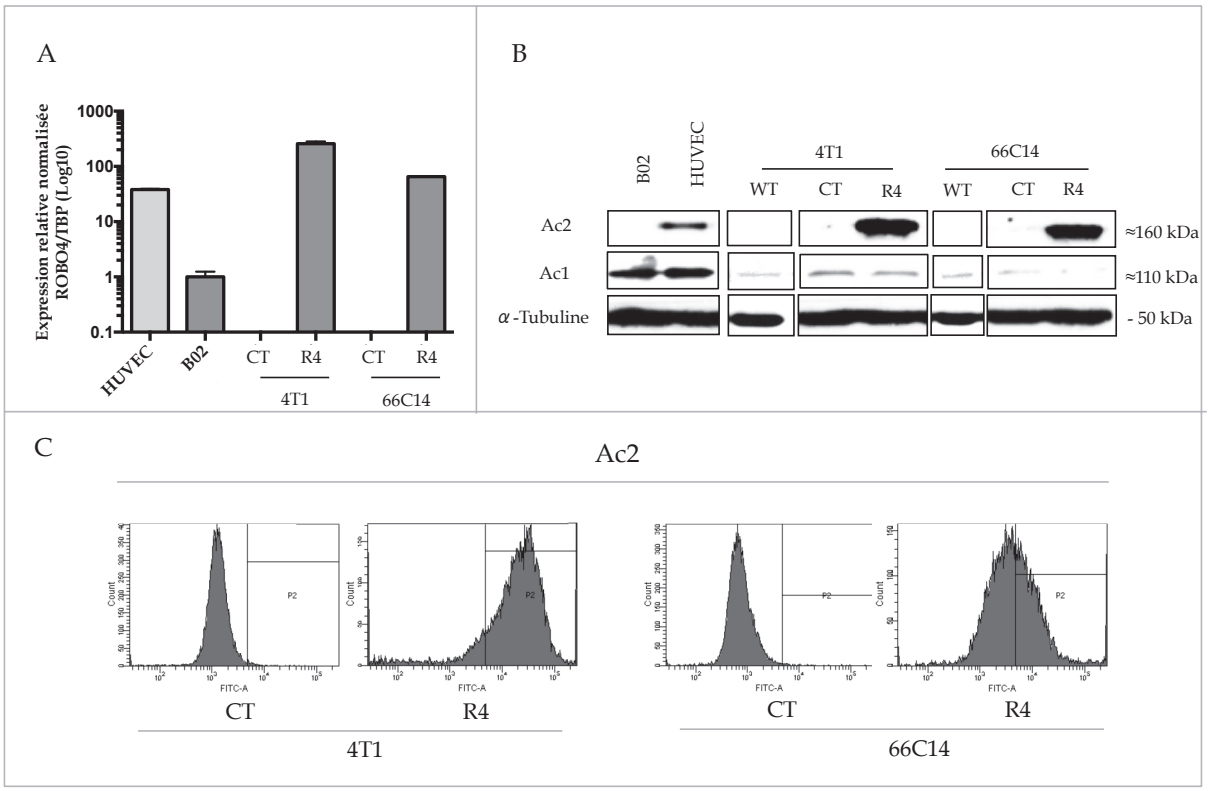


Figure 28. Analyse de l'accumulation des transcrits et détection de la protéine ROBO4 dans les lignées murines de cancer du sein transduites.

(A). La présence des transcrits de ROBO4 humain a été déterminée par RT-qPCR dans les cellules Wild Type (WT : non transduite) contrôle (CT : transduite avec le vecteur vide) et les cellules sur-exprimant *ROBO4* (R4). L'ensemble est représenté par un histogramme logarithmique. (B). La présence de la protéine a été recherchée par Western Blot à l'aide d'un anticorps polyclonal (Ac1) et monoclonal (Ac2) ciblant la protéine ROBO4. Les cellules endothéliales HUVEC et les cellules tumorales MDA-B02 ont été utilisées comme contrôle positif. (C). La présence de la protéine ROBO4 à la membrane cellulaire a été confirmée par cytométrie de flux.

1.3. Le récepteur ROBO4 est une protéine glycosylée

Au regard des résultats précédents, nous avons émis l'hypothèse que la différence de masse moléculaire observée en Western Blot pouvait résulter d'une modification post-traductionnelle de la protéine ROBO4. Sur la base de la séquence de l'ADNc de ce récepteur, 4 sites potentiels de N-glycosylation dans la partie extracellulaire ont été décrits. Cependant, la caractérisation de la glycosylation du récepteur ROBO4 n'a jamais été décrite à ce jour. En conséquence, les cellules 4T1 et 66C14 sur-exprimant ou non ROBO4 ont été traitées à la tunicamycine (un antibiotique qui bloque les premières étapes de la N-glycosylation) afin de rechercher son effet sur la synthèse des formes détectées à une masse moléculaire de 110 et de

160 kDa. Les cellules ont été traitées avec 10µg/mL de tunicamycine pendant 19h et la présence des deux formes de ROBO4 a été analysée par Western Blot à l'aide des anticorps Ac1 et Ac2 précédemment utilisés **(Figure 29)**. En l'absence de traitement, la protéine ROBO4 est détectée à une masse moléculaire de 160 kDa dans les cellules 4T1-R4 et 66C14-R4 ainsi que dans les cellules endothéliales HUVEC utilisées comme contrôle positif. Cependant, lorsque ces cellules sont traitées par la tunicamycine on observe une perte du signal à cette masse moléculaire, indiquant qu'une glycosylation est à l'origine de la masse moléculaire élevée observé en Western Blot. Cependant, l'accumulation de la protéine à une masse moléculaire inférieure n'est jamais détectée lors du traitement par la tunicamycine **(Figure 29)**. Cette observation reflète probablement la perte de stabilité de la protéine engagée dans la voie de glycosylation lorsque celle-ci est inhibée. De plus, la forme endogène détectée à 110 kDa dans les cellules MDA-B02 et les HUVEC n'est pas sensible au traitement par la tunicamycine indiquant que cette forme protéique ne subit pas de N-glycosylation.

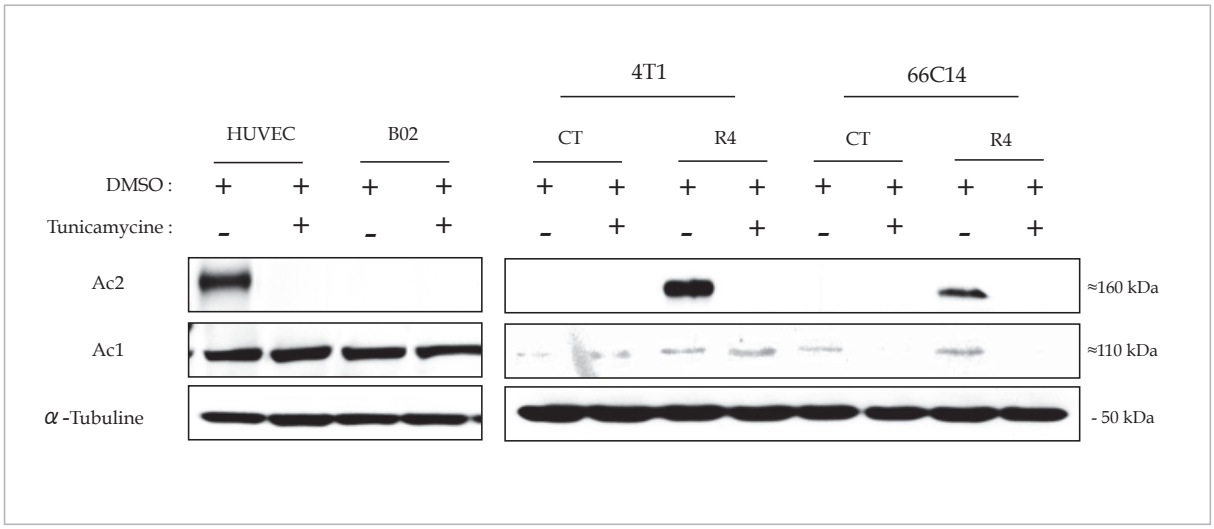


Figure 29. Caractérisation de la glycosylation du récepteur ROBO4.

Les cellules murines 4T1 et 66C14 sur-exprimant ou non le gène *ROBO4* ainsi que les cellules HUVEC et MDA-B02 ont été traitées pendant 19h avec de la tunicamycine ou du DMSO utilisé comme contrôle. La protéine ROBO4 a été détectée par Western Blot à l'aide des anticorps Ac1 et Ac2.

1.4. Détection des formes protéiques glycosylée et non glycosylée de ROBO4 dans les cellules endothéliales, hématopoïétiques et tumorales

La caractérisation d'une forme glycosylée, présente naturellement dans les cellules endothéliales HUVEC mais qui n'est pas détectée dans les cellules tumorales MDA-B02, nous a conduit à rechercher sa présence dans d'autres lignées tumorales et endothéliales ainsi que dans les cellules souches hématopoïétiques décrites pour exprimer le gène *ROBO4*. Nous disposons de deux anticorps spécifiques dirigés contre la protéine ROBO4. Le premier nommé (Ac1) est un anticorps polyclonal produit contre un peptide synthétique représentant la région 245-265 de la protéine. Il détecte une forme de masse moléculaire d'environ 110 kDa et est utilisé dans tous nos tests *in vitro* et *in vivo* **(Figure 26C, D, E)**. Le deuxième appelé (Ac2) est un anticorps monoclonal produit contre une protéine recombinante, représentant le domaine extra-cellulaire de ROBO4 dont l'épitope n'est pas communiqué par le fournisseur (R&D). Il permet la détection d'une forme d'une masse moléculaire d'environ 160 kDa **(Figure 30)**. Afin de vérifier que la production d'une forme glycosylée est commune aux cellules endothéliales et n'est donc, par conséquence, pas artéfactuelle, la présence de la protéine a été recherchée par Western Blot dans un autre type de cellules endothéliales, les cellules HPMEC (Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells). L'analyse protéique de ces cellules montre, comme dans les cellules endothéliales HUVEC, une accumulation des deux formes : glycosylée et non glycosylée **(Figure 30A).** Cette observation est confirmée par une analyse des cellules HPMEC en cytométrie de flux à l'aide de l'anticorps Ac2 **(Figure 30B)**. L'une des hypothèses que nous soutenons est, que comme les CSH, ROBO4 produit par les cellules tumorales pourrait favoriser leur ancrage dans l'os. Il était donc légitime de rechercher les formes produites par les CSH. Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès, de l'UMR-S1197 à PARIS, nous avons eu accès à un échantillon de CSH CD34+ provenant de moelle osseuse humaine. L'analyse par Western Blot montre que seule la forme non glycosylée est détectée dans ce type cellulaire, c'est-à-dire un profil similaire à celui des cellules tumorales ostéotropiques MDA-B02 **(Figure 30A)**. De la même manière, lors de l'analyse de l'ensemble des lignées de carcinomes mammaires humains disponibles au laboratoire (triple négative, luminal A/B et HER2+) par le Dr.

Clément-Demange, seule la forme non glycosylée du récepteur ROBO4 est détectée **(Figure 30C)**. Ces résultats suggèrent un rôle de la forme non glycosylée dans les mécanismes d'ancrage à l'os médiés par le récepteur ROBO4, commun aux cellules souches hématopoïétiques et aux cellules tumorales. Il serait donc pertinent de produire spécifiquement la forme non glycosylée afin d'étudier l'effet de sa modulation dans l'ostéotropisme des cellules tumorales.

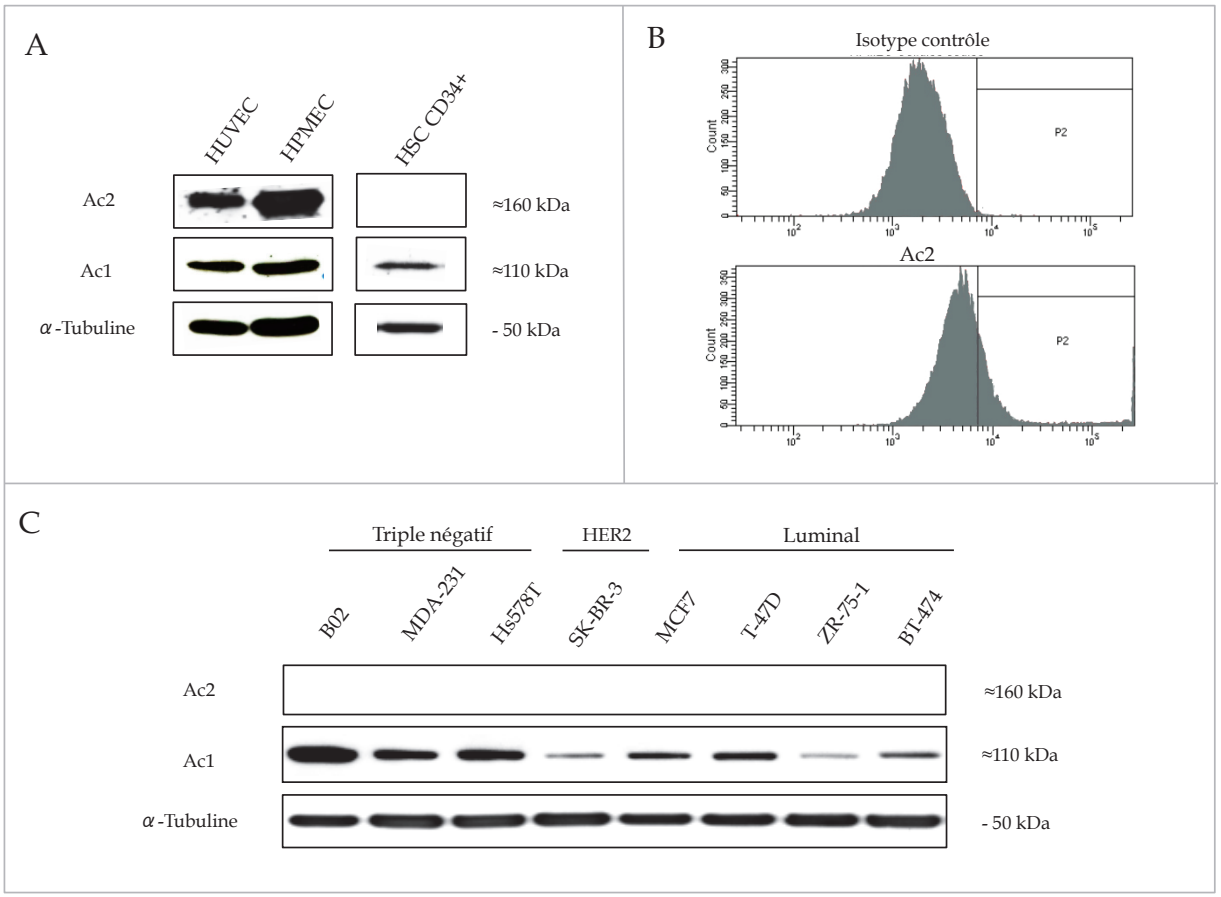


Figure 30. Détection des formes glycosylée et non glycosylée dans les cellules endothéliales, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules tumorales de carcinomes mammaires humains.
(A). La présence de la protéine ROBO4 glycosylée et non glycosylée a été détectée, à l'aide des anticorps Ac1 et Ac2, dans les lysats des cellules endothéliales HUVEC et HPMEC ainsi que celui des cellules souches hématopoïétiques humaines CD34+. **(B).** La présence de la forme glycosylée à la membrane plasmique des cellules HPMEC a été confirmée par cytométrie de flux à l'aide de l'anticorps Ac2. **(C).** La présence de la forme glycosylée de ROBO4 a également été recherchée dans des lignées tumorales de carcinomes mammaires dont le statut hormonal est différent.

1.5. La forme protéique glycosylée de ROBO4 réduit la migration et l'invasion des cellules 4T1 mais n'affecte pas leur propriétés tumorales *in vivo*

Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont démontré l'implication de ROBO4 dans les capacités invasives des cellules tumorales ostéotropiques MDA-B02 **(Figure 26C)**. Toutefois, dans les cellules 4T1 sur-exprimant ROBO4 nous avons mis en évidence la présence, dans cette lignée, d'une forme glycosylée de ROBO4 ainsi que l'absence de la forme endogène non-glycosylée qui est présente dans les MDA-B02. L'effet de la sur-expression de la forme glycosylée de ROBO4 sur la migration et l'invasion des cellules cancéreuses 4T1 a alors été examiné *in vitro* en utilisant une chambre de Boyden modifiée **(Figure 31).**

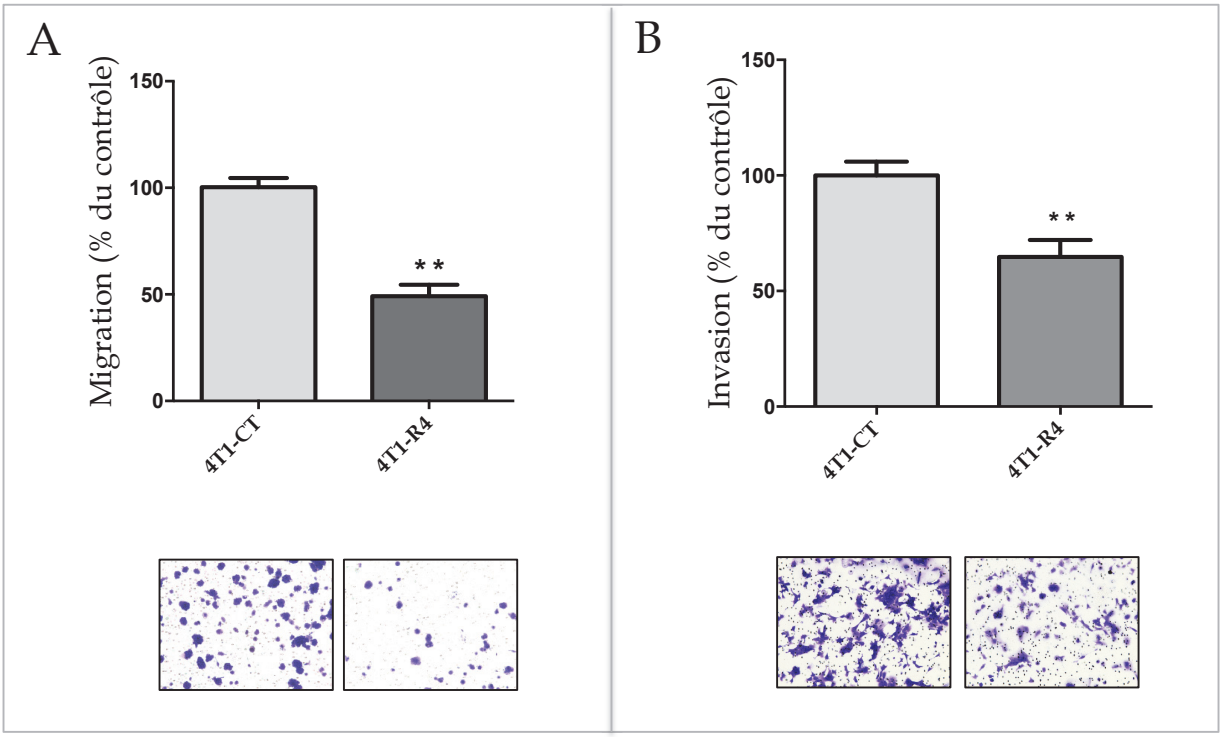


Figure 31. Effet de la forme glycosylée du récepteur ROBO4 sur la migration et l'invasion des cellules cancéreuses 4T1.

La capacité migratoire **(A)** et invasive **(B)** des cellules 4T1 transduites a été analysée dans une chambre de Boyden modifiée en utilisant le SVF (sérum de veau fœtal) comme chimioattractant. La membrane de la chambre de Boyden a préalablement été recouverte de matrigel pour les études de l'invasion. Les histogrammes représentent le pourcentage de migration des cellules 4T1 sur-exprimant ROBO4 par rapport au pourcentage de migration des cellules 4T1 contrôle. ** : $p<0,001$(Mann Whitney), les résultats présentés sont le cumul de 3 expériences indépendantes.

La sur-expression de la forme glycosylée du récepteur humain de ROBO4 réduit de 50% la migration des cellules 4T1-R4 en comparaison avec les 4T1-CT **(Figure 31A)**. De la même manière, en présence de matrigel, la sur-expression du récepteur ROBO4 glycosylé diminue significativement l'invasion des cellules tumorales murines 4T1 **(Figure 31B).** L'ensemble de ces résultats suggère que contrairement à la forme endogène non-glycosylée du récepteur ROBO4, l'isoforme glycosylée présenterait des propriétés inhibitrices sur la migration et l'invasion des cellules tumorales.

L'implication de la forme glycosylée du récepteur ROBO4 a également été étudiée dans la croissance tumorale primaire et le tropisme osseux des cellules tumorales *in vivo*. Les cellules 4T1-CT ou 4T1-R4 ont été injectées dans la glande mammaire de souris femelles Balb/c. Quatorze jours après l'injection, la tumeur a été réséquée puis pesée **(Figure 32)**. Les deux populations cellulaires ont été capables de croître dans la glande mammaire. Cependant, aucune différence de poids n'est observée entre les tumeurs issues des 4T1-CT ou bien des 4T1-R4, indiquant que la présence du récepteur glycosylé n'influence pas la croissance tumorale primaire *in vivo* **(Figure 32A)**. Les cellules tumorales murines 4T1 forment principalement des métastases pulmonaires mais également des micrométastases osseuses. Ainsi, dans le but de déterminer si la production de la protéine ROBO4 glycosylée par les cellules 4T1 est capable de modifier leur tropisme pulmonaire au profit d'un tropisme osseux, les poumons ainsi que la moelle osseuses des souris greffées avec les 4T1-CT ou bien 4T1-R4 ont été collectés deux semaines après la résection et mis en culture en présence de 6-thioguanine. Les clones cellulaires ont ensuite été dénombrés **(Figure 32B)**. Quelles que soient les conditions, aucune cellule tumorale n'est détectée dans la moelle osseuse des souris, tandis qu'aucune différence significative n'est observée sur l'incidence de développement de métastase et sur le nombre de clones cellulaires retrouvés dans le tissu pulmonaire **(Figure 32B).** Collectivement ces données montrent que la forme glycosylée de ROBO4 inhibe la migration et l'invasion des cellules 4T1 *in vitro*. Cependant, elle ne modifie ni la croissance tumorale ni la formation de métastases *in vivo*.

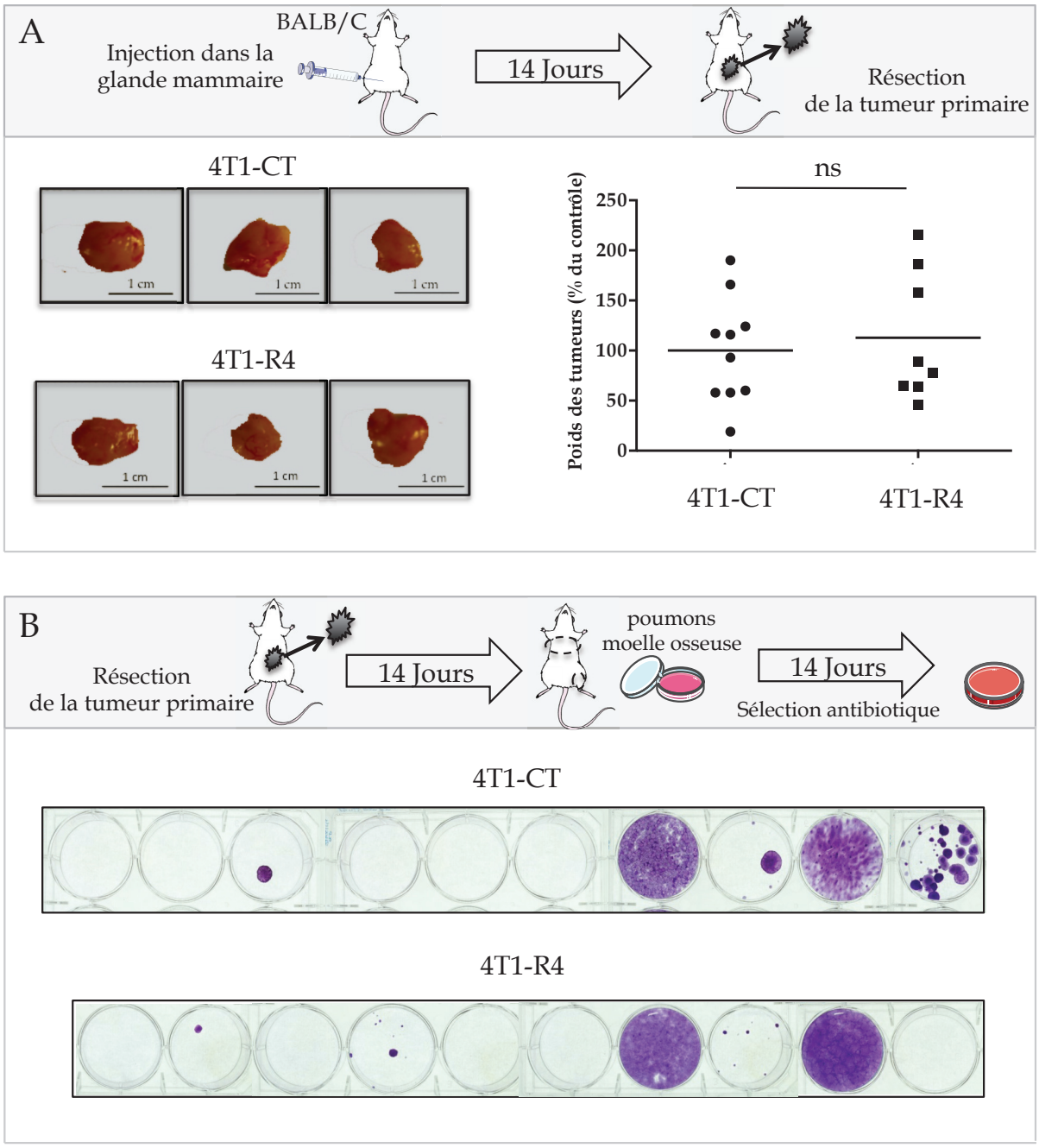
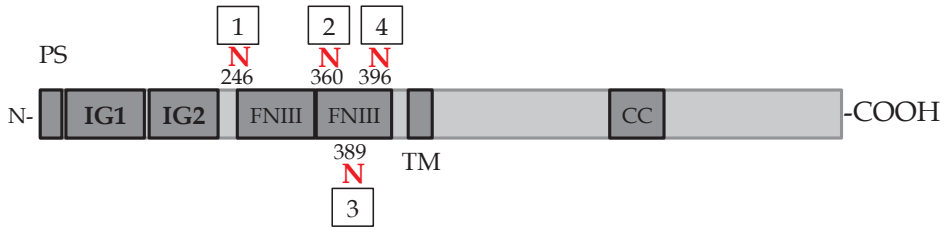


Figure 32. Effet de la forme protéique glycosylée du récepteur ROBO4 sur la croissance orthotopique et sur la formation des métastases pulmonaires et osseuses des cellules tumorales 4T1.

(A). Les cellules 4T1 sur-exprimant ou non le gène *ROBO4* ont été injectées dans la glande mammaire de souris immunocompétentes (n=10). Quatorze jours après l'injection la tumeur primaire a été réséquée puis pesée. **(B).** Deux semaines après la résection de la tumeur primaire, les poumons et la moelle osseuse ont été collectés et mis en culture en présence de 6-thioguanine permettant la croissance sélective des cellules tumorales 4T1. Enfin, les cellules tumorales résitantes ont été fixées et colorées au cristal violet puis dénombrées.

2. STRATEGIE DE MUTAGENESE DIRIGEE POUR OBTENIR LA FORME NON GLYCOSYLEE DU RECEPTEUR ROBO4 DANS LES CELLULES TUMORALES

En considérant l'ensemble des résultats, il semble que le récepteur ROBO4 non glycosylé produit par les cellules tumorales et les CSH semble être la forme qui confère aux cellules cancéreuses leur propriété métastatique **(Figure 26C-E).** Inversement, la forme glycosylée, présente seulement dans les cellules endothéliales, n'aurait pas d'effet voire un effet inhibiteur sur les mécanismes métastatiques tels que la migration et l'invasion **(Figure 29-31).** Dans ce contexte, nous avons utilisé une stratégie de mutagenèse dirigée des sites putatifs de N-glycosylation, afin de générer la protéine ROBO4 non glycosylée dans les cellules tumorales. En effet, le traitement par la tunicamycine a permis de mettre en évidence la glycosylation de cette forme du récepteur ROBO4 ce qui est en accord avec l'analyse bioinformatique de la séquence en acides aminés de la protéine ROBO4 qui révèle 4 sites potentiels de N-glycosylation dans la partie extracellulaire dont les positions sont illustrées dans la **figure 33**.



MGSGGDSLLGGRGSLPLLLLLIMGGMAQDSPPQILVHPQDQLFQGPGPARMSCQASGQPPPTIR
WLLNGQPLSMVPPDPHHLLPDGTLLLLQPPARGHAHDGQALSTDLGVYTCEASNRLGTAVSR
GARLSVAVLREDFQIQPRDMVAVVGEQFTLECGPPWGHPEPTVSWWKDGKPLALQPGRHTVS
GGSLLMARAEKSDEGTYMCVATNSAGHRESRAARVSIQEPQDYTEPVELLAVRIQLE**NVT**LLNP
DPAEGPKPRPAVWLSWKVSGPAAPAQSYTALFRTQTAPGGQGAPWAEELLAGWQSAELGGLH
WGQDYEFKVRPSSGRARGPDSNVLLLRLPEKVPSAPPQEVTLKPG**NGT**VFVSWVPPPAENHNG
IIRGYQVWSLG**NTS**LPPA**NWT**VVGEQTQLEIATHMPGSYCVQVAAVTGAGAGEPSRPVCLLLE
QAMERATQEPSEHGPWTLEQ

Figure 33. Les sites putatifs de N-glycosylation du récepteur ROBO4.

(A). Représentation schématique de la position des sites de glycosylation au sein de la protéine ROBO4. PS : peptide signal, IG : domaine immunoglobuline, FNIII : domaine fibronectine de type III, TM : domaine transmembranaire, CC : région cytosolique conservée et riche en proline, N : asparagine **(B).** Position des séquons N-X-S/T dans la séquence d'acides aminés correspondant à la partie N-terminale du récepteur ROBO4. S : sérine, T : thréonine.

2.1. Construction des outils

Afin de produire dans les cellules tumorales la protéine ROBO4 dépourvue des sites potentiels de glycosylation, chaque asparagine (N) du séquon N-X-S/T identifié dans la séquence codante de la protéine ROBO4 a été mutée individuellement et successivement en alanine (A) par mutagenèse dirigée **(Figure 34)**. Cette modification a été réalisée, par PCR en utilisant des amorces spécifiques comportant les mutations. Le vecteur pLPCX, précédemment utilisé pour les expériences de sur-expression de la forme glycosylée du récepteur ROBO4, a été utilisé comme matrice pour ces expériences **(Figure 27).**

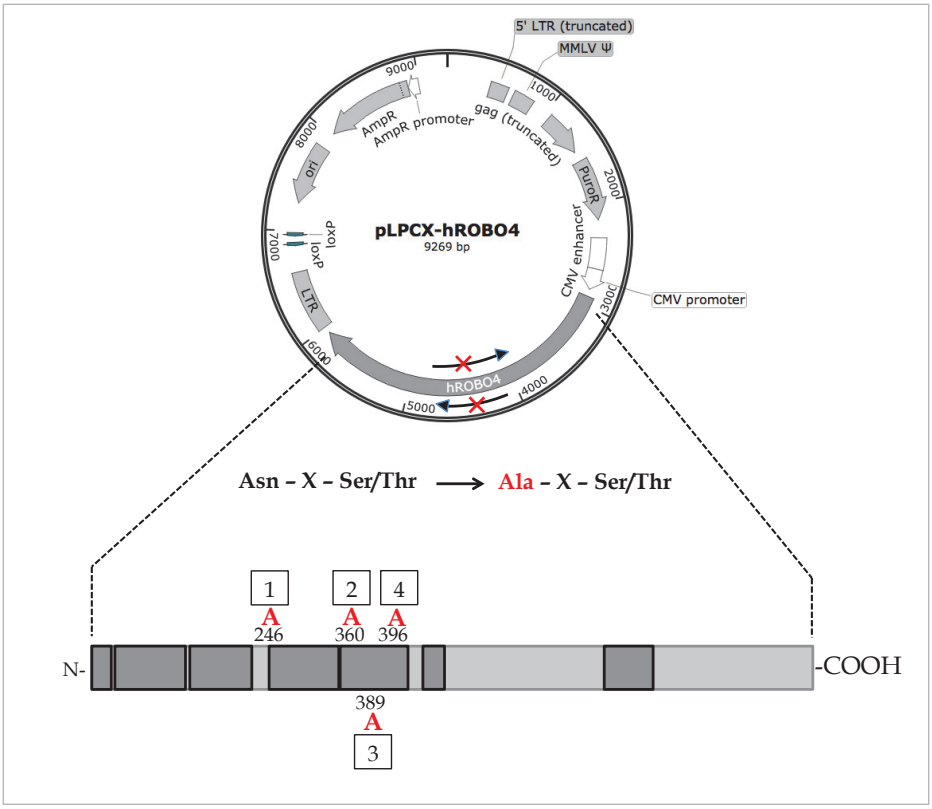


Figure 34. Vecteur d'expression pLPCX-hROBO4 dépourvu des sites de glycosylation.

Le vecteur pLPCX comportant la séquence codante du gène ROBO4 a été successivement amplifié par un couple d'amorce présentant une substitution de l'asparagine de la séquence N-X-S/T en alanine pour chacun des 4 sites de glycosylation.

2.2. La mutagenèse dirigée des sites de glycosylation du récepteur ROBO4 n'aboutit pas à la synthèse d'une forme équivalente à celle détectée dans les cellules MDA-B02

Les cellules cancéreuses HeLa (Henrietta Lacks : cellules cancéreuses humaines du col de l'utérus) ont été transfectées transitoirement par le vecteur pLPCX dont l'ensemble des sites de glycosylation a été muté **(Figure 34)** ou bien par le vecteur pLPCX contenant la séquence codante sauvage du récepteur ROBO4 **(Figure 27)**. Ce type cellulaire est fréquemment utilisé en transfection en raison de sa facilité à accepter l'ADN exogène. Les lysats protéiques des cellules HeLa transfectées avec les différentes constructions ont ensuite été récoltés et la présence de la protéine ROBO4 sauvage et mutée pour les sites de glycosylation a été recherchée à l'aide de l'anticorps Ac1 qui cible la forme non glycosylée et de l'anticorps Ac2 qui détecte la forme glycosylée **(Figure 35)**.

En comparaison avec les cellules contrôle (transfectées avec le vecteur vide), seule la protéine ROBO4 endogène est détectée par l'anticorps Ac1 dans les cellules transfectées par le vecteur codant la version sauvage du récepteur ROBO4 **(Figure 35, piste 1)** alors que l'anticorps Ac2 révèle une forte accumulation de la protéine glycosylée **(Figure 35, piste 1)**. Ces observations sont en adéquation avec les résultats obtenus lorsque les cellules 4T1 et 66C14 sont transduites avec la même construction et où la forme glycosylée est seulement détectée par l'anticorps Ac2 **(Figure 35B)**. Lorsque les cellules sont transfectées par le vecteur pLPCX codant la forme ROBO4 mutée pour les 4 sites de glycosylation, l'accumulation de la protéine ROBO4 mutée (ΔSG) est détectée avec l'anticorps l'Ac2, mais aussi avec l'Ac1 qui ne détecte habituellement pas la forme sauvage glycosylée **(Figure 35, piste 2)**. Cette observation suggère que l'anticorps Ac1 ne peut détecter la protéine ROBO4 que lorsque celle-ci n'est pas glycosylée. La séquence codante de ROBO4 mutée pour les quatre sites de glycosylation aboutit à la synthèse d'une forme de masse moléculaire plus légère que celle de la forme sauvage glycosylée produite avec la séquence sauvage de ROBO4 **(Figure 35, piste 2)**. Cette observation confirme les résultats obtenus lors du traitement par la tunicamycine **(Figure 28)**. Toutefois, cette masse moléculaire apparente de la protéine ROBO4 ΔSG reste supérieure à celle de la forme endogène détectée par l'anticorps Ac1 **(Figure 30, piste 2).** Cette observation indique

que l'inhibition de la glycosylation de la protéine ROBO4 ne permet pas la synthèse de la seule protéine non-glycosylée endogène détectée dans les cellules tumorales.

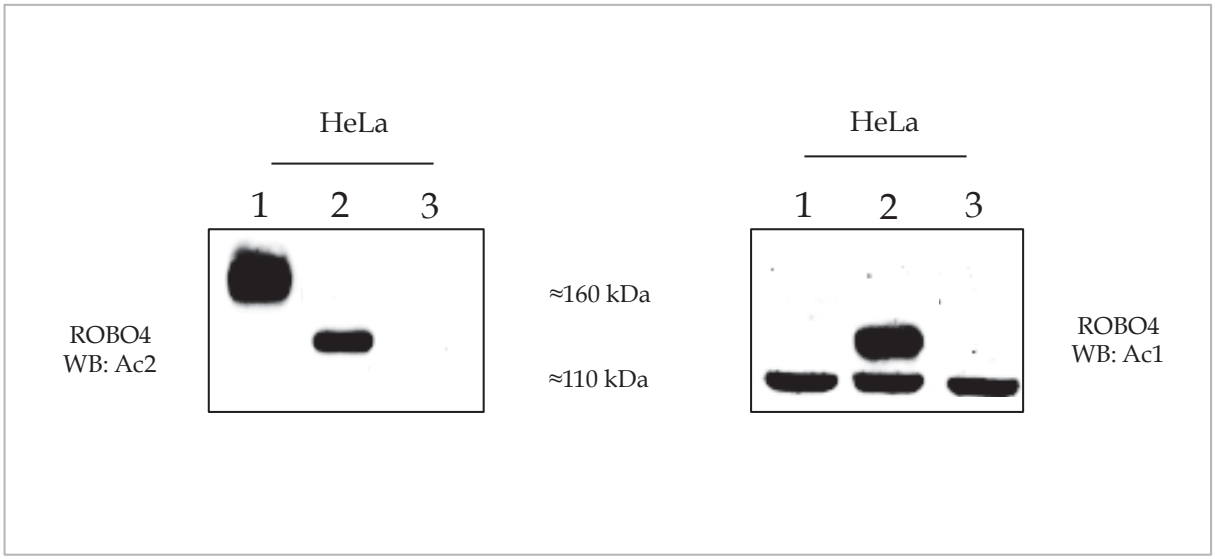


Figure 35. Analyse de la synthèse de la protéine ROBO4 mutée pour ses quatre sites de glycosylation dans les cellules humaines HeLa.

Les cellules HeLa ont été transféctées par 5µg du vecteur pLPCX codant la protéine ROBO4 sauvage **(1)** ou bien mutée pour ses quatre sites de glycosylation (ΔSG) **(2).** Le vecteur pLPCX contrôle **(3)** ainsi que des cellules non transfectées **(4)** ont été utilisés comme contrôle négatif. Les protéines issues de la transfection ont été déposées sur deux gels différents et la présence de la protéine ROBO4 a été recherchée par l'utilisation des anticorps Ac1 détectant la forme non glycosylée du récepteur et l'anticorps Ac2 ciblant la forme glycosylée de la protéine ROBO4.

Des expériences complémentaires réalisées par le Dr. Clément-Demange renforcent les résultats obtenus lors de la mutagenèse dirigée du récepteur ROBO4. En effet, le co-traitement des cellules cancéreuses MDA-MB-231 sur-exprimant la séquence codante sauvage de ROBO4 avec de la tunicamycine et des inhibiteurs du protéasome (MG132 et lactacystine) entraîne l'accumulation d'une forme de masse moléculaire plus légère que la forme glycosylée mais, toujours plus lourde que la forme produite de façon endogène par les cellules cancéreuses **(Figure 36, piste 4)**. Lorsque les cellules tumorales transduites avec la séquence codante sauvage sont traitées uniquement aux inhibiteurs du protéasome, la forme glycosylée de ROBO4 est alors détectée en Western Blot en grande quantité. La forme non-glycosylée ΔSG

est également observée ainsi que la forme endogène caractéristique des cellules tumorales **(Figure 36, piste 2)**. Ce résultat suggère que la protéine ROBO4 ne pourrait pas s'accumuler sous une forme non-glycosylée (ΔSG) lorsqu'on inhibe la machinerie de glycosylation dans les cellules tumorales MDA-MB-231 transduites.

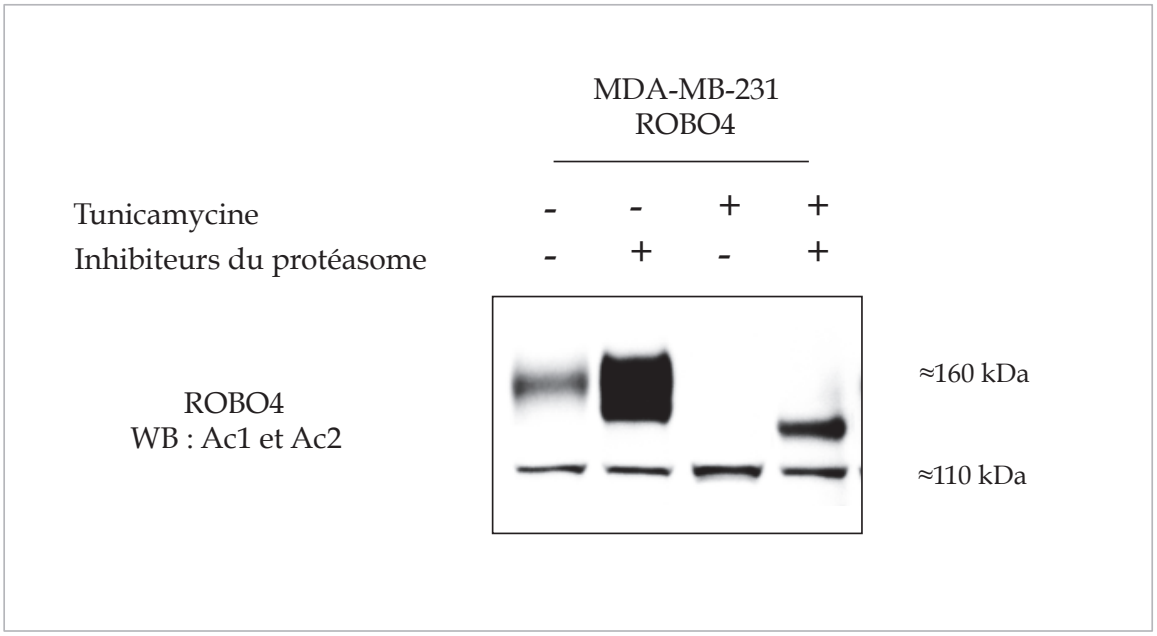


Figure 36. Co-traitement par la tunicamycine et par des inhibiteurs du protéasome des cellules tumorales MDA-MB-231 sur-exprimant ROBO4.

Les cellules MDA-MB-231 sur-exprimant ROBO4 ont été traitées 19h soit par de la tunicamycine (inhibiteur de la N-glycosylation) soit par des inhibiteurs du protéasome, soit par les deux drogues simultanément. La protéine ROBO4 a été détectée à l'aide des anticorps Ac1 et Ac2.

La sur-expression de la séquence codante (NCBI : NM_019055.5) de ROBO4 dans les cellules tumorales et les cellules endothéliales, conduit uniquement à la production d'une forme glycosylée de ROBO4. De plus, la sur-expression par transfection de la séquence codante de ROBO4 mutée sur les sites de glycosylation ne permet pas la synthèse d'une protéine ROBO4 de masse moléculaire identique à celle de l'unique forme présente dans les cellules tumorales. L'ensemble de ces observations nous a conduit à émettre plusieurs hypothèses :

i) : la protéine détectée par l'Ac1 dans les cellules tumorales n'est pas le produit du gène *ROBO4*

ii) : la protéine ROBO4 subit d'autres modifications post-traductionnelles

iii) : La dé-glycosylation par mutagenèse dirigée ou co-traitement avec de la tunicamycine et des inhibiteurs du protéasome conduit à la synthèse et la détection d'une protéine de masse moléculaire de 107 kDa correspondant à la taille attendue en fonction du nombre d'acides aminés prédits. La protéine endogène non glycosylée détectée par l'Ac1 dans les cellules tumorales pourrait donc être un variant protéique de masse moléculaire plus légère et issu d'un transcrit alternatif.

2.3. La protéine endogène détectée par l'anticorps Ac1 dans les cellules tumorales est le produit du gène *ROBO4*

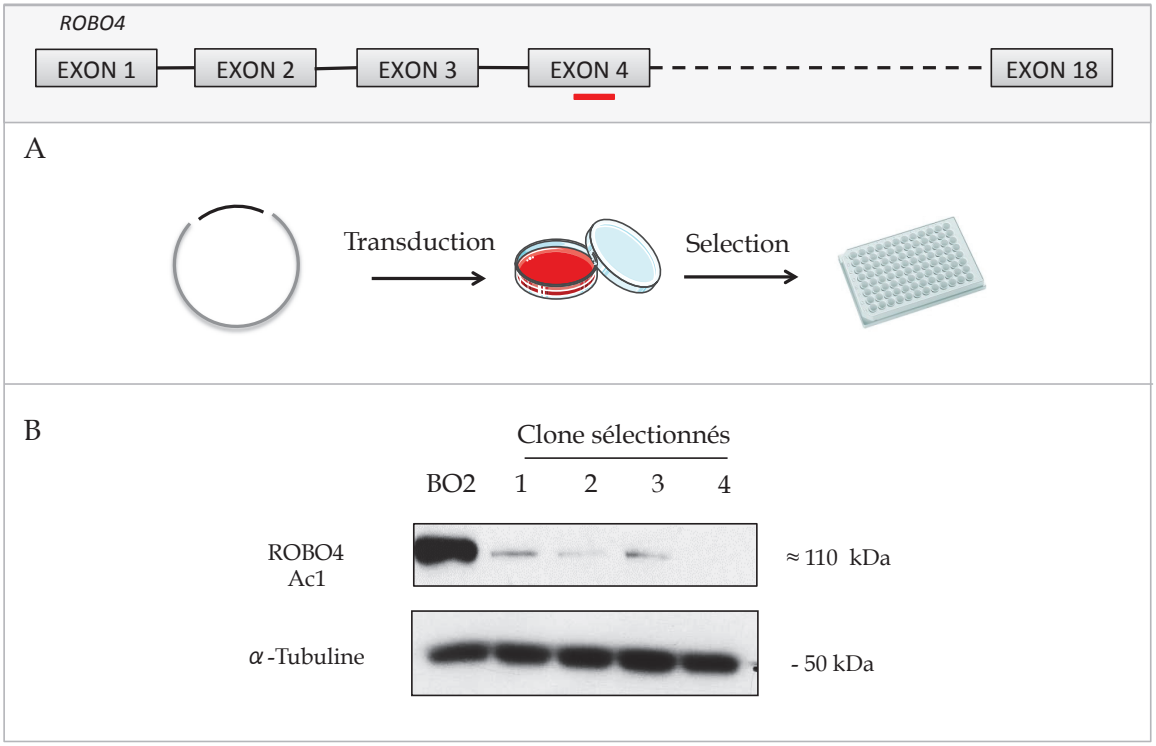


Figure 37. Invalidation génétique du gène ROBO4 par CRISPR/Cas9.

(A). Afin de cibler spécifiquement le gène *ROBO4*, les cellules tumorales MDA-B02 ont été transduites avec un vecteur codant l'enzyme Cas9 couplé à un ARN guide complémentaire d'une région de l'exon 4. Après transduction, des clones cellulaires ont été isolés par dilution limite. **(B)** Pour quatre clones, ainsi que pour la population totale MDA-B02 utilisée comme contrôle, la présence de ROBO4 a été recherchée par Western Blot à l'aide de l'anticorps Ac1.

Afin de déterminer si la protéine endogène détectée avec l'anticorps Ac1 est bien le produit du gène *ROBO4*, nous avons entrepris d'inactiver le gène ROBO4 par la technologie CRISPR/Cas9 (travail de Doctorat de Margaux Bernard). Des cellules MDA-B02 qui expriment fortement la forme endogène non glycosylée ont été transduites par un vecteur lentiviral contenant l'enzyme Cas9 couplée à un ARN guide spécifique de l'intron 4 du gène *ROBO4* **(Figure 37)**. Après une sélection antibiotique, par la puromycine, des clones cellulaires ont été isolés par dilution limite, **(Figure 37A).** Le lysat protéique de quatre clones a été analysé par Western Blot à l'aide de l'anticorps Ac1 **(Figure 37B)**. Une forte accumulation de la protéine endogène dans les cellules tumorales MDA-B02 contrôle est observée **(Figure 37B piste 1)** tandis qu'elle n'est plus détectée lorsque les cellules sont transduites avec la construction CRISPR/Cas9 **(Figure 37B piste 2-5)**. De plus, un séquençage de la région ciblée confirme la présence d'une mutation au niveau de l'exon 4 (données non montrées). Ces résultats nous ont donc permis d'envisager la troisième hypothèse : la protéine détectée par l'Ac1 dans les cellules tumorales est le produit d'une forme alternative du transcrit de ROBO4.

3. IDENTIFICATION DES TRANSCRITS DES CELLULES HUVEC ET MDA-B02

Nous avons émis l'hypothèse que les cellules endothéliales HUVEC, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules tumorales produiraient une forme protéique alternative de ROBO4 qui : i) n'est pas glycosylée **(Figure 28),** ii) n'est pas issue de la séquence codante insérée référencée dans les bases de données NCBI et UniProt et qui a été insérée dans le vecteur pLPCX **(Figure 27, 28 et 34)** et iii) présente une activité qui favorise la croissance tumorale et la formation de métastases osseuses **(Figure 26C-E).** Ainsi, dans le but de déterminer l'origine moléculaire de la forme endogène « agressive » produite par les cellules tumorales, les transcrits des cellules endothéliales HUVEC ainsi que des cellules tumorales MDA-B02 ont été analysés par RACE PCR. Cette technique d'amplification, présentée figure 41, nous a permis d'identifier les extrémités 5' des ARN messagers de ROBO4 produits par ces deux types cellulaires **(Figure 38)**.

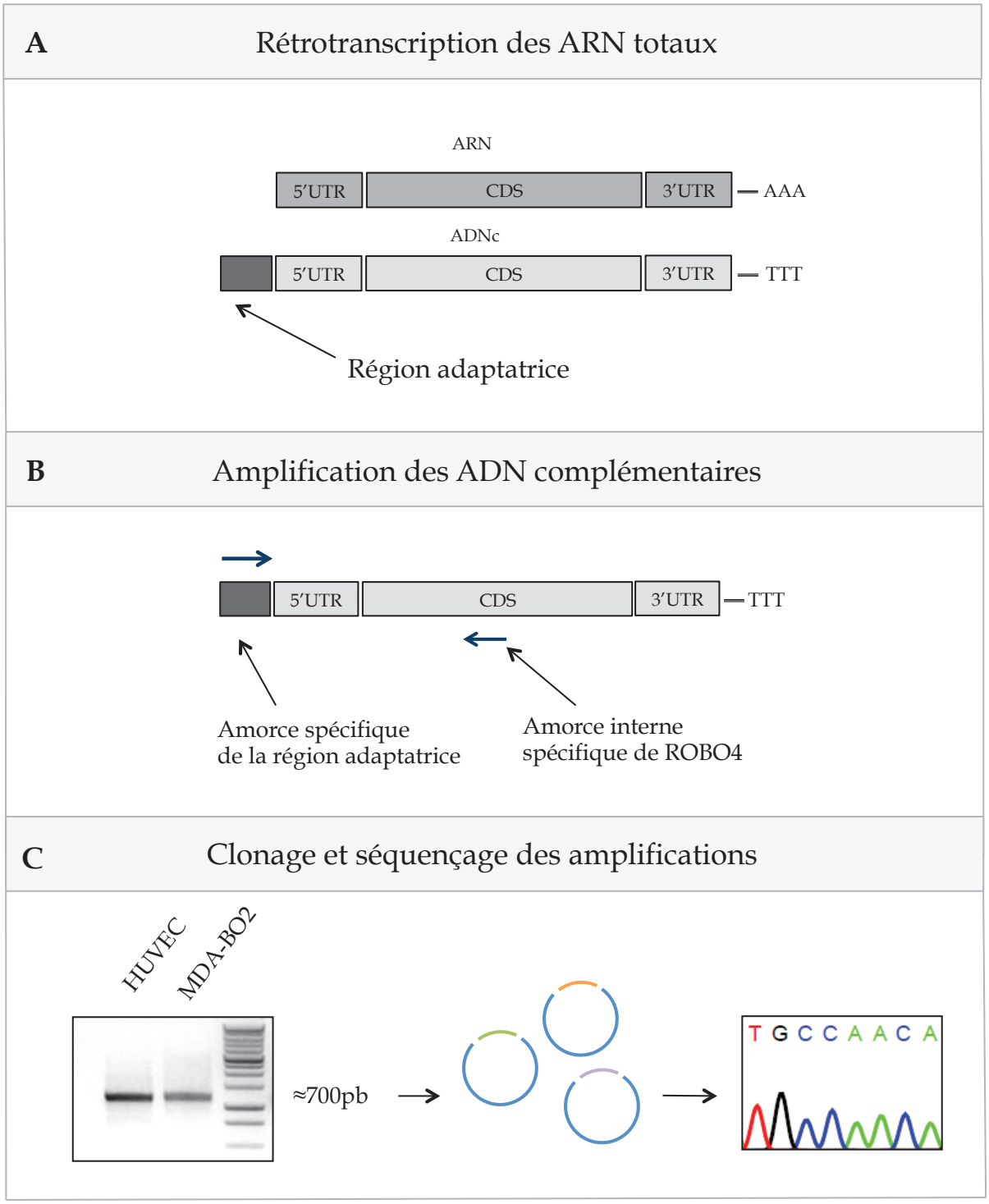


Figure 38. Principe de la 5' RACE PCR.

(A). Les ARN totaux extraits des cellules HUVEC ou des cellules tumorales MDA-B02 ont été convertis en ADN complémentaires à l'aide d'un oligo-dT et d'une transcriptase réverse à activité terminal-transférase permettant l'ajout d'une région adaptatrice à l'extrémité 5' du premier brin d'ADNc. **(B).** Les ADNc ont été amplifiés à l'aide d'une amorce spécifique de la séquence codante de ROBO4, ainsi qu'une amorce ciblant la région adaptatrice. **(C).** Les amplifications comportant les extrémités non connues ont été purifiées, clonées puis séquencées.

3.1. Mise en évidence de transcrits alternatifs du récepteur ROBO4

Afin d'identifier les extrémités 5' des ARN messagers produits par les cellules endothéliales HUVEC ainsi que par les cellules tumorales MDA-B02, l'ensemble des séquences ADN isolées par clonage moléculaire lors de la RACE PCR ont été séquencées puis analysées à l'aide du logiciel SeaView. Cet outil bio-informatique nous a permis de comparer les séquences obtenues avec la séquence d'ADN génomique du gène *ROBO4* ainsi que la séquence des deux transcrits référencés dans les bases de données NCBI (ROBO4 variant 1 ; NM_019055.5 et ROBO4 variant 2 ; NM_001301088.1) **(Figure 39)**.

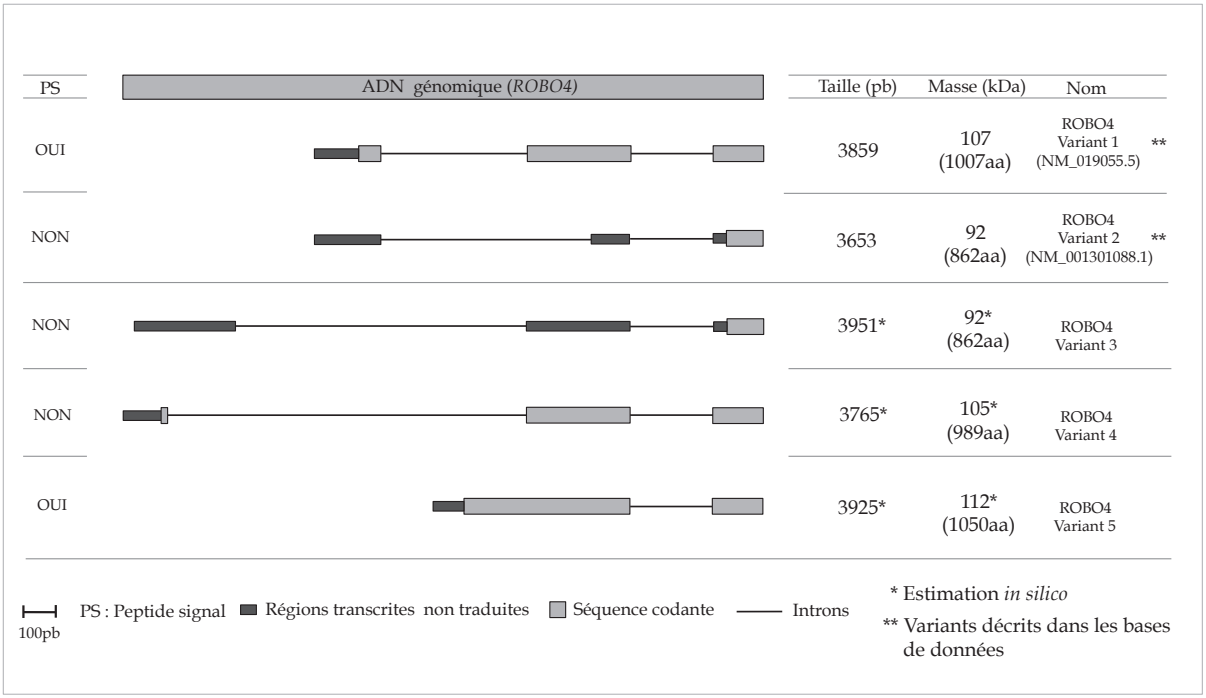


Figure 39. Identification des extrémités 5' des ARN messagers de ROBO4 provenant des cellules endothéliales et des cellules tumorales ostéotropiques MDA-B02.

Les séquences amplifiées par RACE PCR ont été, à l'aide du logiciel d'alignement SeaView, alignées et comparées à la séquence d'ADN génomique ainsi qu'à la séquence des transcrits de ROBO4 décrits dans NCBI. Le cadre ouvert de lecture de chacun des transcrits a été déterminé *in silico* par l'utilisation de l'outil « ORF Finder » du site NCBI et la masse moléculaire a été estimée en fonction du nombre d'acides aminés. La présence ou non d'un peptide signal à été évaluée à l'aide de l'outil SignalP 4.1.

Lors de nos analyses, le transcrit correspondant au variant 1 et aboutissant à la synthèse de la forme glycosylée du récepteur a été le transcrit majoritairement retrouvé dans les HUVEC et les MDA-B02 tandis que le transcrit correspondant au variant 2 n'a jamais été détecté. Bien que ce transcrit alternatif de ROBO4 soit décrit dans les bases de données il n'a fait jusqu'à présent l'objet d'aucune étude scientifique publiée. Ce variant 2 de ROBO4 est issu d'un épissage alternatif de l'exon 1 et sa traduction donne lieu, *in silico*, à la synthèse d'une protéine de 92kDa, dépourvue de peptide signal et du premier domaine immunoglobuline **(Figure 40A-B)**



Figure 40. Identification des parties N-terminales des différents variants protéiques de ROBO4 (A). Représentation des séquences en acides aminés de la région N-terminale des protéines produites, *in silico*, par la séquence codante des transcrits alternatifs de ROBO4 identifiés par RACE PCR. Les acides aminés soulignés correspondent au peptide signal et les caractères bleus représentent les acides aminés partagés par l'ensemble des séquences protéiques. **(B).** La présence des domaines immunoglobuline et fibronectine de type III a été recherchée pour chacun des variants protéiques par l'utilisation de la base de donnée Prosite.

L'alignement des séquences nous a permis de mettre en évidence trois autres transcrits moins représentés et épissés alternativement en 5' : les variants 3 et 4 identifiés dans les cellules tumorales MDA-B02 et le variant 5 identifié dans les cellules endothéliales HUVEC. De manière intéressante, les sites d'initiation de la transcription des variants 3 et 4 se trouvent en amont de ceux des variants 1 et 2 suggérant l'activation d'un promoteur alternatif permettant la synthèse de ces deux transcrits **(Figure 39)**. Bien que la composition en nucléotides du 5'UTR du variant 3 soit différente, son analyse bioinformatique prédit la synthèse d'une isoforme similaire à celle que produirait la traduction du variant 2 **(Figure 39)**. Le variant 4 quant à lui, permettrait la synthèse d'une forme de ROBO4 de 105kDa sans peptide signal et quasiment équivalente à la séquence en acides aminés du variant 1 si il était dépourvu de peptide signal **(Figure 39, 40B)**. Enfin, la transcription du variant 5 débute dans l'intron 1 du gène *ROBO4* et produirait une forme protéique de 112kDa présentant un peptide signal alternatif **(Figure 39, 40A)**. L'analyse de trois des cinq transcrits caractérisés (variant 2, variant 3 et variant 4) montre que leur traduction aboutit à la synthèse de protéines dépourvues de peptide signal. Le produit de leur traduction ne pourrait donc pas être transloqué dans le réticulum endoplasmique et ne serait alors pas glycosylé.

3.2. Les transcrits alternatifs de ROBO4 sont produits par les cellules endothéliales HUVEC et les cellules ostéotropique MDA-B02

Les expériences de RACE PCR nous ont permis d'identifier la présence de transcrits de ROBO4 présentant un épissage alternatif en 5'. Les variants 3 et 4 ont été détectés dans les cellules tumorales MDA-B02 alors que le variant 5 a été retrouvé dans les cellules endothéliales HUVEC. Nous avons ensuite cherché à déterminer si les variants 3, 4 et 5 sont effectivement produits par les deux types cellulaires, les cellules MDA-MB-231, MDA-B02 ainsi que les cellules endothéliales HUVEC. Les ARN totaux de ces deux types cellulaires ont été extraits et convertis en ADNc. La présence des transcrits alternatifs identifiés lors des expériences de RACE PCR ainsi que ceux décrits dans les bases de données NCBI (variant 1 et 2) a ensuite été recherchée par PCR quantitative à l'aide d'amorces permettant de distinguer spécifiquement et individuellement l'ensemble des variants d'épissage **(Figure 41)**.

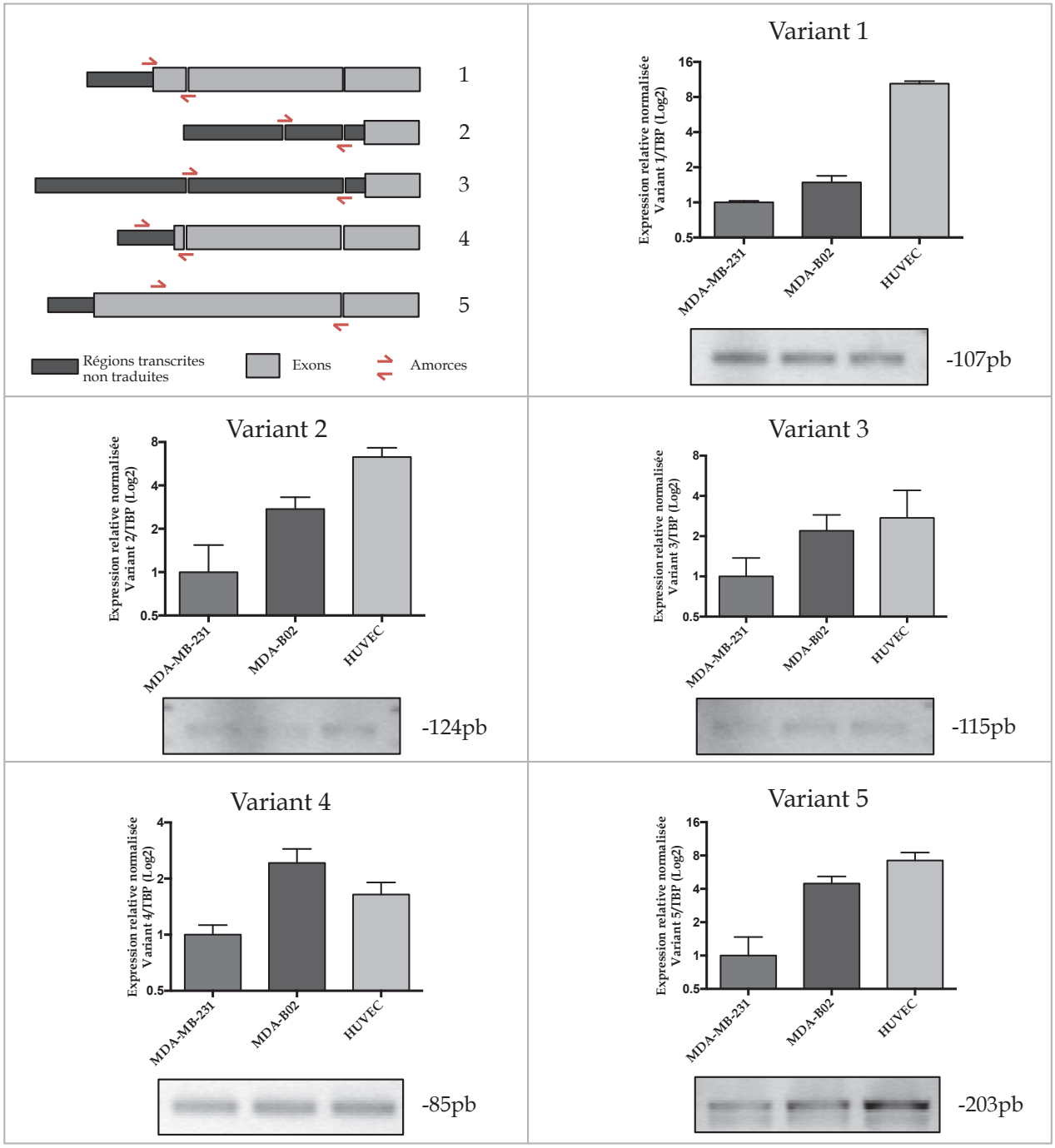


Figure 41. Détection des transcrits alternatifs de ROBO4 par RT-qPCR.

La présence des transcrits alternatifs de ROBO4 a été déterminée par RT-PCR quantitative dans les cellules tumorales MDA-MB-231 et MDA-B02 ainsi que dans les cellules endothéliales HUVEC à l'aide d'amorces spécifiques. Les produits d'amplification ont été déposés sur gel d'agarose et la quantité relative normalisée des variants d'épissage est représentée par un histogramme logarithmique (log2).

Dans leur globalité, ces résultats montrent en premier lieu que l'utilisation d'un couple d'amorces spécifiques de chacun des transcrits permet une amplification à une taille équivalente à celle estimée *in silico* après maturation des ARN messagers. Cette observation indique que les transcrits alternatifs identifiés par RACE PCR sont produits par les cellules tumorales MDA-MB-231 et MDA-B02 ainsi que par les cellules endothéliales HUVEC. Quantitativement, les variants d'épissage 2 et 3 sont plus faiblement détectés dans l'ensemble des lignées cellulaires en comparaison aux variants 4 et 5 ainsi qu'au variant 1 utilisé comme contrôle positif. Cependant, l'efficacité des amorces utilisées n'est pas optimale et n'est pas équivalente pour chaque couple d'amorces. Cette expérience ne permet donc pas de quantifier exactement les proportions des différents transcrits et nous indiquent seulement que tous les transcrits sont bien produits dans les deux types cellulaires. Individuellement, le profil de distribution des transcrits alternatifs, excepté celui du variant 4, est à peu près similaire à celui du variant 1, soit une plus forte accumulation dans les cellules endothéliales HUVEC et ostéotropiques MDA-B02 en comparaison aux cellules tumorales MDA-MB-231.

3.3. La protéine ROBO4 endogène détectée dans les cellules tumorales est une forme plus légère et non glycosylée

Les expériences précédentes nous ont permis de démontrer l'existence de plusieurs transcrits alternatifs du récepteur ROBO4 dont le variant 2 du récepteur décrit dans les bases de données. Les observations réalisées lors des expériences de mutagenèse dirigée et de traitement par la tunicamycine nous ont permis d'émettre l'hypothèse que la forme unique produite de façon endogène par les cellules tumorales, coexistant dans les cellules endothéliales avec la forme glycosylée, serait une forme plus légère que 107kDa et non glycosylée. Deux des transcrits alternatifs analysés, le variant 2 et le variant 3, sont susceptibles de coder pour des produits ne pouvant pas être modifiés par N-glycosylation. En effet, bien qu'*in silico* les sites de glycosylation soient toujours présents, ces formes protéiques ne possèdent pas de peptide signal et ne pourraient théoriquement pas transiter par le réticulum endoplasmique. De plus, la masse moléculaire estimée de 92kDa du produit du

variant 2 et du variant 3 pourrait expliquer la différence de masse observée lors de nos précédentes expériences. Ainsi, afin d'analyser la forme protéique produite par les variants 2 et 3, mais également celle produite par les variants 4 et 5, les différentes séquences codantes ont été insérées dans le vecteur pLPCX par clonage moléculaire pour transfection dans des cellules cancéreuses HEK-293 **(Figure 42)**.

Les lysats protéiques ont été extraits et la présence de ROBO4 a été détectée par Western Blot à l'aide de l'anticorps Ac1, qui détecte seulement la forme endogène non-glycosylée et l'anticorps Ac2 qui détecte la forme glycosylée. Lorsque les cellules HEK-293 sont transfectées avec le vecteur pLPCX contenant la séquence codante du variant 4, une accumulation de la protéine à une masse supérieure à celle de la forme endogène est détectée **(Figure 42A, piste 3)**. Ces observations suggèrent que la protéine issue du variant 4 est détectée à une masse moléculaire attendue de 105kDa et ne subirait pas de glycosylation, ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle la protéine endogène serait une forme alternative de ROBO4 plus légère**.** Cependant**,** lorsque les cellules HEK-293 sont transfectées avec le vecteur pLPCX contenant la séquence codante du variant 5, aucune accumulation protéique n'est détectée avec l'anticorps Ac1 tandis qu'une accumulation de la protéine est détectée aux environs de 160kDa avec l'anticorps Ac2 **(Figure 42B, piste 3)**. Cette observation indique que cette isoforme, qui présente un peptide signal alternatif, est probablement glycosylée. Toutefois, cette forme alternative de ROBO4 semble plus lourde que la protéine glycosylée détectée dans les cellules endothéliales HUVEC **(Figure 42B, piste 1)**. Enfin, lorsque les lysats des cellules HEK-293 transfectées avec le vecteur pLPCX contenant la séquence codante du variant 2 et 3 sont analysés, une accumulation protéique est détectée avec l'anticorps Ac1 à une masse moléculaire identique à celle de la forme endogène produite par les cellules MDA-B02 **(Figure 42C, piste 4)**. Cette observation confirme nos résultats précédents et indique que la protéine endogène détectée avec l'Ac1 dans les cellules tumorales MDA-B02 et les cellules endothéliales HUVEC est une isoforme protéique d'environ 92kDa **(Figure 42C)**.

Afin de déterminer si, malgré l'absence d'un peptide signal, l'isoforme de 92kDa synthétique que nous produisons est bien membranaire, des cellules HEK-293 ont été transfectées soit avec la construction contenant la séquence native de l'isoforme à 92kDa, soit fusionné en N-terminal avec l'étiquette c-Myc. Les protéines ont ensuite

été extraites à l'aide d'un tampon d'extraction permettant d'obtenir spécifiquement les protéines associées aux membranes. Parmi elles, l'isoforme de 92kDa a été recherchée par l'utilisation de l'anticorps anti-ROBO4 Ac1 ou bien d'un anticorps anti-myc **(Figure 42D)**. Quelle que soit la construction utilisée, une accumulation de la protéine ROBO4 à 92kDa est détectée dans les lysats membranaires **(Figure 42D, piste 2)** suggérant que l'isoforme sans peptide signal de ROBO4 est bien associée à la membrane plasmique.

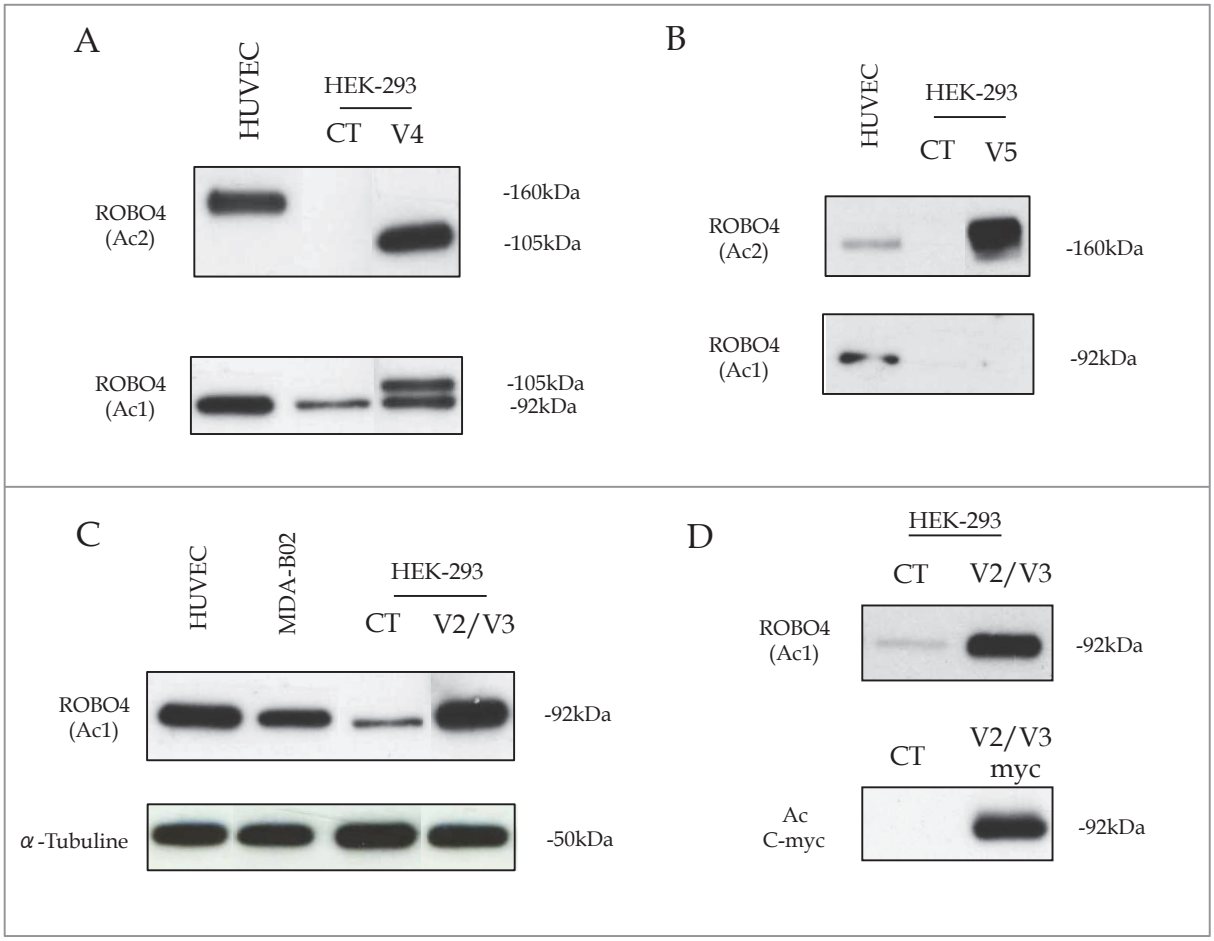


Figure 42. Formes protéiques produites par les transcrits alternatifs de ROBO4.

Les cellules HEK-293 ont été transfectées avec le vecteur pLPCX vide (CT) ou contenant la séquence codante du variant 5 **(A),** du variant 4 **(B)** ou du variant 3 **(C)**. La protéine ROBO4 a été détectée par Western Blot à l'aide des anticorps Ac1 qui cible la forme non glycosylée et Ac2 qui cible la forme glycosylée. Les cellules HUVEC et MDA-B02 ont été utilisées comme contrôle positif. **(D).** Les cellules HEK-293 ont été transfectées avec un vecteur contenant la séquence du variant 3 native ou bien fusionnée en N-terminal avec l'étiquette C-Myc. Les protéines associées aux membranes ont été isolées et la présence de ROBO4 a été recherchée à l'aide des anticorps Ac1 et anti-Cmyc.

IV. Discussion et perspectives

Les protéines SLIT et ROBO ont été initialement décrites comme des facteurs cruciaux de la migration axonale et vasculaire lors du développement [256], [171]. Depuis leur découverte, d'autres rôles leur ont été attribués notamment dans la prolifération cellulaire, la migration et l'angiogenèse [256], [187] mécanismes souvent dérégulés lors de la progression tumorale. Le récepteur ROBO4 qui a été identifié plus tardivement présente des différences structurales et fonctionnelles avec les autres membres de sa famille ROBO1 à ROBO3 [170]. Ce récepteur a été décrit comme un régulateur de l'angiogenèse jouant selon les différentes études, un rôle positif ou négatif [228], [186]. De plus, il coopère avec le récepteur CXCR4 afin de permettre l'ancrage des cellules souches hématopoïétiques dans l'os [32]. Enfin, un rôle inhibiteur de l'angiogenèse tumorale du récepteur ROBO4 produit par les cellules endothéliales vient d'être récemment décrit [252]. Par contre, dans la biologie des DTCs, le rôle de ROBO4 produit par les cellules tumorales n'a encore jamais été décrit.

L'analyse transcriptomique des cellules ostéotropiques MDA-B02 nous avait permis de montrer la sur-expression des composants de la voie SLIT/ROBO, et en particulier de ROBO4 en comparaison avec les cellules de la lignée MDA-MB-231. Ces observations nous ont conduits à étudier le rôle du récepteur ROBO4 dans la dissémination métastatique osseuse des cellules de cancer du sein avec l'hypothèse qu'il pourrait, comme pour les cellules hématopoïétiques, favoriser l'ancrage des cellules tumorales dans l'os.

Les précédents travaux réalisés au laboratoire avec les cellules ostéotropiques MDA-B02 ont permis de démontrer à la fois *in vitro* et *in vivo* l'implication du récepteur ROBO4 dans les étapes précoces de la colonisation osseuse. En effet, l'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement contre le récepteur ROBO4 conduit à une forte réduction de l'ancrage des cellules tumorales et de la formation des métastases osseuses. Ces données ont permis de démontrer que ROBO4 est une cible thérapeutique potentielle (Thèse de Bénédicte Eckel et Lise Clément-demange). Toutefois, les cellules du modèle ostéotropique MDA-B02 ne métastasent pas spontanément à partir d'une tumeur primaire et ne permettent donc pas l'étude du

rôle de ROBO4 dans l'invasion et le tropisme osseux des cellules tumorales dans des conditions physiopathologiques proches des conditions cliniques. C'est pourquoi, nous avons sur-exprimé le gène *ROBO4* dans un modèle cellulaire syngénique, les cellules de la lignée 4T1 qui produisent faiblement le récepteur ROBO4. Ces cellules issues d'une tumeur spontanée présentent l'avantage, lorsqu'elles sont injectées dans la glande mammaire de souris femelle Balb/c, de croître et de former spontanément des métastases majoritairement pulmonaires mais également osseuses [257]. De plus, elles présentent des caractéristiques comportementales similaires à celles des cellules de cancer du sein humain invasives, ce qui en fait un modèle d'étude pertinent mimant un cas pathologique clinique [258].

Lors de nos expériences de sur-expression, nous avons choisi d'isoler et de cloner la séquence codante du récepteur ROBO4 décrite dans les bases de données NCBI sous la référence NM_019055.5. Cette séquence codante permet la synthèse *in silico* d'une protéine de masse moléculaire théorique de 107kDa ce qui est en accord avec les données de la base UniProt (Référence Q8WZ75). Nos résultats montrent que la sur-expression de la séquence codante de ROBO4 dans les cellules murines 4T1 ainsi que dans l'ensemble des lignées de carcinomes mammaires humains dont nous disposons aboutit à la synthèse d'une forme de masse moléculaire élevée d'environ 160kDa (Thèse Lise Clément-Demange). De manière intéressante, dans la littérature scientifique, ROBO4 est également détecté à une masse moléculaire apparente de 160kDa dans les cellules endothéliales HUVEC sur-exprimant ou non le gène ROBO4 [229], [232] mais également dans les cellules endothéliales trophoblastiques du placenta [227] et rétiniennes [259] indiquant qu'il n'est pas inhabituel de détecter le récepteur ROBO4 à cette masse moléculaire. Nous avons alors rapidement émis l'hypothèse que cette forme de 160kDa résultait de modifications post-traductionnelles. Les données bio-informatiques disponibles décrivent un nombre variable de sites putatifs de N-Glycosylation (N-X-S/T) au sein du domaine extracellulaire des récepteurs ROBO. Quatre sites sont ainsi dénombrés pour le récepteur ROBO4 [170]. Une étude récente d'analyse des protéines membranaires et secrétées des cellules endothéliales après traitement à la PMA (phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate) mentionne la présence de la protéine ROBO4 parmi les 86

protéines glycosylées identifiées [214]. Toutefois, à ce jour, aucune publication n'a associé la description d'une forme glycosylée de la protéine à une différence entre la masse moléculaire estimée à partir de la longueur de la séquence codante et la masse moléculaire apparente observée en SDS-PAGE. De même, aucune étude ne décrit une fonction de ROBO4 associée spécifiquement à son niveau de glycosylation. Dans un grand nombre d'études la masse moléculaire du récepteur n'est jamais précisée [187], [189], [231] et la forme de la protéine ROBO4 étudiée est régulièrement étiquetée [228], [229] il est donc parfois complexe de déterminer avec précision qu'elle est la masse moléculaire du récepteur ROBO4 décrite dans ces études.

Nous avons démontré que la différence de masse moléculaire observée entre la forme endogène que nous détectons dans les cellules tumorales MDA-B02 et celle que nous sur-exprimons était la conséquence d'une glycosylation du récepteur. En effet, le traitement par la tunicamycine (un inhibiteur des premières étapes de la N-glycosylation) ou bien la substitution des asparagines des sites consensus de glycosylation par mutagenèse dirigée empêchent la synthèse de cette forme de masse moléculaire élevée. Néanmoins, malgré les stratégies employées pour inhiber la N-glycosylation, nous ne sommes pas parvenus à produire une forme non-glycosylée stable dont la masse moléculaire apparente est équivalente à celle de l'unique forme détectée dans les cellules tumorales ostéotropiques MDA-B02.

Notre hypothèse est donc que la sur-expression de la totalité de la région codante produisant la forme glycosylée du récepteur ne permet pas la formation de la protéine non glycosylée stable dans les cellules tumorales. En effet, nous n'avons été en mesure de détecter cette forme qu'artificiellement lors de l'inhibition de la glycosylation en présence d'un inhibiteur du protéasome. L'ensemble de ces résultats nous a donc permis de démontrer que la séquence utilisée pour les expériences de sur-expression (NM_019055.5) permettait uniquement la synthèse d'une protéine glycosylée.

Pour l'ensemble de nos expériences, l'anticorps majoritairement utilisé est celui produit par la société Abcam (Ab103674 ; Ac1). La fiche technique de cet anticorps indique que son utilisation permet la détection de la protéine ROBO4 à une masse moléculaire de 107kDa ce qui correspondrait à la taille en acides aminés de la

protéine ROBO4 (NM_019055.5) lorsque celle-ci ne subit pas de glycosylation. Deux analyses de la protéine, dont une récente utilisant ce même anticorps, ont détecté la protéine ROBO4 à une masse moléculaire de 107kDa dans les cellules endothéliales HDMEC et BMVEC [170], [230] ainsi que dans les cellules tumorales MCF7 [170]. Ces données, étant en accord avec nos résultats, nous avons alors émis l'hypothèse que la forme détectée dans les cellules tumorales MDA-B02 et ciblée par l'anticorps Ac1 (Ab103674) lors de nos expériences *in vitro* et *in vivo* correspondait à la forme non-glycosylée de la protéine ROBO4 estimée à 107kDa (NCBI : NM_019055.5). Cependant, nos résultats de mutagenèse dirigée et de traitement à la tunicamycine couplé à des inhibiteurs du protéasome montrent que la forme produite après l'inhibition de la glycosylation est toujours plus lourde que la forme que l'on détecte dans les cellules MDA-B02.

Enfin, nous nous sommes assurés que la protéine détectée par l'anticorps Ac1 était bien le produit du gène *ROBO4* en induisant une mutation génomique à l'aide de la technologie CRISPR Cas9. La perte du signal en Western Blot nous a permis de confirmer la spécificité de l'anticorps Ac1 (Ab103674) pour le récepteur ROBO4. Ces expériences nous ont permis de conclure que la forme endogène détectée dans les cellules tumorales est un variant protéique de ROBO4 plus léger que 107kDa.

Aucun variant protéique du récepteur ROBO4 n'a fait l'objet d'étude publiée à ce jour, contrairement aux récepteurs ROBO1 [206], ROBO2 [207] et ROBO3 [208] pour lesquels un variant d'épissage en 5' à été décrit et caractérisé. Nos expériences de RACE PCR ont mis en évidence plusieurs transcrits alternatifs dont la séquence codante est susceptible de produire des isoformes protéiques modifiées dans leur région N-terminale. Ces formes sont dépourvues de peptide signal ou bien présentent un peptide signal alternatif. Le produit du variant 5 qui possède un peptide signal alternatif génère une isoforme protéique dont la masse théorique est de 112kDa. Toutefois, cette isoforme est détectée expérimentalement à une masse moléculaire plus importante indiquant que le peptide signal alternatif permet sa glycosylation. L'ensemble des autres transcrits alternatifs identifiés produisent des variants protéiques dépourvus de peptide signal. Le peptide signal est une séquence hydrophobe qui ciblée par la protéine SRP (signal recognition particule) permet l'adressage au réticulum endoplasmique des protéines en cours de synthèse [213]. Il

en résulte que les protéines dépourvues de peptide signal ne sont théoriquement pas glycosylées [260]. C'est le cas, par exemple, lorsque la néphrine (un récepteur d'adhésion cellulaire) qui est habituellement glycosylée [261] est produite artificiellement sans peptide signal [262]. Il a de plus été montré que le gène codant le récepteur de la PTH/PTHrP pouvait produire un variant protéique dépourvu de peptide signal qui n'est pas glycosylé [263]. Parmi les variants de ROBO4 dépourvus de peptide signal, le produit du variant 4 est estimé à une masse moléculaire de 105kDa. Bien que ce variant génère une protéine plus lourde que la forme endogène des MDA-B02, il produit une forme proche du produit du variant 1 si celui-ci existait sous une forme non glycosylée de masse moléculaire de 107kDa. Les séquences codantes des variants 2 et 3 dépourvues de peptide signal, dont le produit est estimé à une masse moléculaire de 92kDa, génèrent une forme protéique dont la masse moléculaire apparente est similaire à celle de la protéine endogène détectée dans les cellules tumorales. Ces deux observations nous ont permis de démontrer que la protéine ROBO4 endogène présente dans la lignée MDA-B02 est une isoforme protéique de masse moléculaire d'environ 92kDa et par conséquence plus légère que la protéine ROBO4 référencée dans la littérature scientifique.

Les caractérisations protéiques et fonctionnelles à l'aide de l'anticorps Ac1 (Ab103674) de la forme produite de manière endogène par les cellules tumorales indiquent que cette isoforme protéique est associée aux membranes et n'est pas présente dans la fraction cytosolique. De manière similaire à la protéine endogène, l'isoforme de 92kDa, que nous produisons à partir des constructions V2/V3, est détectée dans la fraction membranaire lors de nos expériences de fractionnement cellulaire.

Cependant, les protéines ne possédant pas de peptide signal sont généralement cytosoliques si elles ne présentent pas de signaux supplémentaires. Ceci suppose que l'isoforme de 92kDa sans peptide signal, si elle est membranaire, emprunte une voie alternative indépendante du réticulum endoplasmique pour être acheminée à la membrane plasmique. Certains mécanismes singuliers d'adressage de protéine à la membrane plasmique ont été décrits [264]. De plus, il a été récemment montré que des protéines de liaison à l'ARN sont capables de se fixer sur des régions consensus présentes dans la région 3' transcrite non traduite des transcrits pour

réguler la localisation des protéines codées. En effet, la protéine de liaison à l'ARN HuR permet le recrutement et la fixation de protéines comme RAC1 et SET sur une protéine naissante ce qui permet son acheminement à la membrane plasmique [265]. Ce mécanisme a été décrit pour les récepteurs CD44, CD47 et l'intégrine α1 et pourrait de manière similaire assurer l'adressage d'un variant de ROBO4 de 92kDa à la membrane. L'efficacité de l'Ac1 à inhiber l'invasion des cellules MDA-B02 et/ou leur adhérence aux ostéoblastes confirme la localisation membranaire de la protéine ROBO4 endogène de 92kDa. Toutefois, il serait nécessaire de confirmer la présence de la forme sans peptide signal à la surface des cellules par cytométrie de flux. Nous ne disposons pas d'anticorps dirigés contre ROBO4 permettant une détection satisfaisante en FACS. Nous collaborons actuellement avec l'équipe du Dr. ROBERT pour la synthèse d'anticorps monoclonaux humanisés ciblant un épitope similaire à celui de l'anticorps Ac1 qui reconnaît la protéine endogène.

L'anticorps fourni par la société Abcam (Ac1) ne détecte que la forme non-glycosylée endogène, les produits des variants 2 et 3 ainsi que le produit du variant 1 quand celui-ci est déglycosylé par mutagenèse dirigée. L'anticorps commercialisé par la société R&D (Ac2) dont l'épitope ne nous a pas été communiqué malgré notre demande réitérée, ne détecte que la forme glycosylée du récepteur présente en grande quantité dans les cellules endothéliales ou produite par sur-expression dans les cellules tumorales. Ceci peut être expliqué par le fait que l'anticorps R&D possède peu d'affinité pour la protéine endogène de 92 kDa.

Nous n'avons détecté la forme glycosylée du récepteur ROBO4 que dans les cellules endothéliales HUVEC et HPMEC, alors que nous ne l'avons jamais détectée dans les cellules tumorales ou les autres types de cellules testées au laboratoire comme les cellules mammaires non transformées MCF10A. Il est alors possible que la forme de ROBO4 décrite dans la littérature pour être spécifique des cellules endothéliales soit cette forme glycosylée que nous détectons en grande quantité dans les cellules endothéliales. L'isoforme de 92kDa est détectée à la fois dans les cellules endothéliales ainsi que dans l'ensemble des cellules tumorales étudiées. Nos expériences ne nous permettent cependant pas de conclure sur l'absence de la forme glycosylée dans les cellules tumorales. En effet, le transcrit de ROBO4 permettant la

synthèse de la forme glycosylée est également présent dans les cellules tumorales et semble majoritaire en RACE PCR et en PCR quantitative comparé aux transcrits alternatifs que nous avons caractérisés. Il est possible que la protéine glycosylée de ROBO4 soit bien produite par les cellules tumorales mais en quantité très faible par rapport à celle détectée dans les cellules endothéliales et qu'elle ne soit pas détectée par l'anticorps Ac2 (RetD).

La transformation cellulaire est généralement accompagnée de changements dans la glycosylation des protéines et cette modification peut altérer la conformation et la stabilité des protéines [266]. Un profil de glycosylation aberrant conduisant à la dégradation de la protéine ROBO4 est envisageable, comme indiqué par nos expériences d'inhibition de la glycosylation en présence d'inhibiteur du protéasome. Enfin, nous ne pouvons pas exclure que la synthèse de l'isoforme glycosylée soit régulée par la stabilité du messager. En effet, la présence et la variabilité des régions non traduites sont décrites pour être impliquées dans la régulation des ARN messagers et pourrait différer d'un type cellulaire à l'autre [267]. Ceci pourrait limiter la synthèse de la forme glycosylée au profit de l'unique forme non glycosylée que nous détectons dans les cellules tumorales. En accord avec cette dernière hypothèse, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent que le clonage, dans un vecteur d'expression, de la séquence codante de ROBO4 additionnée de son 5'UTR ne permet plus la synthèse de la forme glycosylée dans les cellules tumorales.

Les transcrits que nous avons identifiés et dont la séquence codante produit une forme de masse moléculaire de 92kDa sont peu représentés en PCR quantitative en comparaison du transcrit permettant la synthèse de la forme glycosylée. Cependant deux des transcrits que nous avons détectés sont susceptibles de coder une même isoforme de la protéine. Ainsi, la production de cette isoforme particulière dans les cellules tumorales pourrait résulter de la traduction de multiples transcrits. Il serait alors intéressant de déterminer avec plus de précision par séquençage ARN si il existe d'autre transcrits alternatifs. Nos expériences démontrent, en effet, que la forme endogène présente une masse moléculaire apparente de 92kDa, plus légère que celle de la protéine ROBO4 décrite dans la littérature. De plus, elles ont permis l'identification de transcrits alternatifs potentiels mais ne permettent pas d'affirmer que l'isoforme de 92kDa obtenue par sur-expression des séquences codantes du

variant 2 et 3 est la forme endogène.

Il serait donc nécessaire d'isoler et de cloner les différents transcrits identifiés avec leurs régions régulatrices en 5'UTR et 3'UTR pour s'assurer qu'une protéine de 92kDa est bien produite. Il est également possible d'imaginer le ciblage spécifique des régions en 5' de chaque transcrit à l'aide d'un shRNA. Malgré les nombreuses expériences à réaliser pour compléter la caractérisation de la forme endogène des cellules tumorales, nous pensons que la forme protéique de 92kDa issue des variants 2 et 3 est un bon candidat et ceci pour les raisons suivantes. D'une part, la protéine est tronquée en N-terminal ce qui lui permet d'être plus légère et d'être détectée à une masse équivalente à celle de la protéine endogène. D'autre part, nous avons démontré que la protéine endogène n'est pas glycosylée car elle est insensible à la tunicamycine. Les produits des variants 2 et 3 ne possèdent pas de peptide signal et ne sont donc pas glycosylés.

Afin d'identifier les rôles des formes de ROBO4, nous avons caractérisé les fonctions de la forme glycosylée de ROBO4 dans les cellules tumorales et l'effet de sa sur-expression dans la dissémination métastatique des cellules de la lignée 4T1.

De manière intéressante, la présence de la forme glycosylée de ROBO4 dans les cellules tumorales 4T1 réduit significativement leur migration et leur capacité invasive *in vitro*. Or le ciblage par l'anticorps Ac1 de la forme endogène non glycosylée du récepteur ROBO4 réduit l'invasion des cellules tumorales MDA-B02 et la migration des cellules endothéliales HUVEC. Ces données indiquent que les deux isoformes de ROBO4 pourraient présenter des fonctions antagonistes dans les cellules. L'équipe du Dr. Seth a observé des effets similaires à ceux que nous décrivons lorsque la forme glycosylée est produite en grande quantité dans les cellules endothéliales HUVEC [268]. En effet, dans leur modèle expérimental, la sur-expression de la séquence codante de ROBO4 aboutit à la synthèse de la forme glycosylée et sa présence inhibe la migration des cellules endothéliales HUVEC *in vitro* [268].

Nous avons également recherché si la modulation de la forme glycosylée du récepteur ROBO4 pouvait modifier les capacités invasives et le tropisme osseux des cellules cancéreuses 4T1 lorsqu'elles sont injectées dans la glande mammaire de

souris immunocompétentes. Nos résultats ne montrent pas de différence entre les cellules 4T1 qui sur-expriment ou non ROBO4. En effet, la présence de la forme glycosylée du récepteur ROBO4 ne modifie pas la croissance tumorale des cellules 4T1 ni leur capacité à former des métastases pulmonaires ou osseuses ce qui est en accord avec nos observations *in vitro*. Il serait intéressant de réaliser une expérience d'injection intra-tibiale des cellules 4T1 qui sur-expriment la forme glycosylée de ROBO4 afin de déterminer leur capacité d'ancrage dans la moelle osseuse.

De nombreuses protéines d'adhérence, fortement glycosylées sont impliquées dans la progression métastatique des cancers [266]. Toutefois, une étude récente a montré que la glycosylation du récepteur d'adhérence ICAM2 est associée à une diminution des propriétés métastatiques d'une lignée cancéreuse de neuroblastome tandis que l'inhibition de sa glycosylation n'entrave plus la progression métastatique [269]. Dans la même optique, l'isoforme glycosylée du récepteur ROBO4 pourrait diminuer les propriétés tumorales et métastatiques des cellules cancéreuses alors que le variant protéique non glycosylé permettrait l'acquisition de propriétés métastatiques.

Cette dualité fonctionnelle est également observée dans un contexte vasculaire. En effet, le rôle exact de ROBO4 dans l'angiogenèse et ses différentes interactions avec des ligands et des récepteurs sont encore vivement controversés. ROBO4 favorise la migration des cellules endothéliales durant le développement [188], [228] mais il est également capable d'inhiber l'angiogenèse dans le but d'une stabilisation vasculaire [184], [190], [231]. Le statut de glycosylation ainsi que la différence de structure entre les deux isoformes pourraient alors moduler ces deux fonctions *via* la fixation de ligands spécifiques des deux formes de ROBO4.

L'isoforme de 92kDa que nous sur-exprimons est délétée du premier domaine immunoglobuline Ig1. Ce domaine est impliqué dans l'association de ROBO4 avec le récepteur de guidage axonal UNC5B lors de l'inhibition de l'angiogenèse par inactivation du récepteur VEGFR2 [190], [211]. Ainsi, la production d'une forme de ROBO4 sans Ig1 pourrait ne plus permettre plus son association avec UNC5B. De plus, les précédents travaux réalisés par notre équipe montrent également que l'association du récepteur UNC5B avec ROBO4 ne participe pas au mécanisme d'adhérence des cellules tumorales avec les cellules ostéoblastiques. L'identification

d'un variant protéique du récepteur ROBO4 aux propriétés fonctionnelles et structurales différentes ouvre de nouvelles pistes dans le décryptage de la fonction du récepteur ROBO4 dans le processus tumoral et pourrait permettre de réconcilier les rôles antagonistes de ce récepteur décrit dans la littérature.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux nous a permis de mettre en évidence l'existence de formes protéiques alternatives du récepteur ROBO4 :

- (i) Une forme glycosylée qui semble présenter des propriétés anti-métastatiques *in vitro* qui est produite en forte quantité par les cellules endothéliales mais qui n'est pas détectée dans les cellules tumorales ostéotropiques MDA-B02.
- (ii) Une isoforme protéique non glycosylée, seule forme détectée dans les cellules tumorales MDA-B02 ainsi que dans toutes les lignées tumorales testées, à l'origine des propriétés métastatiques caractérisées précédemment par l'équipe.

Ces observations ouvrent sur des perspectives immédiates à mettre en œuvre :

La sur-expression des séquences codantes des variants V2/V3 dans différentes lignées de carcinomes mammaires humains et murins nous permettra de déterminer si la forme synthétique de 92kDa récapitule les propriétés de la forme endogène. Afin de tester cette hypothèse, la séquence codante, utilisée pour les expériences de transfection, sera clonée dans le vecteur rétroviral pLPCX. Une transduction, permettant d'obtenir des lignées tumorales produisant stablement la protéine de 92kDa, sera réalisée dans le but d'évaluer ses effets sur les propriétés métastatiques des cellules tumorales.

Des constructions incluant les régions régulatrices en 5' et 3' des variants V2/V3 seront également réalisées. Les protéines produites après transfection seront analysées. En effet, lors de nos expériences seules les séquences codantes, déterminées à partir d'estimation *in silico,* ont été utilisées. Nos données ne nous permettent pas de dire si la totalité des transcrits identifiés (additionnés des régions 5'UTR et 3'UTR) aboutit à la synthèse d'une protéine identique à nos estimations. Cette expérience est nécessaire et pourrait nous permettre de savoir si les variants 2/3 sont susceptibles d'être à l'origine de la protéine ROBO4 endogène que nous

détectons dans les cellules MDA-B02. Une expérience complémentaire pourrait être d'examiner l'effet d'un siRNA ou d'un shRNA spécifique des variants 2/3 sur la synthèse de la forme endogène détectée dans les MDA-B02.

Parallèlement, nous devons identifier le transcrit endogène produit par les cellules tumorales permettant la synthèse de cette forme particulière de 92kDa. En effet, les expériences de RACE PCR ont permis d'identifier seulement les régions 5' des transcrits et non la totalité de la séquence nucléotidique. Il est tout à fait possible que la forme endogène de 92kDa produite par les cellules tumorales soit issue d'un transcrit que nous n'avons pas identifié. Pour ce faire, une expérience de séquençage de l'ARN à l'aide de la technologie MinION, qui permet d'identifier la séquence complète d'un ARN, a été programmée. Les résultats de cette expérience devraient nous permettre de mettre en évidence la diversité des transcrits de ROBO4 présents dans les cellules MDA-B02 ainsi que leur abondance.

Enfin, une étude plus poussée des rôles potentiellement antagonistes des deux formes de ROBO4 devra également être menée car les résultats actuels ne sont pas suffisants pour conclure sur le rôle de la forme glycosylée. En effet, les expériences fonctionnelles s'intéressant à la forme glycosylée du récepteur ROBO4 n'ont été menées que dans les cellules murines 4T1. Il serait donc nécessaire d'évaluer plus précisément l'effet de la forme glycosylée dans d'autres lignées cellulaires de carcinomes mammaires *in vitro* et *in vivo,* dans notre modèle expérimental de métastases osseuses.

Les résultats de ces expériences nous permettront de mieux caractériser le variant protéique synthétisé par les cellules tumorales afin de le cibler plus spécifiquement. En effet, on peut imaginer cibler la forme du récepteur ROBO4 présent à la surface des cellules tumorales sans interférer avec les fonctions biologiques régulatrices de la forme glycosylée produite par les cellules endothéliales. De plus, la détection spécifique de l'isoforme non glycosylée pourrait servir de marqueur de la progression tumorale dans des cas pathologiques cliniques. Dans ces optiques, notre équipe, en collaboration avec l'équipe du Dr. Bruno Robert, de l'institut de recherche en cancérologie de Montpelier, évalue actuellement l'effet d'anticorps humanisés monoclonaux, ciblant spécifiquement la forme endogène du récepteur ROBO4, sur les propriétés métastatiques des cellules MDA-B02.

Publications et communications scientifiques

Publications :

« The role of osteoclasts in breast cancer bone metastasis »

F. LE PAPE, G. VARGAS, P. CLEZARDIN

Journal of Bone Oncology 2016 Apr 8 ;5(3) :93-95

« Cancer Cell Colonisation In the Bone Microenvironment »

C. KAN, G. VARGAS, F. LE PAPE, P.CLEZARDIN

In*ternational Journal Of Molecular Science* 2016 Oct 4 ;17(10)

Communications dans le cadre d'un congrès

XXIII^{ème} Réunion Annuelle de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire. **(Poster)**

Lyon, France 11-13 mars 2015

Roundabout4 receptor mediates breast cancer bone metastasis formation and progression.

Cancer & Bone Society (CABS) Annual Meeting ECTS 2016. **(Oral et poster)**

Rome, Italie 14-15 mai 2016

Roundabout receptor ROBO4 : New actor in bone metastatic niche formation

Références bibliographiques

[1] B. Clarke, "Normal bone anatomy and physiology.," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3, pp. 131–139, 2008.

[2] A. L. Boskey, "Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects," *Bonekey Rep.*, vol. 2, pp. 1–11, 2013.

[3] R. Florencio-Silva, G. R. D. S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, "Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells," *BioMed Research International*. p. 17, 2015.

[4] D. E. Zhang, C. J. Hetherington, H. M. Chen, and D. G. Tenen, "The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 14, no. 1, pp. 373–81, 1994.

[5] F. Arai, T. Miyamoto, O. Ohneda, T. Inada, T. Sudo, K. Brasel, T. Miyata, D. M. Anderson, and T. Suda, "Commitment and Differentiation of Osteoclast Precursor Cells by the Sequential Expression of c-Fms and Receptor Activator of Nuclear Factor κB (RANK) Receptors," *J. Exp. Med*, vol. 190, no. 12, pp. 1741–1754, 1999.

[6] J. R. Edwards and G. R. Mundy, "Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models.," *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 7, no. 4, pp. 235–243, 2011.

[7] D. L. Lacey, E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, and W. J. Boyle, "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation," *Cell*, vol. 93, no. 2, pp. 165–176, 1998.

[8] A. Cappariello, A. Maurizi, V. Veeriah, and A. Teti, "The Great Beauty of the osteoclast," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 558, pp. 70–78, 2014.

[9] Y. P. Li, W. Chen, Y. Liang, E. Li, and P. Stashenko, "Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification.," *Nat. Genet.*, vol. 23, no. 4, pp. 447–451, 1999.

[10] J. M. Delaissé, T. L. Andersen, M. T. Engsig, K. Henriksen, T. Troen, and L. Blavier, "Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 61, no. 6, pp. 504–513, 2003.

[11] T. Komori, H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R. . Bronson, Y.-H. Gao, M. Inada, M. Sato, R. Okamoto, Y. Kitamura, S. Yoshiki, and T. Kishimoto, "Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts," *Cell*, vol. 89, no. 5, pp. 755–764, 1997.

[12] K. Nakashima, X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J. M. Deng, R. R. Behringer, and B. De Crombrugghe, "The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation," *Cell*, vol. 108, no. 1, pp. 17–29, 2002.

[13] 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.

[14] G. L. Lin and K. D. Hankenson, "Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation," *J. Cell. Biochem.*, vol. 112, no. 12, pp. 3491–3501, 2011.

[15] M. Wu, G. Chen, and Y.-P. Li, "TGF-β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease.," *Bone Res.*, vol. 4, 2016.

[16] H. Hu, M. J. Hilton, X. Tu, K. Yu, D. M. Ornitz, and F. Long, "Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development.," *Development*, vol. 132, no. 1, pp. 49–60, 2005.

[17] S. J. Roberts, A. J. Stewart, P. J. Sadler, and C. Farquharson, "Human PHOSPHO1 exhibits high specific phosphoethanolamine and phosphocholine phosphatase activities.," *Biochem. J.*, vol. 382, pp. 59–65, 2004.

[18] E. E. Golub and K. Boesze-Battaglia, "The role of alkaline phosphatase in mineralization," *Curr. Opin. Orthop.*, vol. 18, no. 5, pp. 444–448, 2007.

[19] T. A. Franz-Odendaal, B. K. Hall, and P. E. Witten, "Buried alive: How osteoblasts become osteocytes," *Dev. Dyn.*, vol. 235, no. 1, pp. 176–190, 2006.

[20] L. F. Bonewald, "The amazing osteocyte," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 26, no. 2, pp. 229–238, 2011.

[21] S. Zhao, Y. Kato, Y. Zhang, S. Harris, S. S. Ahuja, and L. F. Bonewald, "MLO-Y4 Osteocyte-Like Cells Support Osteoclast."

[22] K. E. S. Poole, R. L. van Bezooijen, N. Loveridge, H. Hamersma, S. E. Papapoulos, C. W. Löwik, and J. Reeve, "Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation.," *FASEB J.*, vol. 19, no. 13, pp. 1842–1844, 2005.

[23] H. J. Sutherland, P. M. Lansdorp, D. H. Henkelman, A. C. Eaves, and C. J. Eaves, "Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 9, pp. 3584–8, 1990.

[24] C. Eaves, "Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality," *Blood*, vol. 125, no. 17, pp. 2605–2614, 2015.

[25] D. Kent, M. Copley, C. Benz, B. Dykstra, M. Bowie, and C. Eaves, "Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 7. pp. 1926–1930, 2008.

[26] L. Ding, T. L. Saunders, G. Enikolopov, and S. J. Morrison, "Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells.," *Nature*, vol. 481, no. 7382, pp. 457–62, 2012.

[27] T. Ara, K. Tokoyoda, T. Sugiyama, T. Egawa, K. Kawabata, and T. Nagasawa, "Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny," *Immunity*, vol. 19, no. 2, pp. 257–267, 2003.

[28] Y. Nie, Y.-C. Han, and Y.-R. Zou, "CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 4, pp. 777–83, 2008.

[29] H. E. Broxmeyer, C. M. Orschell, D. W. Clapp, G. Hangoc, S. Cooper, P. A. Plett, W. C. Liles, X. Li, B. Graham-Evans, T. B. Campbell, G. Calandra, G. Bridger, D. C. Dale, and E. F. Srour, "Rapid Mobilization of Murine and Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist," *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 8, pp. 1307–1318, 2005.

[30] F. Shibata, Y. Goto-Koshino, Y. Morikawa, T. Komori, M. Ito, Y. Fukuchi, J. P. Houchins, M. Tsang, D. Y. Li, T. Kitamura, and H. Nakajima, "Roundabout 4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the side population phenotype.," *Stem Cells*, vol. 27, no. 1, pp. 183–90, 2009.

[31] S. Smith-Berdan, A. Nguyen, M. A. Hong, and E. C. Forsberg, "ROBO4-mediated vascular integrity regulates the directionality of hematopoietic stem cell trafficking," *Stem Cell Reports*, vol. 4, no. 2, pp. 255–268, 2015.

[32] S. Smith-Berdan, A. Nguyen, D. Hassanein, M. Zimmer, F. Ugarte, J. Ciriza, D. Li, M. E. García-Ojeda, L. Hinck, and E. C. Forsberg, "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.

[33] R. Schofield, "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell," *Blood Cells*, vol. 4, pp. 7–25, 1978.

[34] G. M. Crane, E. Jeffery, and S. J. Morrison, "Adult haematopoietic stem cell niches.," *Nat. Rev. Immunol.*, 2017.

[35] P. Boulais and P. Frenette, "Making sense of hematopoietic stem cell niches," *Blood*, vol. 125, no. 17, pp. 2621–2630, 2015.

[36] S. J. Morrison and D. T. Scadden, "The bone marrow niche for haematopoietic stem cells.," *Nature*, vol. 505, no. 7483, pp. 327–34, 2014.

[37] M. Acar, K. S. Kocherlakota, M. M. Murphy, J. G. Peyer, H. Oguro, C. N. Inra, C. Jaiyeola, Z. Zhao, K. Luby-Phelps, and S. J. Morrison, "Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal," *Nature*, vol. 526, no. 7571, pp. 126–30, 2015.

[38] J. Y. Chen, M. Miyanishi, S. K. Wang, S. Yamazaki, R. Sinha, K. S. Kao, J. Seita, D. Sahoo, H. Nakauchi, and I. L. Weissman, "Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche," *Nature*, vol. 530, no. 7589, pp. 223–227, 2016.

[39] F. Arai, A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S. Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G. Y. Koh, and T. Suda, "Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche," *Cell*, vol. 118, no. 2, pp. 149–161, 2004.

[40] S. Nilsson and H. Johnston, "Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells," *Blood*, vol. 106, no. 4, pp. 1232–1239, 2005.

[41] S. Stier, Y. Ko, R. Forkert, C. Lutz, T. Neuhaus, E. Grünewald, T. Cheng, D. Dombkowski, L. M. Calvi, S. R. Rittling, and D. T. Scadden, "Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size," *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 11, pp. 1781–1791, 2005.

[42] C. Blin-Wakkach, M. Rouleau, and A. Wakkach, "Roles of osteoclasts in the control of medullary hematopoietic niches," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 561, pp. 29–37, 2014.

[43] M. J. Kiel, Ö. H. Yilmaz, T. Iwashita, O. H. Yilmaz, C. Terhorst, and S. J. Morrison, "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells," *Cell*, vol. 121, no. 7, pp. 1109–1121, 2005.

[44] Y. Kunisaki, I. Bruns, C. Scheiermann, J. Ahmed, S. Pinho, D. Zhang, T. Mizoguchi, Q. Wei, D. Lucas, K. Ito, J. C. Mar, A. Bergman, and P. S. Frenette, "Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence.," *Nature*, vol. 502, no. 7473, pp. 637–43, 2013.

[45] A. T. Hooper, J. M. Butler, D. J. Nolan, A. Kranz, K. Iida, M. Kobayashi, H. G. Kopp, K. Shido, I. Petit, K. Yanger, D. James, L. Witte, Z. Zhu, Y. Wu, B. Pytowski, Z. Rosenwaks, V. Mittal, T. N. Sato, and S. Rafii, "Engraftment and Reconstitution of Hematopoiesis Is Dependent on VEGFR2-Mediated Regeneration of Sinusoidal Endothelial Cells," *Cell Stem Cell*, vol. 4, no. 3, pp. 263–274, 2009.

[46] Y. Omatsu, T. Sugiyama, H. Kohara, G. Kondoh, N. Fujii, K. Kohno, and T. Nagasawa, "The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche," *Immunity*, vol. 33, no. 3, pp. 387–399, 2010.

[47] B. O. Zhou, R. Yue, M. M. Murphy, J. G. Peyer, and S. J. Morrison, "Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow," *Cell Stem Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 154–168, 2014.

[48] S. Yamazaki, H. Ema, G. Karlsson, T. Yamaguchi, H. Miyoshi, S. Shioda, M. M. Taketo, S. Karlsson, A. Iwama, and H. Nakauchi, "Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche," *Cell*, vol. 147, no. 5, pp. 1146–1158, 2011.

[49] M. Zhao, J. M. Perry, H. Marshall, A. Venkatraman, P. Qian, X. C. He, J. Ahamed, and L. Li, "Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells.," *Nat. Med.*, vol. 20, no. 11, pp. 1321–1326, 2014.

[50] T. Suda, Y. Ueno, K. Fujii, and T. Shinki, "Vitamin D and bone," *J. Cell. Biochem.*, vol. 88, no. 2, pp. 259–266, 2003.

[51] J. F. Shyu, C. Shih, C. Y. Tseng, C. H. Lin, D. T. Sun, H. T. Liu, H. C. Tsung, T. H. Chen, and R. B. Lu, "Calcitonin induces podosome disassembly and detachment of osteoclasts by modulating Pyk2 and Src activities," *Bone*, vol. 40, no. 5, pp. 1329–1342, 2007.

[52] J. C. Huang, T. Sakata, L. L. Pfleger, M. Bencsik, B. P. Halloran, D. D. Bikle, and R. A. Nissenson, "PTH Differentially Regulates Expression of RANKL and OPG," *J Bone Min. Res*, vol. 19, no. 2, pp. 235–244, 2004.

[53] V. Krishnan, T. L. Moore, Y. L. Ma, L. M. Helvering, C. a Frolik, K. M. Valasek, P. Ducy, and A. G. Geiser, "Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 17, no. 3, pp. 423–35, 2003.

[54] T. Bellido, A. A. Ali, I. Gubrij, L. I. Plotkin, Q. Fu, C. A. O'Brien, S. C. Manolagas, and R. L. Jilka, "Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: A novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis," *Endocrinology*, vol. 146, no. 11, pp. 4577–4583, 2005.

[55] R. Pacifici, "Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 11, no. 8, pp. 1043–1051, 1996.

[56] P. Juárez and T. A. Guise, "TGF-β in cancer and bone: Implications for treatment of bone metastases," *Bone*, vol. 48, no. 1, pp. 23–29, 2011.

[57] K. T. Steeve, P. Marc, T. Sandrine, H. Dominique, and F. Yannick, "IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 15, no. 1, pp. 49–60, 2004.

[58] M. C. Walsh and Y. Choi, "Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. OCT, pp. 1–11, 2014.

[59] N. Bucay, I. Sarosi, C. R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley, C. Capparelli, S. Scully, H. L. Tan, W. Xu, D. L. Lacey, W. J. Boyle, and W. S. Simonet, "{Iosteoprotegerin}-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification," *Genes Dev.*, vol. 12, pp. 1260–1268, 1998.

[60] N. Irie, Y. Takada, Y. Watanabe, Y. Matsuzaki, C. Naruse, M. Asano, Y. Iwakura, T. Suda, and K. Matsuo, "Bidirectional signaling through EphrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 21, pp. 14637–14644, 2009.

[61] S. Kang and A. Kumanogoh, "Semaphorins in bone development, homeostasis, and disease," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 24, no. 3, pp. 163–171, 2013.

[62] M. Hayashi, T. Nakashima, M. Taniguchi, T. Kodama, A. Kumanogoh, and H. Takayanagi, "Osteoprotection by semaphorin 3A," *Nature*, vol. 485, no. 7396, pp. 69–74, 2012.

[63] T. Negishi-Koga, M. Shinohara, N. Komatsu, H. Bito, T. Kodama, R. H. Friedel, and H. Takayanagi, "Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 11, pp. 1473–1480, 2011.

[64] INCa, "Les cancers en France, Les Données, INCa, édition 2015. BoulogneBillancourt: Institut national du Cancer (INCa)," 2016.

[65] K. McPherson, "ABC of breast diseases: Breast cancer---epidemiology, risk factors, and genetics," *Bmj*, vol. 321, no. 7261, pp. 624–628, 2000.

[66] T. Sorlie, C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J. C. Matese, P. O. Brown, D. Botstein, P. Eystein Lonning, and A. L. Borresen-Dale, "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 19, pp. 10869–10874, 2001.

[67] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, "Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 178–196, 2014.

[68] J. Yang, S. a Mani, J. L. Donaher, S. Ramaswamy, R. a Itzykson, C. Come, P. Savagner, I. Gitelman, A. Richardson, R. a Weinberg, C. Val, and A. Lamarque, "Twist , a Master Regulator of Morphogenesis , Plays an Essential Role in Tumor Metastasis," *Cell*, vol. 117, pp. 927–939, 2004.

[69] K. L. Harper, M. S. Sosa, D. Entenberg, H. Hosseini, J. F. Cheung, R. Nobre, A. Avivar-Valderas, C. Nagi, N. Girnius, R. J. Davis, E. F. Farias, J. Condeelis, C. A. Klein, and J. A. Aguirre-Ghiso, "Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2+ mammary cancer," *Nature*, vol. 540, no. 7634, pp. 588–592, 2016.

[70] M. Egeblad and Z. Werb, "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression," *Nat Rev Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 161–174, 2002.

[71] P. Friedl and K. Wolf, "Proteolytic interstitial cell migration: A five-step process," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 28, no. 1–2, pp. 129–135, 2009.

[72] J. B. Wyckoff, J. G. Jones, J. S. Condeelis, and J. E. Segall, "A Critical Step in Metastasis : In Vivo Analysis of Intravasation at the Primary Tumor," pp. 2504–2511, 2000.

[73] N. Reymond, B. B. D'Água, and A. J. Ridley, "Crossing the endothelial barrier during metastasis.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 12, pp. 858–70, 2013.

[74] G. P. Gupta and J. Massagué, "Cancer Metastasis: Building a Framework," *Cell*, vol. 127, no. 4, pp. 679–695, 2006.

[75] M. Labelle and R. O. Hynes, "The initial hours of metastasis: The importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination," *Cancer Discov.*, vol. 2, no. 12, pp. 1091–1099, 2012.

[76] Y. Kang and K. Pantel, "Tumor Cell Dissemination: Emerging Biological Insights from Animal Models and Cancer Patients," *Cancer Cell*, vol. 23, no. 5, pp. 573–581, 2013.

[77] G. Bendas and L. Borsig, "Cancer cell adhesion and metastasis: Selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins," *Int. J. Cell Biol.*, vol. 2012, 2012.

[78] E. O. Hanrahan, A. M. Gonzalez-Angulo, S. H. Giordano, R. Rouzier, K. R. Broglio, G. N. Hortobagyi, and V. Valero, "Overall survival and cause-specific mortality of patients with stage T1a,bN0M0 breast carcinoma," *J. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 31, pp. 4952–4960, 2007.

[79] S. Riethdorf, H. Wikman, and K. Pantel, "Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients," *Int. J. Cancer*, vol. 123, no. 9, pp. 1991–2006, 2008.

[80] J. H. Tsai, J. L. Donaher, D. A. Murphy, S. Chau, and J. Yang, "Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 6, pp. 725–736, 2012.

[81] O. H. Ocañ̃a, R. Corcoles, A. Fabra, G. Moreno-Bueno, H. Acloque, S. Vega, A. Barrallo-Gimeno, A. Cano, and M. A. Nieto, "Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 6, pp. 709–724, 2012.

[82] S. Paget, "The distribution of secondary growths in cancer of the breast," *Lancet*, vol. 133, no. 3421, pp. 571–573, 1989.

[83] H. Peinado, H. Zhang, I. R. Matei, B. Costa-Silva, A. Hoshino, G. Rodrigues, B. Psaila, R. N. Kaplan, J. F. Bromberg, Y. Kang, M. J. Bissell, T. R. Cox, A. J. Giaccia, J. T. Erler, S. Hiratsuka, C. M. Ghajar, and D. Lyden, "Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 5, pp. 302–317, 2017.

[84] Y. Kang, P. M. Siegel, W. Shu, M. Drobnjak, S. M. Kakonen, C. Cordón-Cardo, T. A. Guise, and J. Massagué, "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone," *Cancer Cell*, vol. 3, no. 6, pp. 537–549, 2003.

[85] R. N. Kaplan, R. D. Riba, S. Zacharoulis, H. Anna, L. Vincent, C. Costa, D. D. Macdonald, D. K. Jin, S. A. Kerns, Z. Zhu, D. Hicklin, Y. Wu, J. L. Port, E. R. Port, D. Ruggero, S. V Shmelkov, K. K. Jensen, S. Rafii, and D. Lyden, "VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche," *Nature*, vol. 438, no. 7069, pp. 820–827, 2005.

[86] S. S. McAllister, A. M. Gifford, A. L. Greiner, S. P. Kelleher, M. P. Saelzler, T. A. Ince, F. Reinhardt, L. N. Harris, B. L. Hylander, E. A. Repasky, and R. A. Weinberg, "Systemic Endocrine Instigation of Indolent Tumor Growth Requires Osteopontin," *Cell*, vol. 133, no. 6, pp. 994–1005, 2008.

[87] X. Li, R. Loberg, J. Liao, C. Ying, L. A. Snyder, K. J. Pienta, and L. K. McCauley, "A destructive cascade mediated by CCL2 facilitates prostate cancer growth in bone," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 4, pp. 1685–1692, 2009.

[88] J. T. Erler, K. L. Bennewith, T. R. Cox, G. Lang, D. Bird, A. Koong, Q. T. Le, and A. J. Giaccia, "Hypoxia-Induced Lysyl Oxidase Is a Critical Mediator of Bone Marrow Cell Recruitment to Form the Premetastatic Niche," *Cancer Cell*, vol. 15, no. 1, pp. 35–44, 2009.

[89] Z. Zhang, C. Ni, W. Chen, P. Wu, Z. Wang, J. Yin, J. Huang, and F. Qiu, "Expression of CXCR4 and breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis," *BMC Cancer*, pp. 1–8, 2014.

[90] a Müller, B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, a Mohar, E. Verástegui, and a Zlotnik, "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.," *Nature*, vol. 410, no. 6824, pp. 50–56, 2001.

[91] M. m Richert, K. s Vaidya, C. n Mills, D. Wong, W. Korz, D. r Hurst, and D. r Welch, "Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone," *Oncol. Rep.*, vol. 21, pp. 761–767, 2009.

[92] C. C. Lynch, A. Hikosaka, H. B. Acuff, M. D. Martin, N. Kawai, R. K. Singh, T. C. Vargo-Gogola, J. L. Begtrup, T. E. Peterson, B. Fingleton, T. Shirai, L. M. Matrisian, and M. Futakuchi, "MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL," *Cancer Cell*, vol. 7, no. 5, pp. 485–496, 2005.

[93] A. L. Sabbota, H. R. C. Kim, X. Zhe, R. Fridman, R. D. Bonfil, and M. L. Cher, "Shedding of RANKL by tumor-associated MT1-MMP activates Src-dependent prostate cancer cell migration," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 13, pp. 5558–5566, 2010.

[94] D. H. Jones, T. Nakashima, O. H. Sanchez, I. Kozieradzki, S. V Komarova, I. Sarosi, S. Morony, E. Rubin, R. Sarao, C. V Hojilla, V. Komnenovic, Y.-Y. Kong, M. Schreiber, S. J. Dixon, S. M. Sims, R. Khokha, T. Wada, and J. M. Penninger, "Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL.," *Nature*, vol. 440, no. 7084, pp. 692–6, 2006.

[95] H. S. Park, A. Lee, B. J. Chae, J. S. Bae, B. J. Song, and S. S. Jung, "Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B as a poor prognostic marker in breast cancer," *J Surg Oncol*, vol. 110, no. 7, pp. 807–812, 2014.

[96] Z. Saidak, C. Boudot, R. Abdoune, L. Petit, M. Brazier, R. Mentaverri, and S. Kamel, "Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor," *Exp. Cell Res.*, vol. 315, no. 12, pp. 2072–2080, 2009.

[97] Y. Shiozawa, E. a. Pedersen, a. M. Havens, Y. Jung, A. Mishra, J. Joseph, J. K. Kim, L. R. Patel, C. Ying, a. M. Ziegler, and Others, "Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 4, pp. 1298–1312, 2011.

[98] V. Sung, J. T. Stubbs, L. Fisher, a D. Aaron, and E. W. Thompson, "Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential usage of the alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrins.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 176, no. 3, pp. 482–94, 1998.

[99] Y. Zhao, R. Bachelier, I. Treilleux, P. Pujuguet, O. Peyruchaud, R. Baron, P. Clément-Lacroix, and P. Clézardin, "Tumor αvβ3 integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 12, pp. 5821–5830, 2007.

[100] E. K. Sloan, N. Pouliot, K. L. Stanley, J. Chia, J. M. Moseley, D. K. Hards, and R. L. Anderson, "Tumor-specific expression of alphavbeta3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone.," *Breast Cancer Res.*, vol. 8, no. 2, p. R20, 2006.

[101] H. Wang, C. Yu, X. Gao, T. Welte, A. M. Muscarella, L. Tian, H. Zhao, Z. Zhao, S. Du, J. Tao, B. Lee, T. F. Westbrook, S. T. C. Wong, X. Jin, J. M. Rosen, C. K. Osborne, and X. H. F. Zhang, "The Osteogenic Niche Promotes Early-Stage Bone Colonization of Disseminated Breast Cancer Cells," *Cancer Cell*, vol. 27, no. 2, pp. 193–210, 2015.

[102] A. Bellahcène, R. Bachelier, C. Detry, R. Lidereau, P. Clézardin, and V. Castronovo, "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.

[103] A. Javed, G. L. Barnes, J. Pratap, T. Antkowiak, L. C. Gerstenfeld, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, J. B. Lian, and G. S. Stein, "Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3/CBFA1) transcription factors in breast cancer cells inhibits osteolysis in vivo.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 5, pp. 1454–9, 2005.

[104] J. Akech, J. J. Wixted, K. Bedard, M. van der Deen, S. Hussain, T. A. Guise, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, L. R. Languino, D. C. Altieri, J. Pratap, E. Keller, G. S. Stein, and J. B. Lian, "Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions.," *Oncogene*, vol. 29, no. 6, pp. 811–21, 2010.

[105] X. Q. Li, J. T. Lu, C. C. Tan, Q. S. Wang, and Y. M. Feng, "RUNX2 promotes breast cancer bone metastasis by increasing integrin α5-mediated colonization," *Cancer Lett.*, vol. 380, no. 1, pp. 78–86, 2016.

[106] I. Romero, F. Garrido, and A. M. Garcia-Lora, "Metastases in immune-mediated dormancy: A new opportunity for targeting cancer," *Cancer Res.*, vol. 74, no. 23, pp. 6750–6757, 2014.

[107] C. M. Ghajar, H. Peinado, H. Mori, I. R. Matei, K. J. Evason, H. Brazier, D. Almeida, A. Koller, K. A. Hajjar, D. Y. R. Stainier, E. I. Chen, D. Lyden, and M. J. Bissell, "The perivascular niche regulates breast tumour dormancy.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 807–17, 2013.

[108] P. Bragado and J. A. Aguirre-ghiso, "Microenvironments Dictating Tumor Cell Dormancy," *Recent Results Cancer Res*, vol. 195, pp. 25–39, 2012.

[109] A. Kobayashi, H. Okuda, F. Xing, P. R. Pandey, M. Watabe, S. Hirota, S. K. Pai, W. Liu, K. Fukuda, C. Chambers, A. Wilber, and K. Watabe, "Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone," *J Exp Med*, vol. 208, no. 13, pp. 2641–2655, 2011.

[110] P. Bragado, Y. Estrada, F. Parikh, S. Krause, C. Capobianco, H. G. Farina, D. M. Schewe, and J. A. Aguirre-ghiso, "TGFβ2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGFβ-RIII and p38α/β signalling," *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 11, pp. 1351–1361, 2014.

[111] Y. Shiozawa, E. A. Pedersen, L. R. Patel, A. M. Ziegler, A. M. Havens, Y. Jung, J. Wang, S. Zalucha, R. D. Loberg, K. J. Pienta, and R. S. Taichman, "GAS6/AXL Axis Regulates Prostate Cancer Invasion, Proliferation, and Survival in the Bone Marrow Niche," *Neoplasia*, vol. 12, no. 2, p. 116–IN4, 2010.

[112] J. Canon, R. Bryant, M. Roudier, D. G. Branstetter, and W. C. Dougall, "RANKL inhibition combined with tamoxifen treatment increases anti-tumor efficacy and prevents tumor-induced bone destruction in an estrogen receptor-positive breast cancer bone metastasis model," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 135, no. 3, pp. 771–780, 2012.

[113] R. J. Thomas, T. A. Guise, J. J. Yin, J. Elliott, N. J. Horwood, T. J. Martin, and M. T. Gillespie, "Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation," *Endocrinology*, vol. 140, no. 10, pp. 4451–4458, 1999.

[114] H. Saito, T. Tsunenari, E. Onuma, K. Sato, E. Ogata, and H. Yamada-Okabe, "Humanized monoclonal antibody against parathyroid hormone-related protein suppresses osteolytic bone metastasis of human breast cancer cells derived from MDA-MB-231," *Anticancer Res.*, vol. 25, no. 6 B, pp. 3817–3823, 2005.

[115] T. A. Guise, J. J. Yin, R. J. Thomas, M. Dallas, Y. Cui, and M. T. Gillespie, "Parathyroid hormone-related protein (PTHrP)-(1-139) isoform is efficiently secreted in vitro and enhances breast cancer metastasis to bone in vivo," *Bone*, vol. 30, no. 5, pp. 670–676, 2002.

[116] O. Kudo, A. Sabokbar, A. Pocock, I. Itonaga, Y. Fujikawa, and N. A. Athanasou, "Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism," *Bone*, vol. 32, no. 1, pp. 1–7, 2003.

[117] M. S. Bendre, D. Gaddy-Kurten, T. Mon-Foote, N. S. Akel, R. a Skinner, R. W. Nicholas, and L. J. Suva, "Expression of interleukin 8 and not parathyroid hormone-related protein by human breast cancer cells correlates with bone metastasis in vivo," *Cancer Res*, vol. 62, pp. 5571–5579, 2002.

[118] K. Tawara, J. T. Oxford, and C. L. Jorcyk, "Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone:Potential of anti-IL-6 therapies," *Cancer Manag. Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 177–189, 2011.

[119] M. S. Bendre, D. C. Montague, T. Peery, N. S. Akel, D. Gaddy, and L. J. Suva, "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.

[120] X. Lu, Q. Wang, G. Hu, C. Van Poznak, M. Fleisher, M. Reiss, J. Massagué, and Y. Kang, "ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis," *Genes Dev.*, vol. 23, no. 16, pp. 1882–1894, 2009.

[121] A. Boucharaba, C. M. Serre, S. Grès, J. S. Saulnier-Blache, J. C. Bordet, J. Guglielmi, P. Clézardin, and O. Peyruchaud, "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.

[122] N. Sethi, X. Dai, C. G. Winter, and Y. 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.

[123] K. N. Weilbaecher, T. A. Guise, and L. K. McCauley, "Cancer to bone: a fatal attraction," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 6, pp. 411–425, 2011.

[124] D. J. Heath, A. D. Chantry, C. H. Buckle, L. Coulton, J. D. Shaughnessy, H. R. Evans, J. A. Snowden, D. R. Stover, K. Vanderkerken, and P. I. Croucher, "Inhibiting Dickkopf-1 (Dkk1) removes suppression of bone formation and prevents the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 24, no. 3, pp. 425–36, 2009.

[125] S. Colucci, G. Brunetti, A. Oranger, G. Mori, F. Sardone, G. Specchia, E. Rinaldi, P. Curci, V. Liso, G. Passeri, A. Zallone, R. Rizzi, and M. Grano, "Myeloma cells suppress osteoblasts through sclerostin secretion.," *Blood Cancer J.*, vol. 1, no. 6, p. e27, 2011.

[126] R. Schwaninger, C. A. Rentsch, A. Wetterwald, G. van der Horst, R. L. van Bezooijen, G. van der Pluijm, C. W. G. M. Löwik, K. Ackermann, W. Pyerin, F. C. Hamdy, G. N. Thalmann, and M. G. Cecchini, "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.

[127] J. Groppe, J. Greenwald, E. Wiater, J. Rodriguez-Leon, A. N. Economides, W. Kwiatkowski, M. Affolter, W. W. Vale, J. C. Izpisua Belmonte, and S. Choe, "Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin," *Nature*, vol. 420, no. 6916, pp. 636–642, 2002.

[128] C. Secondini, A. Wetterwald, R. Schwaninger, G. N. Thalmann, and M. G. Cecchini, "The role of the BMP signaling antagonist noggin in the development of prostate cancer osteolytic bone metastasis," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, 2011.

[129] T. Guise, "Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases.," *Cancer*, vol. 88, pp. 2892–2898, 2000.

[130] G. Balooch, M. Balooch, R. K. Nalla, S. Schilling, E. H. Filvaroff, G. W. Marshall, S. J. Marshall, R. O. Ritchie, R. Derynck, and T. Alliston, "TGF-beta regulates the mechanical properties and composition of bone matrix.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 52, pp. 18813–18818, 2005.

[131] P. F. Christopoulos, P. Msaouel, and M. Koutsilieris, "The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer.," *Mol. Cancer*, vol. 14, p. 43, 2015.

[132] T. Hiraga, A. Myoui, N. Hashimoto, A. Sasaki, K. Hata, Y. Morita, H. Yoshikawa, C. J. Rosen, G. R. Mundy, and T. Yoneda, "Bone-derived IGF mediates crosstalk between bone and breast cancer cells in bony metastases," *Cancer Res.*, vol. 72, no. 16, pp. 4238–4249, 2012.

[133] M. Bartucci, C. Morelli, L. Mauro, S. Ando', and E. Surmacz, "Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 18, pp. 6747–6754, 2001.

[134] L. Kingsley, P. Fournier, J. Chirgwin, and T. Guise, "Molecular Biology of Bone Metastasis," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 6, no. 10, pp. 2609–2617, 2007.

[135] J. L. Sanders, N. Chattopadhyay, O. Kifor, T. Yamaguchi, and E. M. Brown, "Ca(2+)-sensing receptor expression and PTHrP secretion in PC-3 human prostate cancer cells.," *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 281, no. 6, pp. E1267–E1274, 2001.

[136] J. L. Sanders, N. Chattopadhyay, O. Kifor, T. Yamaguchi, R. R. Butters, and E. M. Brown, "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.

[137] J. Liao, A. Schneider, N. S. Datta, and L. K. McCauley, "Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 18, pp. 9065–9073, 2006.

[138] B. Ell, L. Mercatali, T. Ibrahim, N. Campbell, H. Schwarzenbach, K. Pantel, D. Amadori, and Y. Kang, "Tumor-Induced Osteoclast miRNA Changes as Regulators and Biomarkers of Osteolytic Bone Metastasis," *Cancer Cell*, vol. 24, no. 4, pp. 542–556, 2013.

[139] D. Y. Lee, Z. Deng, C.-H. Wang, and B. B. Yang, "MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 51, pp. 20350–20355, 2007.

[140] E. Van Beek, E. Pieterman, L. Cohen, C. Löwik, and S. Papapoulos, "Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 264, pp. 108–111, 1999.

[141] R. Coleman, M. Gnant, G. Morgan, and P. Clezardin, "Effects of bone-targeted agents on cancer progression and mortality," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 104, no. 14, pp. 1059–1067, 2012.

[142] R. Aft, M. Naughton, K. Trinkaus, M. Watson, L. Ylagan, M. Chavez-MacGregor, J. Zhai, S. Kuo, W. Shannon, K. Diemer, V. Herrmann, J. Dietz, A. Ali, M. Ellis, P. Weiss, T. Eberlein, C. Ma, P. M. Fracasso, I. Zoberi, M. Taylor, W. Gillanders, T. Pluard, J. Mortimer, and K. Weilbaecher, "Effect of zoledronic acid on disseminated tumour cells in women with locally advanced breast cancer: An open label, randomised, phase 2 trial," *Lancet Oncol.*, vol. 11, no. 5, pp. 421–428, 2010.

[143] V. Stresing, P. G. Fournier, A. Bellahcène, I. Benzaïd, H. Mönkkönen, M. Colombel, F. H. Ebetino, V. Castronovo, and P. Clézardin, "Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase," *Bone*, vol. 48, no. 2, pp. 259–266, 2011.

[144] I. Benzaïd, H. Mönkkönen, E. Bonnelye, J. Mönkkönen, and P. Clézardin, "In vivo phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors trigger Vγ9Vδ2 T-cell antitumor cytotoxicity through ICAM-1 engagement," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 22, pp. 6249–6259, 2012.

[145] S. Junankar, G. Shay, J. Jurczyluk, N. Ali, J. Down, N. Pocock, A. Parker, A. Nguyen, S. Sun, B. Kashemirov, C. E. McKenna, P. I. Croucher, A. Swarbrick, K. Weilbaecher, T. G. Phan, and M. J. Rogers, "Real-time intravital imaging establishes tumor-associated macrophages as the extraskeletal target of bisphosphonate action in cancer," *Cancer Discov.*, vol. 5, no. 1, pp. 35–42, 2015.

[146] L. Kopper, "Denosumab-A powerful RANKL inhibitor to stop lytic metastases and other bone loss actions by osteoclasts," *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 18, no. 4, pp. 743–747, 2012.

[147] A. T. Stopeck, A. Lipton, J.-J. Body, G. G. Steger, K. Tonkin, R. H. de Boer, M. Lichinitser, Y. Fujiwara, D. A. Yardley, M. Viniegra, M. Fan, Q. Jiang, R. Dansey, S. Jun, and A. Braun, "Denosumab Compared With Zoledronic Acid for the Treatment of Bone Metastases in Patients With Advanced Breast Cancer: A Randomized, Double-Blind Study," *J Clin Oncol*, vol. 28, no. 35, pp. 5132–5139, 2010.

[148] A. T. Stopeck, K. Fizazi, J.-J. Body, J. E. Brown, M. Carducci, I. Diel, Y. Fujiwara, M. Martín, A. Paterson, K. Tonkin, N. Shore, P. Sieber, F. Kueppers, L. Karsh, D. Yardley, H. Wang, T. Maniar, J. Arellano, and A. Braun, "Safety of long-term denosumab therapy: results from the open label extension phase of two phase 3 studies in patients with metastatic breast and prostate cancer," *Support. Care Cancer*, no. 24, pp. 447–455, 2016.

[149] E. B., F. C., and M. V., "Bone targeted therapies in advanced breast cancer," *Swiss Med. Wkly.*, vol. 147, no. June, pp. 1–11, 2017.

[150] L. T. L. T. Duong, G. A. Wesolowski, P. Leung, R. Oballa, and M. Pickarski, "Efficacy of a cathepsin K inhibitor in a preclinical model for prevention and treatment of breast cancer bone metastasis," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 13, no. December, pp. 2898–2909, 2014.

[151] A. B. Jensen, C. Wynne, G. Ramirez, W. He, Y. Song, Y. Berd, H. Wang, A. Mehta, and A. Lombardi, "The cathepsin K inhibitor odanacatib suppresses bone resorption in women with breast cancer and established bone metastases: results of a 4-week, double-blind, randomized, controlled trial," *Clin. Breast Cancer*, vol. 10, no. 6, pp. 452–458, 2010.

[152] A. Mullard, "Merck & Co. drops osteoporosis drug odanacatib," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 15, no. 10, pp. 669–669, 2016.

[153] X. H. F. Zhang, Q. Wang, W. Gerald, C. A. Hudis, L. Norton, M. Smid, J. A. Foekens, and J. Massagué, "Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent Survival Signals," *Cancer Cell*, vol. 16, no. 1, pp. 67–78, 2009.

[154] R. Heusschen, J. Muller, M. Binsfeld, C. Marty, E. Plougonven, S. Dubois, N. Mahli, K. Moermans, G. Carmeliet, A. Leonard, F. Baron, Y. Beguin, E. Menu, M. Cohen-Solal, and J. Caers, "SRC kinase inhibition with saracatinib limits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma," *Oncotarget*, vol. 7, no. 21, pp. 30712–30729, 2016.

[155] A. F. Schott, W. E. Barlow, C. H. Van Poznak, D. F. Hayes, C. M. Moinpour, D. L. Lew, P. A. Dy, E. T. Keller, J. M. Keller, and G. N. Hortobagyi, "Phase II studies of two different schedules of dasatinib in bone metastasis predominant metastatic breast cancer: SWOG S0622," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 159, no. 1, pp. 87–95, 2016.

[156] Z. Mitri, R. Nanda, K. Blackwell, C. M. Costelloe, I. Hood, C. Wei, A. M. Brewster, N. K. Ibrahim, K. B. Koenig, G. N. Hortobagyi, C. Van Poznak, M. F. Rimawi, and S. Moulder-Thompson, "TBCRC-010: Phase I/II study of dasatinib in combination with zoledronic acid for the treatment of breast cancer bone metastasis," *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 23, pp. 5706–5712, 2016.

[157] M. Katoh and M. Katoh, "Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases (Review)," *Int. J. Mol. Med.*, pp. 587–606, 2017.

[158] M. Fulciniti, P. Tassone, T. Hideshima, S. Vallet, P. Nanjappa, S. A. Ettenberg, Z. Shen, N. Patel, Y. T. Tai, D. Chauhan, C. Mitsiades, R. Prabhala, N. Raje, K. C. Anderson, D. R. Stover, and N. C. Munshi, "Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma," *Blood*, vol. 114, no. 2, pp. 371–379, 2009.

[159] M. R. McClung, A. Grauer, S. Boonen, M. A. Bolognese, J. P. Brown, A. Diez-Perez, B. L. Langdahl, J.-Y. Reginster, J. R. Zanchetta, S. M. Wasserman, L. Katz, J. Maddox, Y.-C. Yang, C. Libanati, and H. G. Bone, "Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density," *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, no. 5, pp. 412–420, 2014.

[160] S. Lonial, B. Durie, a Palumbo, and J. S. Miguel, "Monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma: Current status and future perspectives," *Leukemia*, vol. 30, no. August, pp. 1–10, 2015.

[161] J. Mateo, J. Berlin, J. S. De Bono, R. B. Cohen, V. Keedy, G. Mugundu, L. Zhang, A. Abbattista, C. Davis, C. Gallo Stampino, and H. Borghaei, "A first-in-human study of the anti-α5β1 integrin monoclonal antibody PF-04605412 administered intravenously to patients with advanced solid tumors," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 74, no. 5, pp. 1039–1046, 2014.

[162] G. W. Prager and M. Poettler, "Angiogenesis in cancer*: Basic mechanisms and therapeutic advances," *Hamostaseologie*, vol. 32, no. 2, pp. 105–114, 2012.

[163] J. Massagué, "TGFβ in Cancer," *Cell*, vol. 134, no. 2, pp. 215–230, 2008.

[164] J. Xu, S. Acharya, O. Sahin, Q. Zhang, Y. Saito, J. Yao, H. Wang, P. Li, L. Zhang, F. J. Lowery, W. L. Kuo, Y. Xiao, J. Ensor, A. A. Sahin, X. H. F. Zhang, M. C. Hung, J. D. Zhang, and D. Yu, "14-3-3?? Turns TGF-β's Function from Tumor Suppressor to Metastasis Promoter in Breast Cancer by Contextual Changes of Smad Partners from p53 to Gli2," *Cancer Cell*, vol. 27, no. 2, pp. 177–192, 2015.

[165] M. Seeger, G. Tear, D. Ferres-Marco, and C. S. Goodman, "Mutations affecting growth cone guidance in drosophila: Genes necessary for guidance toward or away from the midline," *Neuron*, vol. 10, no. 3, pp. 409–426, 1993.

[166] A. Chédotal, "Slits and their receptors - axon growth and guidance," *Adv. Exp. Med. Biol.*, no. 621, pp. 65–80, 2007.

[167] C. Morlot, N. M. Thielens, R. B. G. Ravelli, W. Hemrika, R. A. Romijn, P. Gros, S. Cusack, and A. a McCarthy, "Structural insights into the Slit-Robo complex," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 104, no. 38, pp. 14923–8, 2007.

[168] T. Kidd, K. S. Bland, and C. S. Goodman, "Slit Is the Midline Repellent for the Robo Receptor in Drosophila," *Cell*, vol. 96, no. 6, pp. 785–794, 1999.

[169] C. Morlot, N. M. Thielens, R. B. G. Ravelli, W. Hemrika, R. A. Romijn, P. Gros, S. Cusack, and A. a McCarthy, "Structural insights into the Slit-Robo complex," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 104, no. 38, pp. 14923–8, 2007.

[170] L. Huminiecki, M. Gorn, S. Suchting, R. Poulsom, and R. 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.

[171] W. Zheng, A. Q. Geng, P. F. Li, Y. Wang, and X. B. Yuan, "Robo4 regulates the radial migration of newborn neurons in developing neocortex," *Cereb. Cortex*, vol. 22, no. 11, pp. 2587–2601, 2012.

[172] J. H. Park, H. J. Pak, T. R. Riew, Y. J. Shin, and M. Y. Lee, "Increased expression of Slit2 and its receptors Robo1 and Robo4 in reactive astrocytes of the rat hippocampus after transient forebrain ischemia," *Brain Res.*, vol. 1634, pp. 45–56, 2016.

[173] H. E. Brown, M. C. Reichert, and T. A. Evans, "Slit Binding via the Ig1 Domain Is Essential for Midline Repulsion by *Drosophila* Robo1 but Dispensable for Receptor Expression, Localization, and Regulation *in Vivo*," *G3: Genes|Genomes|Genetics*, vol. 5, no. 11, pp. 2429–2439, 2015.

[174] R. Barak, R. Lahmi, L. Gevorkyan-Airapetov, E. Levy, A. Tzur, and Y. Opatowsky, "Crystal structure of the extracellular juxtamembrane region of Robo1," *J. Struct. Biol.*, vol. 186, no. 2, pp. 283–291, 2014.

[175] K. Brose, K. S. Bland, K. H. Wang, D. Arnott, W. Henzel, C. S. Goodman, M. Tessier-Lavigne, and T. Kidd, "Slit Proteins Bind Robo Receptors and Have an Evolutionarily Conserved Role in Repulsive Axon Guidance," *Cell*, vol. 96, no. 6, pp. 795–806, 1999.

[176] P. Zelina, H. Blockus, Y. Zagar, A. Péres, F. Friocourt, Z. Wu, N. Rama, C. Fouquet, E. Hohenester, M. Tessier-Lavigne, J. Schweitzer, H. R. Crollius, and A. Chédotal, "Signaling switch of the axon guidance receptor Robo3 during vertebrate evolution," *Neuron*, vol. 84, no. 6, pp. 1258–1272, 2014.

[177] J. Lee and C. Chien, "When sugars guide axons: insights from heparan sulphate proteoglycan mutants," *Nat Rev Genet*, vol. 5, no. 12, pp. 923–935, 2004.

[178] N. Fukuhara, J. A. Howitt, S. A. Hussain, and E. Hohenester, "Structural and functional analysis of slit and heparin binding to immunoglobulin-like domains 1 and 2 of Drosophila robo," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 23, pp. 16226–16234, 2008.

[179] F. Zhang, H. A. Moniz, B. Walcott, K. W. Moremen, R. J. Linhardt, and L. Wang, "Characterization of the interaction between Robo1 and heparin and other glycosaminoglycans," *Biochimie*, vol. 95, no. 12, pp. 2345–2353, 2013.

[180] H. Hu, "Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein.," *Nat. Neurosci.*, vol. 4, no. 7, pp. 695–701, 2001.

[181] L. Zakrys, R. J. Ward, J. D. Pediani, A. G. Godin, G. J. Graham, and G. Milligan, "Roundabout 1 exists predominantly as a basal dimeric complex and this is unaffected by binding of the ligand Slit2.," *Biochem. J.*, vol. 461, no. 1, pp. 61–73, 2014.

[182] E. Stein, "Hierarchical Organization of Guidance Receptors: Silencing of Netrin Attraction by Slit Through a Robo/DCC Receptor Complex," *Science (80-.).*, vol. 291, no. 5510, pp. 1928–1938, 2001.

[183] T. A. Evans, C. Santiago, E. Arbeille, and G. J. Bashaw, "Robo2 acts in trans to inhibit slit-robo1 repulsion in pre-crossing commissural axons," *Elife*, vol. 4, no. JULY 2015, pp. 1–26, 2015.

[184] K. W. Park, C. M. Morrison, L. K. Sorensen, C. A. Jones, Y. Rao, C. Bin Chien, J. Y. Wu, L. D. Urness, and D. Y. Li, "Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration," *Dev. Biol.*, vol. 261, no. 1, pp. 251–267, 2003.

[185] S. Suchting, "Soluble Robo4 receptor inhibits in vivo angiogenesis and endothelial cell migration," *FASEB J.*, vol. 17, no. 3, pp. 1–18, 2004.

[186] C. A. Jones, N. R. London, H. Chen, K. W. Park, D. Sauvaget, R. A. Stockton, J. D. Wythe, W. Suh, F. Larrieu-Lahargue, Y. Mukouyama, P. Lindblom, P. Seth, A. Frias, N. Nishiya, M. H. Ginsberg, H. Gerhardt, K. Zhang, and D. Y. Li, "Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 4, pp. 448–453, 2008.

[187] N. Rama, A. Dubrac, T. Mathivet, R.-A. Ní Chárthaigh, G. Genet, B. Cristofaro, L. Pibouin-Fragner, L. Ma, A. Eichmann, and A. Chédotal, "Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization," *Nat. Med.*, vol. 21, no. 5, pp. 483–491, 2015.

[188] H. Sheldon, M. Andre, J. a Legg, P. Heal, J. M. Herbert, R. Sainson, A. S. Sharma, J. K. Kitajewski, V. L. Heath, and R. Bicknell, "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.

[189] C. Y. Chen, C. H. Tsai, C. Y. Chen, Y. H. Wu, and C. P. Chen, "Human placental multipotent mesenchymal stromal cells modulate placenta angiogenesis through Slit2-Robo signaling," *Cell Adhes. Migr.*, vol. 10, no. 1–2, pp. 66–76, 2016.

[190] A. W. Koch, T. Mathivet, B. Larrivée, R. K. Tong, J. Kowalski, L. Pibouin-Fragner, K. Bouvrée, S. Stawicki, K. Nicholes, N. Rathore, S. J. Scales, E. Luis, R. del Toro, C. Freitas, C. Bréant, A. Michaud, P. Corvol, J. L. Thomas, Y. Wu, F. Peale, R. J. Watts, M. Tessier-Lavigne, A. Bagri, and A. Eichmann, "Robo4 Maintains Vessel Integrity and Inhibits Angiogenesis by Interacting with UNC5B," *Dev. Cell*, vol. 20, no. 1, pp. 33–46, 2011.

[191] A. Dallol, E. Forgacs, A. Martinez, Y. Sekido, R. Walker, T. Kishida, P. Rabbitts, E. R. Maher, J. D. Minna, and F. Latif, "Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers," *Oncogene*, pp. 3020–3028, 2002.

[192] A. Dallol, N. Fernandes, D. Silva, P. Viacava, J. D. Minna, I. Bieche, and E. R. Maher, "SLIT2 , a Human Homologue of the Drosophila Slit2 Gene , Has Tumor Suppressor Activity and Is Frequently Inactivated in Lung and Breast Cancers SLIT2 , a Human Homologue of the Drosophila Slit2 Gene , Has Tumor Suppressor," no. 22, pp. 5874–5880, 2002.

[193] R. E. Dickinson, A. Dallol, I. Bieche, D. Krex, D. Morton, E. R. Maher, and F. Latif, "Epigenetic inactivation of SLIT3 and SLIT1 genes in human cancers," *Br. J. Cancer*, vol. 91, no. 12, pp. 2071–2078, 2004.

[194] Y. Okada, N. Funahashi, T. Tanaka, Y. Nishiyama, L. Yuan, K. Shirakura, A. S. Turjman, Y. Kano, H. Naruse, A. Suzuki, M. Sakai, J. Zhixia, K. Kitajima, K. Ishimoto, N. Hino, M. Kondoh, Y. Mukai, S. Nakagawa, G. García-Cardeña, W. C. Aird, and T. Doi, "Endothelial cell-specific expression of roundabout 4 is regulated by differential DNA methylation of the proximal promoter," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 34, no. 7, pp. 1531–1538, 2014.

[195] E. M. Small, L. B. Sutherland, K. N. Rajagopalan, S. Wang, and E. N. Olson, "Microrna-218 regulates vascular patterning by modulation of slit-robo signaling," *Circ. Res.*, vol. 107, no. 11, pp. 1336–1344, 2010.

[196] J. E. Fish, J. D. Wythe, T. Xiao, B. G. Bruneau, D. Y. R. Stainier, D. Srivastava, and S. Woo, "A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish," *Development*, vol. 138, no. 7, pp. 1409–1419, 2011.

[197] M. Yang, R. Liu, X. Li, J. Liao, Y. Pu, E. Pan, Y. Wang, and L. Yin, "Epigenetic repression of miR-218 promotes esophageal carcinogenesis by targeting ROBO1," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 11, pp. 27781–27795, 2015.

[198] B. Liu, Y. Tian, F. Li, Z. Zhao, X. Jiang, C. Zhai, X. Han, and L. Zhang, "Tumor-suppressing roles of miR-214 and miR-218 in breast cancer," *Oncol. Rep.*, vol. 35, no. 6, pp. 3178–3184, 2016.

[199] Z. Xiangyuan, D. Jiaqiang, H. Yan, Z. Ming, L. Zhen, W. Na, J. Mingzuo, Z. Zhe, L. Gang, L. Haiming, N. Yongzhan, F. Daiming, and T. Jun, "miR-218 inhibited tumor angiogenesis by targeting ROBO1 in gastric cancer," *Gene*, vol. 615, pp. 42–49, 2017.

[200] H. Yu, G. Gao, L. Jiang, L. Guo, M. Lin, X. Jiao, W. Jia, and J. Huang, "Decreased expression of miR-218 is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 6, no. 12, pp. 2904–2911, 2013.

[201] Y. Zhang and S. Zhou, "MicroRNA-29a inhibits mesenchymal stem cell viability and proliferation by targeting Roundabout 1," *Mol. Med. Rep.*, vol. 12, no. 4, pp. 6178–6184, 2015.

[202] H. Li, J. Luo, B. Xu, K. Luo, and J. Hou, "MicroRNA-29a inhibits cell migration and invasion by targeting Roundabout 1 in breast cancer cells," *Mol. Med. Rep.*, vol. 12, no. 2, pp. 3121–3126, 2015.

[203] Y. Okada, K. Yano, E. Jin, N. Funahashi, M. Kitayama, T. Doi, K. Spokes, D. L. Beeler, S. C. Shih, H. Okada, T. A. Danilov, E. Maynard, T. Minami, P. Oettgen, and W. C. Aird, "A three-kilobase fragment of the human Robo4 promoter directs cell type-specific expression in endothelium," *Circ. Res.*, vol. 100, no. 12, pp. 1712–1722, 2007.

[204] Y. Okada, H. Naruse, T. Tanaka, N. Funahashi, E. R. Regan, K. Yamakawa, N. Hino, K. Ishimoto, T. Doi, and W. C. Aird, "Expression of the Robo4 receptor in endothelial cells is regulated by two AP-1 protein complexes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 467, no. 4, pp. 987–991, 2015.

[205] T. Tanaka, N. Maekawa, T. Kashio, K. Izawa, R. Ishiba, K. Shirakura, K. Ishimoto, N. Hino, W. C. Aird, T. Doi, and Y. Okada, "Tumor Necrosis Factor α Induces the Expression of the Endothelial Cell- Specific Receptor Roundabout4 through the Nuclear Factor- κ B Pathway," vol. 40, no. 4, pp. 504–509, 2017.

[206] K. Clark, E. Hammond, and P. Rabbitts, "Temporal and spatial expression of two isoforms of the Dutt1/Robo1 gene in mouse development," *FEBS Lett.*, vol. 523, no. 1–3, pp. 12–16, 2002.

[207] Y. Yue, B. Grossmann, D. Galetzka, U. Zechner, and T. 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.

[208] A. Ruedel, M. Schott, T. Schubert, and A. K. Bosserhoff, "Robo3A and Robo3B expression is regulated via alternative promoters and mRNA stability.," *Cancer Cell Int.*, vol. 16, p. 71, 2016.

[209] H. F. Nural, W. Todd Farmer, and G. S. Mastick, "The Slit receptor Robo1 is predominantly expressed via the Dutt1 alternative promoter in pioneer neurons in the embryonic mouse brain and spinal cord," *Gene Expr. Patterns*, vol. 7, no. 8, pp. 837–845, 2007.

[210] M. Seki, A. Watanabe, S. Enomoto, T. Kawamura, H. Ito, T. Kodama, T. Hamakubo, and H. Aburatani, "Human ROBO1 is cleaved by metalloproteinases and γ-secretase and migrates to the nucleus in cancer cells," *FEBS Lett.*, vol. 584, no. 13, pp. 2909–2915, 2010.

[211] F. Zhang, C. Prahst, T. Mathivet, L. Pibouin-Fragner, J. Zhang, G. Genet, R. Tong, A. Dubrac, and A. Eichmann, "The Robo4 cytoplasmic domain is dispensable for vascular permeability and neovascularization," *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 13517, 2016.

[212] C. Delloye-Bourgeois, A. Jacquier, C. Charoy, F. Reynaud, H. Nawabi, K. Thoinet, K. Kindbeiter, Y. Yoshida, Y. Zagar, Y. Kong, Y. E. Jones, J. Falk, A. Chédotal, and V. Castellani, "PlexinA1 is a new Slit receptor and mediates axon guidance function of Slit C-terminal fragments.," *Nat. Neurosci.*, vol. 18, no. 1, pp. 36–45, 2015.

[213] J. Dudek, S. Pfeffer, P.-H. Lee, M. Jung, A. Cavalié, V. Helms, F. Förster, and R. Zimmermann, "Protein Transport into the Human Endoplasmic Reticulum," *J. Mol. Biol.*, vol. 427, no. 6, pp. 1159–1175, 2015.

[214] X. Yin, M. Bern, Q. Xing, J. Ho, R. Viner, and M. Mayr, "Glycoproteomic analysis of the secretome of human endothelial cells.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 12, no. 4, pp. 956–78, 2013.

[215] J. Yuasa-Kawada, M. Kinoshita-Kawada, G. Wu, Y. Rao, and J. Y. Wu, "Midline crossing and Slit responsiveness of commissural axons require USP33," *Nat. Neurosci.*, vol. 12, no. 9, pp. 1087–1089, 2009.

[216] P. Wen, R. Kong, J. Liu, L. Zhu, X. Chen, X. Li, Y. Nie, K. Wu, and J. Y. Wu, "USP33, a new player in lung cancer, mediates Slit-Robo signaling," *Protein Cell*, vol. 5, no. 9, pp. 704–713, 2014.

[217] J. Yuasa-Kawada, M. Kinoshita-Kawada, Y. Rao, and J. 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. 14530–5, 2009.

[218] Z. Huang, P. Wen, R. Kong, H. Cheng, B. Zhang, C. Quan, Z. Bian, M. Chen, Z. Zhang, X. Chen, X. Du, J. Liu, L. Zhu, K. Fushimi, D. Hua, and J. Y. Wu, "USP33 mediates Slit-Robo signaling in inhibiting colorectal cancer cell migration," *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 8, pp. 1792–1802, 2015.

[219] L. Luo, "Actin Cytoskeleton Regulation in Neuronal Morphogenesis and Structural Plasticity," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 18, no. 1, pp. 601–635, 2002.

[220] J. L. Fritz and M. F. a. VanBerkum, "Regulation of Rho Family GTPases Is Required to Prevent Axons from Crossing the Midline," *Dev. Biol.*, vol. 252, no. 1, pp. 46–58, 2002.

[221] K. Wong, X. R. Ren, Y. Z. Huang, Y. Xie, G. Liu, H. Saito, H. Tang, L. Wen, S. M. Brady-Kalnay, L. Mei, J. Y. Wu, W. C. Xiong, and Y. Rao, "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.

[222] Y. Yang, M. Marcello, V. Endris, R. Saffrich, R. Fischer, M. F. Trendelenburg, R. Sprengel, and G. Rappold, "MEGAP impedes cell migration via regulating actin and microtubule dynamics and focal complex formation," *Exp. Cell Res.*, vol. 312, no. 12, pp. 2379–2393, 2006.

[223] S. Guerrier, J. Coutinho-Budd, T. Sassa, A. Gresset, N. V. Jordan, K. Chen, W. L. Jin, A. Frost, and F. Polleux, "The F-BAR Domain of srGAP2 Induces Membrane Protrusions Required for Neuronal Migration and Morphogenesis," *Cell*, vol. 138, no. 5, pp. 990–1004, 2009.

[224] H. Hu, M. Li, J.-P. Labrador, J. McEwen, E. C. Lai, C. S. Goodman, and G. J. Bashaw, "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.

[225] L. Yang and G. J. Bashaw, "Son of Sevenless Directly Links the Robo Receptor to Rac Activation to Control Axon Repulsion at the Midline," *Neuron*, vol. 52, no. 4, pp. 595–607, 2006.

[226] 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. 703–15, 2000.

[227] W.-X. Liao, L. C. Laurent, S. Agent, J. Hodges, and D.-B. Chen, "Human placental expression of SLIT/ROBO signaling cues: effects of preeclampsia and hypoxia.," *Biol. Reprod.*, vol. 86, no. 4, p. 111, 2012.

[228] S. Kaur, M. D. Castellone, V. M. Bedell, M. Konar, J. S. Gutkind, and R. Ramchandran, "Robo4 signaling in endothelial cells implies attraction guidance mechanisms," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 16, pp. 11347–11356, 2006.

[229] S. Kaur, G. V Samant, K. Pramanik, P. W. Loscombe, M. L. Pendrak, D. D. Roberts, and R. Ramchandran, "Silencing of directional migration in roundabout4 knockdown endothelial cells.," *BMC Cell Biol.*, vol. 9, no. 1, p. 61, 2008.

[230] M. Abdelsaid, M. Coucha, S. Hafez, A. Yasir, M. H. Johnson, and A. Ergul, "Enhanced VEGF signalling mediates cerebral neovascularisation via downregulation of guidance protein ROBO4 in a rat model of diabetes," *Diabetologia*, vol. 60, no. 4, pp. 740–750, 2017.

[231] C. A. Jones, N. Nishiya, N. R. London, W. Zhu, L. K. Sorensen, A. C. Chan, C. J. Lim, H. Chen, Q. Zhang, P. G. Schultz, A. M. Hayallah, K. R. Thomas, M. Famulok, K. Zhang, M. H. Ginsberg, and D. Y. Li, "Slit2-Robo4 signalling promotes vascular stability by blocking Arf6 activity.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 11, pp. 1325–31, 2009.

[232] S. Enomoto, K. Mitsui, T. Kawamura, H. Iwanari, K. Daigo, K. Horiuchi, T. Minami, T. Kodama, and T. Hamakubo, "Suppression of Slit2/Robo1 mediated HUVEC migration by Robo4," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 469, no. 4, pp. 797–802, 2016.

[233] J. Yu, X. Zhang, P. M. Kuzontkoski, S. Jiang, W. Zhu, D. Y. Li, and J. E. Groopman, "Slit2N and Robo4 regulate lymphangiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 pathway," *Cell Commun. Signal.*, vol. 12, no. 1, p. 25, 2014.

[234] R. Bhattacharya, N. Mukherjee, H. Dasgupta, M. S. Islam, N. Alam, A. Roy, P. Das, S. Roychoudhury, and C. K. Panda, "Frequent alterations of SLIT2-ROBO1-CDC42 signalling pathway in breast cancer: clinicopathological correlation," *J. Genet.*, vol. 95, no. 3, pp. 551–563, 2016.

[235] R. Marlow, P. Strickland, S. L. Ji, X. Wu, M. PeBenito, M. Binnewies, E. K. Le, A. Moran, H. Macias, R. D. Cardiff, S. Sukumar, and L. Hinck, "SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 19, pp. 7819–7827, 2008.

[236] F. Qin, H. Zhang, L. Ma, X. Liu, K. Dai, W. Li, F. Gu, L. Fu, and Y. Ma, "Low Expression of Slit2 and Robo1 is Associated with Poor Prognosis and Brain-specific Metastasis of Breast Cancer Patients," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 14430, 2015.

[237] M. Yuan, H. Guo, J. Li, C. Sui, Y. Qin, J. Wang, yasir hayat Khan, L. Ye, F. Xie, H. Wang, L. Yuan, and J. Ye, "Slit2 and Robo1 induce opposing effects on metastasis of hepatocellular carcinoma Sk-hep-1 cells," *Int. J. Oncol.*, vol. 49, no. 1, pp. 305–315, 2016.

[238] A. Latil, L. Chêne, B. Cochant-Priollet, P. Mangin, G. Fournier, P. Berthon, and O. Cussenot, "Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors," *Int. J. Cancer*, vol. 103, no. 3, pp. 306–315, 2003.

[239] J. Gröne, O. Doebler, C. Loddenkemper, B. Hotz, H. J. Buhr, and S. Bhargava, "Robo1/Robo4: Differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer," *Oncol. Rep.*, vol. 15, no. 6, pp. 1437–1443, 2006.

[240] L. Liu, W. Li, S. Geng, Y. Fang, Z. Sun, H. Hu, Z. Liang, and Z. Yan, "Slit2 and Robo1 expression as biomarkers for assessing prognosis in brain glioma patients," *Surg. Oncol.*, vol. 25, no. 4, pp. 405–410, 2016.

[241] Y. Li, H. Cheng, W. Xu, X. Tian, X. Li, and C. Zhu, "Expression of Robo protein in bladder cancer tissues and its effect on the growth of cancer cells by blocking Robo protein," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 8, no. 9, pp. 9932–9940, 2015.

[242] H. K. Kim, H. Zhang, H. Li, T.-T. Wu, S. Swisher, D. He, L. Wu, J. Xu, C. A. Elmets, M. Athar, X. Xu, and H. Xu, "Slit2 inhibits growth and metastasis of fibrosarcoma and squamous cell carcinoma.," *Neoplasia*, vol. 10, no. 12, pp. 1411–20, 2008.

[243] R. C. Tseng, S. H. Lee, H. S. Hsu, B. H. Chen, W. C. Tsai, C. Tzao, and Y. C. Wang, "SLIT2 attenuation during lung cancer progression deregulates β-catenin and E-cadherin and associates with poor prognosis," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 2, pp. 543–551, 2010.

[244] A. Prasad, V. Paruchuri, A. Preet, F. Latif, and R. K. Ganju, "Slit-2 induces a tumor-suppressive effect by regulating β-catenin in breast cancer cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 39, pp. 26624–26633, 2008.

[245] W.-J. Zhou, Z. H. Geng, S. Chi, W. Zhang, X.-F. Niu, S.-J. Lan, L. Ma, X. Yang, L.-J. Wang, Y.-Q. Ding, and J.-G. Geng, "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.

[246] Y. Feng, L. Feng, D. Yu, J. Zou, and Z. Huang, "srGAP1 mediates the migration inhibition effect of Slit2-Robo1 in colorectal cancer," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 35, no. 1, p. 191, 2016.

[247] Y. Feng, L. Feng, D. Yu, J. Zou, and Z. Huang, "srGAP1 mediates the migration inhibition effect of Slit2-Robo1 in colorectal cancer," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 35, no. 1, p. 191, 2016.

[248] T. A. Marko, G. A. Shamsan, E. N. Edwards, P. E. Hazelton, S. K. Rathe, I. Cornax, P. R. Overn, J. Varshney, B. J. Diessner, B. S. Moriarity, M. G. O'Sullivan, D. J. Odde, D. A. Largaespada, M. G. O'Sullivan, D. J. Odde, and D. A. Largaespada, "Slit-Robo GTPase-Activating Protein 2 as a metastasis suppressor in osteosarcoma.," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. December, p. 39059, 2016.

[249] R. Kong, F. Yi, P. Wen, J. Liu, X. Chen, J. Ren, X. Li, Y. Shang, Y. Nie, K. Wu, D. Fan, L. Zhu, W. Feng, and J. Y. Wu, "Myo9b is a key player in SLIT / ROBO-mediated lung tumor suppression," *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 12, pp. 1–14, 2015.

[250] A. Prasad, A. Z. Fernandis, Y. Rao, and R. 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.

[251] H. Cai, W. Liu, Y. Xue, X. Shang, J. Liu, Z. Li, P. Wang, L. Liu, Y. Hu, and Y. Liu, "Roundabout 4 Regulates Blood-Tumor Barrier Permeability Through the Modulation of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 Expression.," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 74, no. 1, pp. 25–37, 2015.

[252] H. Zhao, D. K. Ahirwar, S. Oghumu, T. Wilkie, C. A. Powell, M. W. Nasser, A. R. Satoskar, D. Y. Li, and R. K. Ganju, "Endothelial Robo4 suppresses breast cancer growth and metastasis through regulation of tumor angiogenesis," *Mol. Oncol.*, vol. 10, no. 2, pp. 272–281, 2016.

[253] H. Cai, Y. Xue, Z. Li, Y. Hu, Z. Wang, W. Liu, Z. Li, and Y. Liu, "Roundabout4 suppresses glioma-induced endothelial cell proliferation, migration and tube formation in vitro by inhibiting VEGR2-mediated PI3K/AKT and FAK signaling pathways," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 35, no. 5, pp. 1689–1705, 2015.

[254] B. Wang, Y. Xiao, B. B. Ding, N. Zhang, X. Bin Yuan, L. Gui, K. X. Qian, S. Duan, Z. Chen, Y. Rao, and J. G. Geng, "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.

[255] G. C. Galtier N, Gouy M, "SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny.," *Comput Appl Biosci.*, vol. 6, no. Dec, pp. 543–8, 1996.

[256] H. Blockus and A. Chédotal, "Slit-Robo signaling," *Development*, vol. 143, no. 17, pp. 3037–3044, 2016.

[257] M. Lelekakis, J. M. Moseley, T. J. Martin, D. Hards, E. Williams, P. Ho, D. Lowen, J. Javni, F. R. Miller, J. Slavin, and R. L. Anderson, "A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone.," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 17, no. 2, pp. 163–70, 1999.

[258] K. Tao, M. Fang, J. Alroy, and G. G. Sahagian, "Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer," *BMC Cancer*, vol. 8, no. 1, p. 228, Jan. 2008.

[259] C. A. Jones, N. R. London, H. Chen, K. W. Park, D. Sauvaget, R. A. Stockton, J. D. Wythe, W. Suh, F. Larrieu-Lahargue, Y. Mukouyama, P. Lindblom, P. Seth, A. Frias, N. Nishiya, M. H. Ginsberg, H. Gerhardt, K. Zhang, and D. Y. Li, "Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 4, pp. 448–453, 2008.

[260] I. Nilsson, P. Lara, T. Hessa, A. E. Johnson, G. Von Heijne, and A. L. Karamyshev, "The code for directing proteins for translocation across ER membrane: SRP cotranslationally recognizes specific features of a signal sequence," *J. Mol. Biol.*, vol. 427, no. 6, pp. 1191–1201, 2015.

[261] K. Yan, "N-Linked Glycosylation Is Critical for the Plasma Membrane Localization of Nephrin," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 13, no. 5, pp. 1385–1389, 2002.

[262] S. Naito, T. Aoyama, and K. Kamata, "Nephrin signal peptide sequence cDNA in expression vector determines antibody characteristics reacting on native or glycosylation-disturbed nephrin protein in genetic immunization," *Kitasato Med J*, vol. 41, no. January 2010, pp. 31–41, 2011.

[263] H. Joun, B. Lanske, M. Karperien, F. Qian, L. Defize, and A. Abou-Samra, "Tissue-specific transcription start sites and alternative splicing of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor gene: A new PTH/PTHrP receptor splice variant that lacks the signal peptide," *Endocrinology*, vol. 138, no. 4, pp. 1742–1749, 1997.

[264] W. Nickel and M. Seedorf, "Unconventional Mechanisms of Protein Transport to the Cell Surface of Eukaryotic Cells," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 24, no. 1, pp. 287–308, 2008.

[265] B. D. Berkovits and C. Mayr, "Alternative 3′ UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization," *Nature*, vol. 522, no. 7556, pp. 363–367, 2015.

[266] S. S. Pinho and C. A. Reis, "Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 15, no. 9, pp. 540–555, 2015.

[267] C. Mayr, "Evolution and Biological Roles of Alternative 3'UTRs," *Trends Cell Biol.*, vol. 26, no. 3, pp. 227–237, 2016.

[268] P. Seth, Y. Lin, J. I. Hanai, V. Shivalingappa, M. P. Duyao, and V. P. Sukhatme, "Magic roundabout, a tumor endothelial marker: Expression and signaling," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 332, no. 2, pp. 533–541, 2005.

[269] J. M. Feduska, P. L. Garcia, S. B. Brennan, S. Bu, L. N. Council, and K. J. Yoon, "N-glycosylation of ICAM-2 is required for ICAM-2-mediated complete suppression of metastatic potential of SK-N-AS neuroblastoma cells," *BMC Cancer*, vol. 13, no. 1, p. 261, 2013.