



Thèse de Doctorat

Camille JACQUES

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Nantes sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : Biologie-Santé de Nantes Discipline : Biologie Cellulaire Spécialité : Cancérologie Unité de recherche : UMR957 Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives (LPRO)

Soutenue le : 3 Novembre 2016

Mécanismes Epigénétiques associés à la Progression et à la Chimiorésistance des Sarcomes Osseux

Rapporteurs :	Natacha ENTZ-WERLE, PU-PH, MD, PhD, CHRU Hautepierre UdS, STRASBOURG
	Fernando LECANDA, PU, PhD, Center for Applied Medical Research (CIMA), Université de Navarre, PAMPELONNE, ESPAGNE
Examinateurs :	Franck TIRODE, DR, PhD, Centre Léon Bérard Cheney A, LYON
	Pierre-François CARTRON, CR, PhD, LaBCT ICO, Site René Gauducheau, SAINT HERBLAIN
Directeur de Thèse :	Dominique HEYMANN, PU-PH, PhD, Department of Oncology and Metabolism, Université de Sheffield, ROYAUME-UNI
Co-directeur de Thèse :	Benjamin ORY, MCU, PhD, Faculté de Médecine, Université de Nantes, NANTES
Président du jury:	Franck Tirode, DR, PhD, Centre Léon, Bérard Cheney, A. LYON

JURY

Table des Matières

Liste des Abbréviations	5
Remerciements	11
INTRODUCTION GENERALE	15
I. L'EPIGENETIQUE	16
I.1. L'épigénétique ou l'hérédité au-delà de l'ADN : Historique et concept :	17
I.2. Chromatine et histones, cibles des mécanismes épigénétiques :	20
I.3. L'épigénétique : une seule notion pour différents mécanismes :	22
I.3.1. La méthylation de l'ADN (1) :	22
I.3.2. Les modifications post-traductionnelles des histones (2) :	24
I.3.2.a. La méthylation des histones :	25
I.3.2.b. L'acétylation des histones :	
I.3.2.c. Les modifications post-traductionnelles des histones et leurs interactions : facteur de comple	exité du
code épigénétique :	27
I.3.3. Les enzymes « lectrices » des modifications post-traductionnelles des histones (3) :	28
I.3.3.a. Les protéines à Bromodomaines :	28
I.3.3.b. Les protéines à BET Bromodomaines :	30
Genèse, structure et fonctions des protéines à BET Bromodomaines :	30
Protéines à BET Bromodomaines et pathologies :	
I.3.4. L'ARN interférence (4) :	
I.3.4.a. Les ARNs non-codants :	
I.3.4.b. Historique de l'ARN interférence :	
I.3.4.c. Les microARNs :	
Généralités sur les microARNs ; fonctions, historique et composante génétique :	37
Biogénèse des microARNs :	39

II. LE TISSU OSSEUX	
II.1. L'os : des fonctions protectrices, mécaniques et métaboliques :	
II.2. Structure et composition de l'os :	
II.3. Organisation macroscopique de l'os :	
II.4. Genèse, classification et organisation structurale de l'os lamellaire :	
II.5. Composante cellulaire de l'os lamellaire :	
II.5.1. Ostéoblastes, cellules bordantes, ostéocytes et apposition osseuse :	
II.5.2. Ostéoclastes et résorption osseuse :	51
II.6. Le remodelage osseux :	53
II.6.1. Les étapes du remodelage osseux :	53
II.6.2. Le contrôle du remodelage osseux :	55

III. LES SARCOMES OSSEUX	57
III.1. Caractérisation des Sarcomes Osseux :	58
III.1.1. Epidémiologie des Sarcomes Osseux :	58
III.1.2. Anatomie et localisation des Sarcomes Osseux :	59
III.1.3. Symptômes et diagnostic des Sarcomes Osseux :	59
III.1.4. Prise en charge thérapeutique des Sarcomes Osseux :	60
III.2. L'Ostéosarcome :	61

III.2.1. Etiologie de l'Ostéosarcome :	61
III.2.2. Caractérisation clinique et histologique de l'Ostéosarcome :	61
III.2.3. Génétique de l'Ostéosarcome :	65
III.2.4. Prise en charge thérapeutique de l'Ostéosarcome :	66
III.3. Le Sarcome d'Ewing :	69
III.3.1. Caractéristiques histologiques du Sarcome d'Ewing :	69
III.3.2. Origines du Sarcome d'Ewing :	71
III.3.3. Génétique du Sarcome d'Ewing :	71
III.3.3.a. Translocations chromosomiques et Sarcome d'Ewing :	71
III.3.3.b. EWS-Fli1, l'oncogène caractéristique du Sarcome d'Ewing :	75
Dépendance du Sarcome d'Ewing vis-à-vis d'EWS-Fli1 et ses variants :	75
Organisation structurale et fonctions biologiques des gènes EWSR1 et Fli1:	76
Gènes-cibles et implications fonctionnelles du facteur de transcription EWS-Fli1 :	
III.3.4. Prise en charge thérapeutique du Sarcome d'Ewing :	

IV. LA FAMILLE DE TP53	80
IV.1. Mutations et implications biologiques des gènes de la famille de TP53 :	81
IV.2. Structure des protéines de la famille de TP53 : facteur de complexité de leurs effets biologiq	ues: 82

OBJECTIFS PRINCIPAUX DE LA THESE

RESULTATS	88
PARTIE I : IMPACT DE L'INHIBITION DES PROTEINES A BET BROMODOMAINES DANS LE DEVELOPPEMENT	
TUMORAL DES SARCOMES OSSEUX :	89
I.1. INTRODUCTION : PROTEINES A BET BROMODOMAINES ET OSTEOSARCOME :	90
I.1.1. Introduction à l'Article 1 :	91
Préambule :	93
I.1.2. Présentation de l'Article 1 :	95
I.1.3. Article 1 : « Selective inhibition of BET Bromodomain epigenetic signaling interferes with the bone	е-
associated tumour vicious cycle » Nat Commun. 2014 Mar 19	99
I.1.4. Complément de discussion à l'Article 1 :	100

I.2. PROTEINES A BET BROMODOMAINES ET SARCOME D'EWING :	102
I.2.1. Introduction à l'Article 2 :	103
I.2.2. Article 2 : « Targeting the epigenetic readers in Ewing Sarcoma inhibits the oncogenic transcri	otion
factor EWS-Fli1 » Oncotarget. 2016 Mar 19	106
I.2.3. Complément de discussion à l'Article 2 :	107

PARTIE II : IMPLICATION DES MICROARNS DANS L'ECHAPPEMENT TUMORAL DES SARCOMES OSSEUX : 111

II.2. LES MICROARNS DANS LA DISSEMINATION METASTATIQUE DE L'OSTEOSARCOME :	. 117
ll.2.1. Implication des miARNs -527 et -665, régulés par les membres de la famille de TP53, ΔNp63 α et	
TAp736, dans la dissémination métastatique des Carcinomes et de l'Ostéosarcome :	118
II.2.1.a. Introduction à l'Article 4 :	. 118
Préambule :	. 120
II.2.1.b. Présentation de l'Article 4 :	. 122
II.2.1.c. Article 4 : « Δ Np63 α silences a miRNA program to aberrantly initiate a wound-healing program that	
promotes TGF-β-induced metastasis » Cancer Research, 2016	. 126
II.2.1.d. Complément de discussion à l'Article 4 :	. 127

II.2.2. Implication des miARNs -198 et -206 dans la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome :	130
II.2.2.a. Introduction à l'Article 5 :	130
II.2.2.b. Article 5: "Loss of miR-198 and -206 during primary tumor progression enables metastatic disseminat	ion in
an Osteosarcoma model" (Article en cours de soumission)	132
II.2.2.c. Complément de discussion à l'Article 5 :	146

B. LES MICROARNS DANS LA CHIMIORESISTANCE DES SARCOMES OSSEUX :	150
II.3.1. Introduction à l'Article 6 :	151
II.3.2. Article 6 : « miRNA-193a-5p repression of p73 controls Cisplatin chemoresistance	e in primary bone
tumors » Oncotarget. 2016 Jul 29	153
II.3.3. Complément de discussion à l'Article 6 :	154

PARTIE III : PERSPECTIVES : IMPLICATION DES MICROARNS DANS LA RESISTANCE DE L'OSTEOSARCOME AUX

INHIBITEURS DE PROTEINES A BET BROMODOMAINES :	159
III.1. Introduction :	160
III.2. Matériel et Méthodes :	161
III.3. Résultats :	165
III.3.1. Etablissement et caractérisation morphologique et fonctionnelle de la lignée MNNG-HOS JQ1R2	0, résistante
à l'inhibiteur de BET Bromodomaines JQ1 :	165
III.3.2. La surexpression de BRD2 et BRD4 par la lignée MNNG-HOS JQ1R20 est en partie à l'origine de	sa résistance
à JQ1 :	170
III.3.3. La lignée MNNG-HOS JQ1R20 présente un profil d'expression de miARNs différent de celui de la	lignée
MNNG-HOS naïve et sous-exprime le miR-26b-5p :	
III.3.4. La sous-expression artificielle du miR-26b-5p dans la lignée MNNG-HOS naïve induit une augme	ntation du
niveau d'expression de BRD2 et BRD4 et augmente sa chimiorésistance à JQ1 :	176
III.3.5. Perspectives : Etablissement d'un modèle murin d'Ostéosarcome résistant à JQ1 :	179
III.4. Discussion & Conclusion :	184

DISCUSSION & CONCLUSION GENERALE	189
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	197

Liste des Abbréviations

<u>A</u>

ABCC1: ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1

ABCC2: ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2 ATP: Adénosine Triphosphate

В

ATF3: Activating Transcription Factor 3

BAH: Bromo Adjacent Homolog

ABCG2: ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ALP: Phosphatase Alcaline (Alkaline Phosphatase)

AMPc: Adénosine Monophosphate cyclique

Ang1: Angiopoietin 1

AP-1: Activator Protein-1

APC/C: Anaphase-Promoting Complex/ Cyclosome

Apo A-1: Apolipoprotéine A-1

AR: Récepteur aux Androgènes (Androgen Receptor)

ARN: Acide Ribonucléique

ARN pol II: ARN polymérase II

ARNi: ARN interférence

ARNm: ARN messager

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

ATAD5: ATPase Family, AAA Domain Containing 5

- - **,** - - - -

β-Cat: β-Caténine

BD: Bromodomaine

bdf1: bromodomain factor 1

BET: Bromodomain and Extra-terminal Domain

BID: Basic Residue-Enriched Interaction Domain

BM-MSC: cellule souche mésenchymateuse de moelle osseuse (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell)

BMP: Bone Morphogenetic Protein

BNIP3: Bcl2/AdenovirusE1B 19kDa Interacting Protein 3

BRCA 1/2: Breast Cancer 1/2

BRD9: Bromodomain-Containing Protein 9

BSP: Bone Sialoprotein

<u>C</u>

c-Abl: Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog

CCND1: Cycline D1

CDK9: Cyclin Dependent Kinase 9

CHD4: Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4

ChIP: Immunoprécipitation de Chromatine (<u>Ch</u>romatin <u>I</u>mmuno<u>P</u>recipitation)

CHS: Chalcone Synthase

circARN: ARN circulaire

CREBBP: (C-AMP Response Element Binding-Protein)-Binding Protein

CRBN: Cereblon

CSM: Cellule Souche Mésenchymateuse

CTA: Carboxy-Terminal Transcriptional Activation

CTC: Cellules Tumorales Circulantes

<u>D</u>

DBD: Domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding-Domain)

DGCR8: Di George Critical Region 8

Dnmt: ADN-méthyltransférase

DOT1L: DOT1-like

dsRBD: double strand RNA-Binding Domain

ERα: ER alpha

ERK 1/2: Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2

ET: Extra-terminal (Domain)

ETS: E-Twenty-Six Transformation Specific

Euro-EWING 99: EUROpean Ewing Tumor Working Initiative of National Groups

EWS: <u>Ew</u>ing <u>S</u>arcoma

EZH2: Enhancer of Zest Homologue 2

<u>F</u>

FADD: Fas-associated Death Domain

FDA: Food and Drug Administration

FGF-I: Fibroblast Growth Factor I

FISH: Fluorescent in situ hybridization

Fli1: Friend Leukemia Integration 1

FLS: Fli1-Specific

FLT3-TKI: Inhibiteur de Tyrosine Kinase FLT3

FOSL1: Fos-Like Antigen 1

fs(1)h: female sterile homeotic

FUT8: Fucosyl-Transferase 8

<u>E</u>

EEC: Ectrodactylyl Ectodermal DysplasiaEC₅₀: Concentration efficace médianeEMA : Agence Européenne de la Médecine

<u>G</u>

Gcn5: General Control of Amino-Acid Synthesis, Yeast, Homologue

GCN5L2: (General Control of Amino-Acid Synthesis Protein 5)-like 2

GFP: Green Fluorescent Protein
GLTSCR1: Glioma Tumor Suppressor
Candidate Region Gene 1
GNAT: Gcn5-Related N-Acetyltransferase
GSK-3β: Glycogene-Synthase Kinase-3β
GRM4: Glutamate Receptor
Metabolotropic 4
GWAS: Genome Wide Association Studies

IGF-1: Insulin Growth Factor 1

IGF1R: Insulin Growth Factor 1 Receptor

IGFBP-3: Insulin-like Growth Factor Binding-Protein-3

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

Ī

JAK2: Janus Kinase 2

JMJC: JumonjiC

JMJD6: Jumonji Domain Containing 6

<u>K</u>

KEAP1/NRF2: Kelch-like ECH-Associated Protein 1/Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-like 2

<u>L</u>

let-7: lethal-7

lincARN: large ARN non-codant intergénique (large intergenic non-coding RNA)

LMS: Limb-Mammary Syndrom

LNA: Locked Nucleic Acid

IncARN: large ARN non-codant (large non-coding RNAs)

<u>M</u>

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

<u>H</u>

HAT: Histone Acétyltransférase

HDAC: Histone Désacétylase

HDACi: inhibiteur de HDAC (HDAC inhibitor)

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HH: Sonic Hedgehog

HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor 1 α

H-L-H: Hélice-Boucle-Hélice (Helix-Loop-Helix)

HMGA2: High-Mobility Group AT-Hook 2

HMOX1 : Heme Oxygenase (Decycling) 1

HMT : Histone Méthyltransférase

 $\mbox{HP1}\alpha$: Heterochomatin Protein 1α

HRK: Harakiri

hTERT: human Telomerase Reverse Transcriptase

<u>I</u>

IAMW: ICU Acquired Muscle Weakness

MBD: Methyl Binding Proteins

MCSF: Macrophage Colony Stimulating Factor

MDM2: Mouse Double Minute 2 Homologue

MDR: Multidrug Resistance

MDR-1: Multidrug Resistance-1

MeCP2: Methyl CpG Binding Protein 2

MED1: Mediator Complex Subunit 1

MENT: Myeloid and Erythroid Nuclear Termination Stage-Specific Protein

META: Métastase

Mesna: 2-mercaptoethane sulfonate Na

miARN: microARN

MMP: Métalloprotéinase Matricielle (Matrix Metalloproteinase)

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

MYST: Moz, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60

<u>N</u>

ncARN: ARN non codant (non-coding RNA)

NCSC : cellule souche des crêtes neurales (Neural Crest Stem Cells)

NFIB: Facteur Nucléaire I/B (Nuclear Factor I/B)

NF-кB: Nuclear Factor-kappa В

NLN: Neurolysine

NMC: Carcinome de la ligne médiane (NUT Midline Carcinoma)

NRP1: neuropiline-1

NSCLC: Cancer du poumon à non-petites cellules (Non-Small Cell Lung Carcinoma)

NSE: Neural-Specific Endolase

<u>0</u>

OCN: Ostéocalcine

OD: Domaine d'oligomérisation (Oligomerization Domain)

OPG: Ostéoprotégérine

OPN: Ostéopontine

<u>P</u>

PARP: poly (ADP-ribose) polymérase

PAZ: PIWI, AGO, Zwille

PBV1: Papillomavirus Bovin de Type 1

PCAF: p300/(CREB Binding Protein) Associated Factor

PDGF-C: Platelet-Derived Growth Factor C

PDID: Phosphorylation-Dependent Interaction Domain

PFA: Paraformaldéhyde

PI3K: Phosphoinositide 3 Kinase

piARN: ARN qui interagissent avec les protéines Piwi (Piwi interacting RNA)

PID: P-TEFb Interaction Domain

PLK2: Polo-like kinase 2

PLOD2: Procollagène-Lysine, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygénase 2

PNET: Tumeur Neuroectodermique Primitive (Primitive Neuroectodermal Tumor)

PP2A: Protein Phosphatase 2A

PRC2: Polycomb Repressive Complex 2

PRMT: Protein Arginine Methyltransferase

PROTAC: Proteolysis Targeting Chimeras

P-TEFb: Positive-Transcription Elongation Factor-b

PTEN: Phosphatase and Tensin Homogue

PTH: Hormone Parathyroïdienne

<u>R</u>

RANK: Receptor Activator of NF-KB

RANKL: Receptor Activator of NF-κB Ligand

REG : Réticulum Endoplasmique Granuleux

RGD: Arginine/Glycine/Acide Aspartique

RISC: RNA-Induced Silencing Complex

ROCK1: Rho-Associated Kinase 1

RT-qPCR: Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction

<u>S</u>

SAM: Sterile α -Motif

SEER: Surveillance, Epidemiology and End Results

SET: Su[var]3-9, Enhancer of zeste, Trithorax

SF1: Splicing Factor 1

SHFM4: Split-Hand/Split-Foot Malformation 4

siARN: small interfering RNA

snARN: petit ARN nucléaire (small nuclear RNA)

snoARN: petit ARN nucléolaire (small nucleolar RNA)

SNP: Polymorphisme de Nucléotide isolé (Single Nucleotide Polymorphism)

SNV: Variant de Nucléotide isolé (Single Nucleotide Variation)

SRR: Sérine Racémase

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

SVF: Sérum de Veau Fœtal

<u>T</u>

TA: Transactivation Domain (Domaine de Transactivation)

TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

TGFβ-RII: Transforming Growth Factor-β Récepteur II **TIMP**: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase

TLDA: TaqMan[®] Low Density Array

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNM: Tumor, Node, Metastasis

TP: Tumeur Primaire

TRBP: TAR RNA Binding Protein

TRAP: Phosphatase Acide Résistante au Tartrate

TRIM: Tripartite Motif-Containing Protein

TWIST1: Twist-related Protein 1

UTR: Untranslated Region

VAI: Vincristine; Actinomycine D; Ifosfamide

VE-Cadhérine: Vascular Endothelial Cadherin

VEGFA: Vascular Endothelial Growth Factor A

VHL-1/2: Von Hippel-Lindau 1/2

VIDE: Vincristine ; Ifosfamide; Doxorubicine (Adriamycine); Etoposide

<u>W</u>

Wnt: Wingless-Type MMTV Integration Site Family

Wnt5a: Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 5a

Wnt6: Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 6

<u>v</u>

U

VAC: Vincristine; Actinomycine D; Cyclophosphamide

VACA: Vincristine; Actinomycine D; Cyclophosphamide; Adriamycine

<u>Y</u>

YY1: Yin Yang1

Remerciements

Ce travail a été réalisé au :

Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapies des Tumeurs Osseuses primitives – LPRO UMR957 Faculté de Médecine de Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44035 NANTES Cedex 01

Sous couvert financier de l'INSERM et de la Région Pays de la Loire, ainsi que par la bourse Guillaume Perrot, généreusement offerte par les membres des associations Booguie Wooguillaume et InfoSarcome.



Je tiens en premier lieu à remercier le **Pr. Dominique HEYMANN**, pour son accueil au sein de son laboratoire lors de mon stage de Recherche de Master 1, me donnant ainsi la possibilité de réaliser cette thèse dans ces conditions. Pour son soutien, nos « cyber-communications » pleines d'humour et de subtilité et les remorques de champagnes promises tout au long de ce travail de thèse. <u>MERCI !</u>

Le **Dr. Benjamin ORY**, pour m'avoir encadré, soutenue, guidée au quotidien (et ce ne fut pas simple ! ;)), pendant ces cinq années passées au laboratoire, pour m'avoir donné la chance « d'apprendre la Recherche », pour sa disponibilité et ses conseils, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis d'évoluer, pour avoir été un Directeur de thèse et un Directeur d'Equipe (et quelle équipe !) en **OR** !! <u>MERCI !</u>

Madame Natacha ENTZ-WERLE et Monsieur Fernando LECANDA, pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Messieurs **Franck TIRODE** et **Pierre-François CARTRON**, pour avoir accepté de faire partie des membres de mon jury de thèse.

Messieurs **Philippe JUIN** et **Christophe BLANCART**, pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse.

Madame **Françoise REDINI**, pour sa gentillesse et son soutien, ses gentils mots dans les couloirs, en congrès ou... baskets aux pieds, sur les lignes de départ des plus grands marathons internationaux.

Madame **Estelle LECOINTE**, toute la famille et les proches de **GUILLAUME PERROT**, ainsi que Monsieur et Madame **BONNAMOUR**, pour leur accueil, leur soutien, leur confiance et pour le partage de ces moments forts, suscités par quelques notes de piano.

Monsieur **Marc(o) BAUD'HUIN**, aussi bien pour ses conseil que ses blagues et pour avoir fait de moi une Beetlejuice des cours d'Histologie. Pour nos manips et débats à propos de JQ1, de résistances, de souris ou d'accent anglo-saxon incompréhensible.

Monsieur **François LAMOUREUX**, pour ses conseils toujours avisés, pour sa patience et sa rigueur de travail qui m'inspirent, pour sa générosité, partageant ses « mille trucs et astuces » en manips, ses protocoles, les derniers « Call for Abstract » aussi bien que ses tickets petits-déjeuners à la Nouvelle-Orléans.

Mademoiselle Lidia RODRIGUEZ-CALLEJA, fervente initiatrice et membre émérite de la « team ORY ». <u>MERCI</u> pour tous tes conseils, nos fous-rires, tes tentatives de transmission d'expressions espagnoles, pour nos « boulettes » de 14h tout comme celles de 19h45 (mais plus souvent 19h45), pour nos soirées et sorties, pour la formule magique de l'Ampicilline et toutes ces anecdotes qui auront contribué d'une manière ou d'une autre c'est certain, à enrichir la Recherche sur les Sarcomes Osseux et les miARNs.

Monsieur **Frédéric LEZOT**, pour sa bonne humeur communicative, son sens de l'orientation américain ainsi que son sens de l'humour. Merci pour toutes tes petites anecdotes personnelles qui m'ont toujours fait rire, qu'elles concernent ton service militaire ou « ton pote qui... ». A quand le « Le Guide du Routard globe-trotter » ou « Le Northern Blot pour les Nuls » ;) ?

A **Thibaut QUILLARD**, pour son aide et sa réactivité face à tous mes petits tracas du quotidien, qu'ils concernent des protocoles, des primers perdus, des dossiers de financement ou des révisions d'articles.

A **Brice MOUKENGE** et **Julie BESNARD**, pour leur investissement à mes cotés dans ce projet de thèse et pour leur aide précieuse dans une partie de la réalisation technique de ce travail.

Monsieur **Franck VERRECHIA**, pour ses conseils en matière d'Ewing et de plasmides, ses cafés (très) matinaux et ses tartes aux pommes malheureusement subtilisées par la mafia italienne.

Mesdames **Martine BERREUR** et **Bénédicte BROUNAIS**, pour le partage de leur expertise en qPCR, en informatique ou en productions virales.

A **Benjamin NAVET** et **Marie-Astrid BOUTET**, mes chers collègues PhD, compagnons de galère, le Berrichon-informaticien et la Cavalière-pâtissière.

A **Nathalie RENEMA**, pour le partage de ses projets « top-secrets » et le temps passé toutes les deux à l'animalerie.

A **Matthias CHATELAIS**, pour ses blagues à « thème non-récurrent » et son enthousiasme de chaque jour.

A **Jérôme AMIAUD**, pour ses blagues toujours raffinées, pour nos fous-rires et ses commentaires désagréables (parce que, qui aime bien châtie bien). Pour nos longues discussions, nos débats animés et pour ce monde qu'on aura refait tant de fois !

A **Séverine BATTAGLIA**, pour sa gentillesse, sa sincérité, sa disponibilité et ses sourires de chaque instant, pour les souris, pour nos partages d'astuces « sport/zen/cuisine-healthy », pour nos séances de fitness et les souvenirs de Pen Bron.

A Céline CHARRIER, pour sa disponibilité, sa gentillesse et son rire communicatif.

A **Frédéric BLANCHARD** et **Bénédicte BRULIN**, pour avoir patiemment supporté de partager votre bureau avec moi, en dépit des odeurs de tofu, poulet, pancakes et autres gâteaux protéinés émanant du mien toutes les trois heures et des allers-retours clinquants de mes talons ! Pour la pluie et le beau temps, pour les pauses thé, pour le soleil de Montpellier, pour le chauffage et l'isolation... et aussi un peu parce que, finalement on aimait à râler, merci **Bénédicte**.

A **Régis BRION**, « je veux un A », pour sa bonne humeur quotidienne, ses « Brionnades », son aide et ses réponses à tout et n'importe quoi (et surtout n'importe quoi !), son cœur gros comme ça, ses booms d'anniversaire mémorables, ses gâteaux et sucreries, qui me font systématiquement faillir (ô malheur !), à mon régime. Merci aussi Régis, pour ta maladresse dans le jet de glaçons dans les couloirs, qui m'a de nombreuses fois sauvée de l'hypothermie...

A **Guylène HAMERY**, pour son aide et ses conseils « animaliers », son oreille toujours attentive et bienveillante, sa rigueur et son perfectionnisme au travail que j'admire, mais aussi pour nos discussions animées et son support à certains moments justement un peu « trop animés ».

A **Pierre LAYROLLE**, pour nos discussions toujours enthousiastes, de ski, de voyages, de cocktails ou de gastronomie... et parfois de Sciences !

A **Meadhbh BRENNAN**, pour nos discussions, soirées « entre filles » et pour avoir été ma prof d'anglais officielle au LPRO.

A Sandrine MAURICE, Marie-Hélène ROCQUEBERT, Valérie TRICHET, Laurent MIGNE, Catherine CHEVALIER, Rachel, Romain, Kévin, Mathilde, Sarah, Geof et tous les autres...

Ainsi qu'à tous les anciens, Julie TALBOT, Audrey LAMORA, Aude SEGALIGNY, Marta TELLEZ GABRIEL, Kosei ANDO, Laëtitia SALOU, Bérengère GOBIN, Julien TAURELLE, Pierre AVRIL, Julien STANOVICI, Eric DEVINE...

MERCI enfin à mes parents, ma famille, mes amis et mes proches pour leur confiance et leur soutien qui ont largement contribué à la réalisation de ce travail. Merci à toi aussi (futur !) Docteur Sylvain PHILIPPE, pour ton soutien dans la rédaction de cette thèse, qui à défaut de parler d'exo planètes, traite plus modestement de Sarcomes Osseux ;)

Enfin... à toi **ALEXANDRE**... **MERCI** pour m'avoir supportée, soutenue et encouragée dans les moments de doute (surtout sur la fin de la rédaction de cette thèse !). Merci d'avoir toujours prêté une oreille patiente, attentive et bienveillante (ou en tout cas, d'avoir toujours si bien su faire semblant ;) !!) à mes exposés ou problématiques existentielles concernant les miARNs et les Bromodomaines. Merci d'être celui avec qui j'ai pu partager les hauts et les bas du quotidien, inhérents ou non à la rédaction de cette thèse, les petites victoires des manips réussies comme les (grosses) déceptions de celles ratées... pour me donner le courage de toujours vouloir les recommencer !

INTRODUCTION GENERALE

I. L'EPIGENETIQUE

I. <u>L'épigénétique :</u>

I.1. L'épigénétique ou l'hérédité au-delà de l'ADN : Historique et concept :

Depuis l'émergence de la **théorie darwinienne de l'évolution**, apparue au XIX^{ème} siècle, il est désormais admis par la communauté scientifique et par le grand public, qu'au sein d'une espèce (organisme uni- ou pluricellulaire), les **gènes** sont transmis de génération en génération par l'intermédiaire de l'**ADN** (**Acide Désoxyribonucléique**). La pérennité d'une espèce étant assurée par la transmission d'une information génétique complète, stable et de bonne qualité, les **mutations** aléatoires des séquences ADN doivent demeurer des évènements rares et ponctuels à travers le génome. Leur fréquence chez l'Homme est en effet relativement faible, variant entre **10⁻⁴ et 10⁻⁸ par gène et par génération**.

Toutefois, même si le maintien d'un faible taux de mutation contribue à prévenir le développement de certaines maladies comme le cancer, ces « accidents génétiques » ne sont pas pour autant des phénomènes indésirables puisqu'ils permettent également aux êtres vivants de s'**adapter** aux contraintes imposées par leur **environnement**. En effet, la modulation de l'expression des gènes induite par les mutations fait partie intégrante du processus d'**évolution** des espèces, au moyen de la **sélection naturelle**. Celle-ci implique que les caractéristiques phénotypiques découlant des mutations et conférant un **avantage** pour la survie de l'individu qui les a développées, soient finalement transmises à sa descendance. Toutefois, cette théorie suppose que seules les mutations affectant l'ADN génomique des **gamètes** soient transmises et de surcroît, compte tenu de la vitesse de division cellulaire, ce postulat ne permet pas d'expliquer les adaptations cellulaires et biologiques à court terme, à l'échelle de quelques minutes par exemple.

Il apparaît donc évident que les phénomènes mutationnels ne soient pas les seuls à impacter l'expression des gènes. Les récentes avancées scientifiques ont ainsi mis en évidence que les régulations dites « épigénétiques » jouaient également un rôle prépondérant dans l'adaptation des êtres vivants à leur environnement et l'évolution des espèces. Historiquement, la notion d'épigénétique est apparue relativement tard au regard des connaissances scientifiques actuelles, puisque ce terme a été évoqué pour la première fois en 1942 par Conrad Hal Waddington (1905-1975)¹. Ce biologiste, généticien et embryologiste, « père de l'épigénétique », définît alors ce terme comme « une branche de la biologie, visant à étudier les implications entre les systèmes gènes/environnement et leurs produits, donnant naissance au phénotype d'un individu ».

Ce n'est toutefois que bien plus tard, en **1980**, en parlant d'« **hérédité épigénétique** », que le chercheur australien **Robin Holliday** compléta sa définition en y introduisant son caractère de « transmissibilité » au cours des générations². Etymologiquement, le terme « <u>épigénétique</u> » vient du grec, <u>épi,</u> $\dot{\epsilon}\pi i$, épí, « au-dessus de » et <u>génétique</u>, $\gamma \epsilon v v \dot{\omega}$, genno, « donner naissance ». Il se définit de nos jours comme « *l'étude des changements héréditaires dans la fonction des gènes, transmis d'une génération à la*

suivante (d'une cellule mère à une cellule fille ou d'un organisme parent à son enfant), ayant lieu sans altération de la séquence ADN ».

Plusieurs grands contemporains de la Recherche en épigénétique ont également interprété cette notion selon leur propre vision, la reformulant de manière plus poétique ou plus imagée. J'ai choisi d'en présenter ici quelques exemples, tirés d'un compte-rendu de **Brona McVittie** paru en **juin 2006**, traduit par **Dianne de Cicco** et **Laure Claesen** (<u>http://www.epigenome.eu</u>).

« L'épigénétique a toujours été l'ensemble de ces choses bizarres et merveilleuses que la génétique ne sait pas expliquer.» **Denise Barlow** (Vienne, Autriche) ;

«L'ADN est comme une bande magnétique porteuse d'information, mais qui ne sert à rien sans magnétophone. L'épigénétique joue en quelque sorte le rôle du magnétophone.» **Bryan Turner** (Birmingham, RU) ;

«Je prendrais une photo d'un ordinateur et je comparerais l'ADN au disque dur et l'épigénome aux logiciels. On peut accéder à certaines informations sur le disque dur grâce aux programmes installés sur l'ordinateur. Mais il y a certains domaines qui sont protégés par des mots de passe et d'autres qui ne le sont pas. Je dirais que l'on essaye de comprendre pourquoi il y a des mots de passe pour certaines zones alors que d'autres sont libres d'accès.» Jörn Walter (Sarre, Allemagne).

La notion d'épigénétique permet donc d'expliquer pourquoi, malgré le fait que toutes les cellules d'un même organisme possèdent le même patrimoine génétique, leurs **profils** d'**expression génique** diffèrent. Elle permet ainsi de concevoir que chaque sous-type cellulaire sélectionne un programme d'expression génique qui lui est propre, composé du panel des gènes essentiels à ses fonctions spécifiques, différenciant par exemple une cellule cardiaque d'une cellule osseuse. De ce fait, la détermination du **destin cellulaire** ou **différenciation cellulaire**, un des phénomènes fondamentaux du développement des organismes, serait gouvernée par des changements affectant une « trame de fond », décrite et illustrée par Waddington comme le « **paysage épigénétique** », plutôt que par des altérations de transmission des gènes (**Figure 1**). De plus, les mécanismes épigénétiques permettent également de mieux appréhender en quoi l'expression génique est modulable au cours du temps, à l'échelle de la vie d'une cellule par exemple, s'adaptant et répondant aux conditions de son environnement.

Variations intrinsèques du développement Génotypes identiques

Phénotypes différents

Figure 1 | Le « paysage épigénétique » selon Waddington.

Les boules bleues représentent les cellules d'un même organisme, possédant un génome identique, qui, en cheminant à travers le *paysage épigénétique* au cours du développement, voient leur devenir cellulaire différer. En bout de course, elles présentent ainsi des phénotypes différents, suivant qu'elles aient emprunté la *voie épigénétique* **a**) ou **b**). Le paysage vallonné ici illustré représente l'ensemble des facteurs environnementaux qui influent sur les mécanismes épigénétiques. *Modifié d'après [AUBIN D., 1998a], p143, (tiré de [WADDINGTON, C.H. 1957] p29).*

Ainsi, les mécanismes épigénétiques sont influencés par de nombreux facteurs environnementaux (Figure 1) tels que l'alimentation ou la température, l'âge, l'exposition à des agents chimiques ou encore à des médicaments. Au sein du règne animal, les exemples les plus probants illustrant les régulations épigénétiques concernent notamment la sélection des reines chez les abeilles *Apis mellifera* ou encore le développement des tortues *Emys orbicularis*. En effet, selon qu'elle soit nourrie avec ou sans gelée royale, une même larve d'abeille donnera naissance, soit à une reine fertile, ou bien à une ouvrière stérile, l'alimentation impactant alors dans ce cas le mécanisme épigénétique de « méthylation de l'ADN », dont une description plus complète interviendra plus loin dans ce manuscrit³. Par ailleurs, la température d'incubation des œufs de tortues détermine également le sexe des petits selon les mêmes modalités épigénétiques^{4,5}.

Faisant écho à leurs implications **développementales** et **adaptatives**, les mécanismes épigénétiques participent à tous les **processus cellulaires fondamentaux** tels que la prolifération, la division cellulaire, la migration ou la mort cellulaire. Ainsi, dans des considérations d'ordre **médical**, toute **dérégulation** de ces mécanismes et plus particulièrement, des acteurs **moléculaires** et **chimiques** qui les gouvernent, peut aboutir au développement de pathologies. L'étiologie de ces dernières est variée et elles peuvent se manifester par des maladies auto-immunes, du diabète, des troubles mentaux ou encore des **cancers**, comme il en sera question tout au long de cette thèse.

I.2. Chromatine et histones, cibles des mécanismes épigénétiques :

Composant principal du noyau des cellules eucaryotes, la **chromatine** se définit par l'**association** entre l'**ADN** et certaines **protéines** et **ARNs**, permettant l'organisation structurale de cette dernière dans l'espace. Cet assemblage est loin d'être inerte et sa **dynamique** tient une place majeure dans de nombreux processus cellulaires tels que la réplication, la transcription, la recombinaison et la réparation de l'ADN. Mise en évidence en **1980** par **Walther Flemming**, suite à ses études sur la division cellulaire, la chromatine fut ainsi nommée en raison de sa forte affinité pour les colorants⁶. **Deux** grands types de **protéines** l'organisent : les protéines de « **type histone** », qui permettent de la structurer et celles de « **type non-histone** », telles que **MENT** (**Myeloid and Erythroid Nuclear Termination Stage-Specific Protein**), **MeCP2** (**Methyl CpG Binding Protein 2**) ou encore **HP1**α (**Heterochomatin Protein 1**α) par exemple, qui modulent quant à elles, sa conformation et l'organisation de ses structures secondaires et tertiaires⁷.

Identifiées dès **1884** par **Kossel**, suite à ses travaux menés sur des extraits de cellules aviaires, les **histones** permettent de structurer et de moduler **l'état de compaction** de la chromatine⁸. Cet état de compaction revêt une importance capitale dans tous les processus biologiques eucaryotes puisqu'il influence directement l'expression des gènes. On parle ainsi d'**euchromatine** quand l'ADN et ses histones associées présentent une structure décondensée, permettant l'accès à la machinerie transcriptionnelle et donc **l'activation de l'expression des gènes** et d'**hétérochromatine** dans le cas contraire (**Figure 2A**)⁹.

Il existe cinq types d'histones ; les histones H1, H2A, H2B, H3 et H4. Ces petites protéines basiques, dont le poids moléculaire est compris entre 13 et 15 kDa, entretiennent des interactions électrostatiques fortes avec l'ADN, chargé négativement, par l'intermédiaire des groupements phosphates de ce dernier. Elles s'associent à l'ADN par groupes de huit histones, pour former l'unité de base de la chromatine, le nucléosome, mis en évidence en **1975** par le généticien **Pierre Chambon**¹⁰. Cette structure caractéristique, de 11 nm de diamètre et 5,5 nm de hauteur est ainsi constituée de 145 à 147 paires de bases ADN, enroulées sur 1,65 tour autour d'un octamère d'histones (Figure 2B et 2C). Ce dernier est ainsi composé de deux copies de chacune des histones (H2A, H2B, H3 et H4) : on parle alors de **particule de cœur** du nucléosome⁸. La portion d'ADN qui sépare deux particules de cœur est appelée ADN de liaison et son interconnexion avec l'ADN du cœur est assurée par l'histone H1 (Figure 2B). Les nucléosomes s'organisent entre eux pour former la fibre chromatinienne, d'un diamètre de 30 nm. Au sein d'un nucléosome, la dimérisation des histones nécessaire à la formation de la particule de cœur est assurée par les extrémités Cterminales de ces dernières, contenant un domaine globulaire dit histone-fold. Leurs extrémités N-terminales libres sont, quant à elles, orientées à l'extérieur de la structure du nucléosome et sont la cible de modifications post-traductionnelles. On peut toutefois noter que ces modifications post-traductionnelles peuvent aussi affecter le cœur du nucléosome¹¹.



Figure 2 | Structure et organisation de la chromatine et des nucléosomes.

(A) Illustration du noyau d'une cellule hépatique vue en microscopie électronique à transmission, la barre noire représentant l'échelle de 2 μm. N : noyau ; ne : nucléole ; Ht : Hétérochromatine ; Eu : Euchromatine. *Modifié d'après Sarhan OM et al., 2014.* (B) Structure et organisation de la chromatine, des histones et des nucléosomes. *Modifié d'après Pearson Eduction, Inc, 2011.* (C) Structure cristallographique d'un nucléosome, vue du dessus, dans l'axe de la super-hélice ADN. La particule de cœur du nucléosome est ici représentée, le squelette phospho-diester de 145-147 pb de l'ADN de cœur étant représenté en noir. Les chaines des huit protéines histones sont aussi représentées (H3 : bleu ; H4 : violet ; H2A : vert ; H2B : orange). Les extrémités N-terminales libres des histones sont orientées à l'extérieur de la particule de cœur. *Modifié d'après une figue de Katherine Stott, pour Luger et al.*, (http://www.researchgate.net).

I.3. L'épigénétique : une seule notion pour différents mécanismes :

Il existe plusieurs types de mécanismes épigénétiques et seuls les **quatre principaux** seront développés dans l'introduction de cette thèse : les trois premiers influencent directement l'état de **compaction des chromosomes** et l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription et aux polymérases. Ces mécanismes concernent (1) la **méthylation de l'ADN**, (2) les **modifications post-traductionnelles des histones** et (3) la « lecture » de ces **modifications**, tous trois conditionnant l'expression des gènes **avant** même leur transcription en **ARN messager (ARNm)**. Le dernier mécanisme, quant à lui, intervient en aval de la transcription des gènes et concerne la régulation de l'expression des ARNm par les **ARNs non codants (ncARNs, non-coding RNAs)**: on parle alors d'**ARN interférence (ARNi)** (4).

Il existe toutefois d'autres mécanismes épigénétiques qui ne seront pas abordés plus en détail ici. L'état de compaction la chromatine est ainsi également affecté par le remplacement des histones canoniques (H2A, H2B, H3, H4) par des **variants** (**H2AX** ou **H2AZ** par exemple, intervenant dans les mécanismes de réparation de l'ADN¹²), de même qu'il est aussi influencé par des mécanismes de **remodelage des nucléosomes** dépendants de l'**ATP** (Adénosine Triphosphate)^{13,14}.

I.3.1. La méthylation de l'ADN (1) :

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique majeur, intervenant dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que le maintien de la stabilité des chromosomes, l'inactivation du chromosome X ou encore le développement embryonnaire. Cette modification épigénétique post-réplicative, constitue un des mécanismes principaux menant à la répression stable de l'expression des gènes. Chez les Mammifères, les groupements méthyles (de formule chimique CH₃-) sont liés directement à l'ADN par des enzymes spécifiques, les ADN-méthyltransférases (Dnmts), alors qu'à l'inverse, la déméthylation de l'ADN est assurée par les ADN-déméthylases. Les Dnmts fixent ainsi ces groupements de façon covalente en partie 5' des cytosines de l'ADN localisées au niveau des dinucléotides Cytosine-Phosphate-Guanine (CpG), générant alors des 5-méthylcytosines. Sur le plan moléculaire, la méthylation de l'ADN s'oppose à la transcription des gènes via deux mécanismes : soit en empêchant de façon directe l'interaction des facteurs de transcription avec la chromatine ou bien de façon indirecte, en permettant le recrutement de protéines de liaison aux groupements méthyles, les MBD (Methyl Binding Proteins) au niveau des CpGs méthylés¹⁵.

Il existe deux grands types de méthylation ; la **méthylation** *de novo* qui permet l'ajout des groupements méthyles sur les deux brins d'ADN en même temps, ainsi que la **méthylation** *de* **maintien**, qui intervient quant à elle, au cours de la réplication de l'ADN. Elle se caractérise par l'ajout de la marque CH₃- uniquement sur le brin néo-synthétisé, lorsque le brin matrice est lui-même déjà méthylé.

La famille des Dnmts comprend **cinq** enzymes principales chez les Mammifères : **Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3l** et **Dnmt2**, chacune catalysant un type de méthylation particulier. Alors que la **Dnmt1** interviendrait dans la méthylation de maintien uniquement, de récentes analyses biochimiques ont montré que la **Dnmt2** était impliquée non pas dans la méthylation de l'ADN, mais dans celle des **ARNt** (**ARN de transfert**) aspartate¹⁶. Le rôle fondamental de la méthylation de l'ADN et des enzymes qui y contribuent est illustré par le fait que des souris KO pour les gènes codant les **Dnmt1, Dnmt3a** ou **Dnmt3b** ne parviennent pas au terme du développement fœtal ou meurent peu de temps après la naissance¹⁷. Il a par ailleurs également été rapporté que des cellules souches embryonnaires présentant des **mutations** des **Dnmts** arboraient des anomalies dans le processus d'inactivation du chromosome X, l'**ARN Xist** co-localisant alors avec les deux chromosomes X chez la femelle au lieu d'un seul¹⁸.

Globalement, la présence des dinucléotides **CpGs** est assez **rare** au sein du génome des Vertébrés¹⁹. Ceci est lié au fait que ces marques, justement très souvent sujettes à la méthylation, soient alors très vite remplacées par des **dinucléotides TpGs** (**Thymine-Phosphate-Guanine**), générés par la réaction de déamination des 5-méthylcytosines en thymine. On estime ainsi qu'environ 80% des motifs CpGs retrouvés chez les Mammifères sont méthylés²⁰. De très fortes densités de CpGs non méthylés sont toutefois retrouvées au niveau des promoteurs des gènes dont l'expression est **ubiquitaire**. Dans ces zones, d'un kilobase de long environ, ces CpGs sont alors associés sous forme de « **clusters** » ou « **îlots CpGs** » et on estime qu'à travers l'ensemble du génome, 70% des régions promotrices en possèdent¹⁹.

Dans un contexte pathologique, même si, à l'instar de celui des cellules saines, l'ADN des cellules tumorales est globalement hypométhylé, leurs îlots CpGs présentent souvent une nette **hyperméthylation**, corrélée à une faible expression des gènes suppresseurs de tumeurs qui leurs sont associés²¹. L'inhibition des Dnmts constitue donc une stratégie antitumorale intéressante dans une optique de rétablissement de l'expression de ces gènes. L'**Azacytidine** ou la **Décitabine** ont d'ailleurs été approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) américaine et par l'Agence Européenne de la Médecine (EMA) dans le traitement des leucémies, alors que la **Zébularine** présente quant à elle, des effets thérapeutiques très prometteurs *in vitro*²².

I.3.2. Les modifications post-traductionnelles des histones (2) :

Les modifications post-traductionnelles des histones peuvent être de plusieurs natures, toutes influençant profondément l'état de compaction de la chromatine : on retrouve ainsi la **méthylation**, l'**acétylation**, la **phosphorylation** (au niveau des résidus sérines et thréonine), l'**ubiquitinylation** (sur les lysines), la **sumoylation**, la **crotonylation** ou encore l'**ADP ribosylation** (<u>Figure 3</u>).

La dynamique de l'ensemble de ces modifications covalentes est régie par différentes classes d'enzymes qui peuvent ainsi **ajouter** (on parle d'enzymes « **writers** ») ou bien, **retirer** (on parle alors d'« **effaceurs** ») les groupements chimiques qui les caractérisent (groupements **méthyles** (CH₃-), **acétyles** (COCH₃-), **phosphates** (H₃PO₄-), **ubiquitine** etc.) (<u>Figure 3</u>)²³.

L'action conjuguée de ces enzymes définit ainsi le **code épigénétique des histones**, ensuite déchiffré par des enzymes « **lectrices** », appartenant bien souvent à des complexes transcriptionnels multiprotéiques. Ces dernières jouent ainsi un rôle de protéines d'échafaudage (ou « scaffold proteins ») en **reconnaissant** ces modifications et en **interagissant** avec (<u>Figure 3</u>). Les modifications des histones les mieux documentées à l'heure actuelle étant la méthylation et l'acétylation, seules ces dernières seront développées dans la partie suivante.



Figure 3 I Nature et dynamique des modifications post-traductionnelles des histones, représentées par leurs séquences en acides aminés:

Modifiée d'après Jennings LE. et al., 2014.

Les acides aminés des extrémités des histones s'organisent à l'extérieur du cœur du nucléosome (représenté ici au centre). Les résidus les plus assujettis aux modifications post-traductionnelles sont ceux exposés aux solvants, même si ces dernières peuvent aussi survenir sur ceux du cœur du nucléosome. L'acétylation, la méthylation et la phosphorylation sont les trois types de modifications les plus courantes. Elles sont mises en place par les enzymes "writers", déchiffrées par les protéines "lectrices" et finalement retirées par les enzymes "effaceurs". BET : Bromodomain and Extra-terminal Domain ; HATs: Histone Acétyltransférases; HDACs: Histone Désacétylases; HDM: Histone Déméthylases ; HMTs: Histone Méthyltransférases.

I.3.2.a. La méthylation des histones :

La méthylation des histones a lieu au niveau des résidus lysines et arginines des histones H3 et H4 principalement (**Figure 3**). Les enzymes « writers » chargées d'assurer ce type de modification sont les **Histones Méthyltransférases** (**HMTs**), qu'on peut diviser en deux sous-catégories selon le résidu qu'elles catalysent préférentiellement : les HMTs à arginine ou **PRMTs** (**Protein Arginine Methyl-Transferases**) et les HMTs à lysine, dénommées **protéines à domaines SET** (**Su[var]3-9, Enhancer of zeste, Trithorax**)²⁴. Les résidus lysine peuvent être mono-, -di ou tri-méthylé par ces enzymes, alors que les résidus arginine sont quant à eux, uniquement sujets aux mono- ou di-méthylations. Par ailleurs, ces méthylations peuvent s'effectuer de manière **symétrique** ou **non**, impactant alors la nature des protéines lectrices ensuite capables de les reconnaître et complexifiant encore l'étendue et la dynamique du code épigénétique des histones.

Sur le plan mécanistique, la méthylation n'affectant pas la charge des acides aminés, elle ne permet pas d'éliminer les liaisons électrostatiques entre l'ADN et les histones ; on

pense ainsi qu'elle servirait plutôt de point d'ancrage pour le **recrutement** d'autres protéines **lectrices**²⁵. Par conséquent, la méthylation des histones n'est pas une marque particulièrement associée à l'activation ou à la répression de la transcription, comme peut en attester le fait que la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (**H3K9me**) soit retrouvée au niveau de l'**hétérochromatine** (transcriptionellement inactive) chez les eucaryotes supérieurs, alors que celle de la lysine 4 de cette même histone (**H3K4me**) soit plutôt présente dans l'**euchromatine** (transcriptionellement active) (**Figure 2A**)²⁶.

Toutefois, à l'instar des profils de **méthylation de l'ADN** dans les cancers, des **profils** précis de **méthylation des histones** caractérisent également ces pathologies. Ceci permet d'expliquer l'engouement suscité par le développement d'**inhibiteurs** de **HMTs** et d'**histone déméthylases** de ces dernières années. Des inhibiteurs sélectifs des HMTs telles que **DOT1L** (**DOT1-like**), **EZH2** (**Enhancer of Zest Homologue 2**) ou encore des lysine-déméthylases LSD1/2 et JMJC (JumonjiC) sont ainsi actuellement à l'étude, certains présentant déjà des effets thérapeutiques très prometteurs chez l'Homme, notamment dans le cadre des leucémies²⁷.

I.3.2.b. L'acétylation des histones :

Les histones peuvent être **acétylées** au niveau des résidus **lysine** de leurs extrémités N-terminales. L'ajout de cette marque, en plus d'induire un changement dans la structure tridimensionnelle de l'histone, neutralise les charges positives de l'acide aminé lysine, réduisant ainsi l'affinité de l'histone avec l'ADN chromosomique, chargé négativement. En conséquence, la structure de la chromatine devient plus flexible, ce qui facilite l'accès aux **facteurs de transcription** et aux **polymérases**, résultant ainsi à l'activation de la transcription des gènes.

Les enzymes « writers » et effaceurs qui ajoutent ou soustraient les groupements acétyles sont les Histones Acétyltransférases (HATs) et les Histones Désacétylases (HDACs), respectivement (Figure 3). La découverte de ces enzymes est relativement récente, puisque ce n'est qu'en 1996 que la première HAT fut extraite et purifiée chez le protozoaire *Tetrahymena Thermophilia*²⁸. Elle fut ensuite identifiée comme orthologue de l'adaptateur Gcn5 (General Control of Amino-Acid Synthesis, Yeast, Homologue) de levure, également conservé chez l'Homme. Depuis lors, de nombreuses autres HATs ont été découvertes, divisées en deux sous-familles, les MYSTs (Moz, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60) et les GNATs (Gcn5-Related N-acetyltransferases)²⁹.

Dans les cancers, les **HDACs** sont très souvent **surexprimées**, conduisant alors à l'inhibition de l'expression de gènes **suppresseurs de tumeurs**, nécessaires au contrôle de la prolifération, du cycle et de la mort cellulaire par exemple. De ce fait, l'inhibition des HDACs apparaît être une stratégie thérapeutique prometteuse en oncologie, comme en témoigne l'émergence de nouvelles molécules inhibitrices de ces enzymes. A l'heure actuelle, trois

inhibiteurs de HDACs (HDACi, HDAC inhibitors), le Vorinostat, la Romidepsine et le Belinostat sont déjà approuvés par la FDA dans le traitement des lymphomes. Par ailleurs, de nombreuses autres molécules comme l'Abexinostat, le Pracinostat ou l'Acide Valproique sont en cours d'essais cliniques³⁰.

Les HATs sont également des enzymes fréquemment mutées ou dérégulées dans les cancers ainsi que dans certaines maladies neurologiques et inflammatoires. Dans l'**asthme** ou dans certains cas d'**obstructions pulmonaires chroniques** par exemple, l'activité HAT des macrophages alvéolaires est ainsi augmentée³¹. Toutefois, le développement d'**inhibiteurs de HATs** peine à émerger ; la synthèse de composés issus de la conjugaison de **peptides** avec du **Coenzyme A**, tels que le **Lys-CoA** ou le **H3-CoA-20** ne présentant malheureusement qu'une faible efficacité à l'égard des HAT **Gcn5/PCAF** et **p300/CBP** respectivement³².

I.3.2.c. Les modifications post-traductionnelles des histones et leurs interactions : facteur de complexité du code épigénétique :

Selon la nature de l'histone elle-même ainsi que le résidu N-terminal concerné par les modifications post-traductionnelles, l'ajout ou le retrait d'un même groupement aura des effets opposés sur l'état de compaction de la chromatine. Par ailleurs, alors que certaines modifications post-traductionnelles des histones sont **mutuellement exclusives**, il est parfois possible d'en retrouver certaines simultanément sur une même histone. Dans une telle configuration, il a ainsi été démontré que chaque modification pouvait influencer les autres, comme c'est le cas pour l'histone H4 par exemple, dont l'acétylation des lysines 8 et 12 (H4K8ac et H4K12ac) par le facteur co-activateur **p300/CBP** est augmentée quand son arginine 3 (H4R3me) est elle-même déjà méthylée²⁴. De plus, les modifications d'une histone donnée influencent également celles des histones voisines : l'ubiquitinylation de la lysine 123 de l'histone H2B (H2BK123(ubi)) par Rad6 étant requise pour permettre la méthylation des lysines 4 et 79 de l'histone H3 (H3K4me et H3K79me) par exemple, ces méthylations étant elles-mêmes indispensables à la formation de l'hétérochromatine³³.

I.3.3. Les enzymes « lectrices » des modifications post-traductionnelles des histones (3) :

Une fois mises en place par les enzymes « writers », les modifications posttraductionnelles des histones sont ensuite reconnues par des régulateurs épigénétiques « lecteurs ». Cette reconnaissance a lieu par l'intermédiaire des domaines d'interaction spécifiques portés par ces protéines : les Bromodomaines, les Chromodomaines et les domaines Tudor par exemple (Figure 3). Les Chromodomaines reconnaissent majoritairement les lysines méthylées alors que les protéines à domaines Tudor reconnaissent surtout les arginines méthylées. Les marques d'acétylation des lysines sont quant à elles, reconnues par les protéines à Bromodomaines, qui constituent le principal objet d'étude des <u>PARTIES I</u> et <u>III</u> de ce travail de thèse.

I.3.3.a. Les protéines à Bromodomaines :

Les **Bromodomaines** (ou **domaines BDs**) sont des motifs qui furent identifiés en 1992 par l'équipe de Tamkun et al., des suites de leurs études portant sur les mécanismes de régulation transcriptionnelle du gène homéotique **Brahmal/brm** chez la **Drosophile**³⁴. Le terme de « **Bromodomaine** » fut donc par la suite adopté en référence à ce gène. Ce n'est ensuite qu'en 1999 et par l'intermédiaire de techniques de spectrométrie à résonance magnétique nucléaire, que la structure tridimensionnelle de la première protéine à Bromodomaine, PCAF (p300/(CREB Binding Protein) Associated Factor), fut établie³⁵.

Les Bromodomaines sont des motifs de **110 acides aminés** environ, organisés en **quatre hélices** α (α Z, α A, α B et α C), séparées par des boucles flexibles de charge et de longueur variables, les boucles ZA (α Z- α A) et BC (α B- α C). Chez l'Homme, 61 Bromodomaines différents ont ainsi été répertoriés, classés en huit sous-familles (<u>Figure 4A</u>)³⁶. L'organisation secondaire de ces domaines permet la formation dans l'espace d'une **poche hydrophobe** à l'intérieur de laquelle les **lysines acétylées** (des histones mais aussi d'autres protéines) sont reconnues et fixées par l'intermédiaire de liaisons hydrogène (<u>Figure 4B et 4C</u>).

La forte conservation de certains résidus au sein des Bromodomaines témoigne de l'importance de leur engagement dans les interactions qu'ils entretiennent avec les lysines acétylées, comme c'est le cas notamment des tyrosines Tyr¹¹²⁵ et Tyr¹¹⁶⁷, ainsi que de l'asparagine Asn¹¹⁶⁸ de la protéine à Bromodomaine CREBBP ((C-AMP Response Element Binding-Protein)-Binding Protein)³⁶. Le rôle clé de l'asparagine Asn¹¹⁶⁸ dans cette spécificité est d'ailleurs particulièrement bien documenté, sa fonction nitrogène-amide présentant des capacités d'interaction avec l'oxygène du groupe acétyl-carbonyle des histones³⁷.

Toutefois, même si toutes les protéines à Bromodomaines sont **spécifiques** des lysines acétylées, cette spécificité est modulée par la **variabilité** des séquences codant les domaines BDs. Ceci peut s'illustrer par le fait que les résidus de reconnaissance des H3K14ac au sein du domaine **BD2** de la protéine **Polybromo** sont très différents de ceux des protéines **CBP** et **PCAF**, pourtant toutes deux également spécifiques de cette marque³⁸.



Figure 4 | Les Bromodomaines : Phylogénie et caractéristiques structurales des domaines de reconnaissance et de fixation aux lysines acétylées.

(A) Arbre phylogénique illustrant les liens entre les 61 membres de la famille des protéines à Bromodomaines chez l'Homme. Les huit différentes sous-familles sont numérotées en chiffres romains (I-VIII). D'après Fillipakopoulos. et al., 2012. (B) Structure secondaire d'un domaine BD. Structure du domaine BD de la protéine à Bromodomaine CBP (en vert) et son interaction avec la lysine 20 acétylée de l'histone H4 (H4K20ac) (en jaune). D'après Sanchez R. et al., 2015. La structure de cette protéine est disponible suivant le lien : http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4n3w. (C) Zoom sur le domaine BD de la protéine à Bromodomaine CBP (en vert) au niveau de son site de liaison à la lysine 20 acétylée de l'histone H4 (H4K20ac) (en jaune). Les résidus clés de cette interaction sont représentés (N1168, Y1125 et Y1167). La liaison hydrogène entre l'Asn¹¹⁶⁸ et la lysine acétylée K20ac est illustrée par des pointillés rouges. D'après Sanchez R. et al., 2015.

Les Bromodomaines sont portés par des protéines aux activités biologiques variées telles que des HATs et leurs protéines associées comme GCN5L2 ((General Control of Amino-Acid Synthesis Protein 5)-like 2), PCAF³⁹ ou BRD9 (Bromodomain-Containing Protein 9), des HMTs telles ASH1L⁴⁰ ou encore, des facteurs co-activateurs de la transcription comme TRIM (Tripartite Motif-Containing Protein)⁴¹. La diversité dans les activités biologiques des membres de la famille des protéines à Bromodomaines peut s'expliquer par le fait que les domaines BDs sont très souvent associés à d'autres domaines d'interaction avec la chromatine tels que les domaines PHD, SAND, SET, BAH (Bromo Adjacent Homolog), TAZ Zinc Finger, ATPase ou encore des domaines hélicase par exemple, l'association avec un domaine PHD étant toutefois la plus fréquente⁴².

On estime que le génome humain code pour **46 protéines à Bromodomaines** différentes, chacune portant entre un et six domaines BDs^{43} . Parmi ces protéines, certaines sont impliquées dans des processus pathologiques tels que les cancers, certaines maladies inflammatoires ou encore la réplication virale, ceci expliquant alors l'intérêt suscité par le développement d'inhibiteurs pharmacologiques de ces Bromodomaines. Malgré sa faible affinité (K_d de 19 μ M), l'**Ischemin/MS120** fut ainsi le premier inhibiteur sélectif de Bromodomaines, contribuant à prévenir l'apoptose de cardiomyocytes en liant l'**Asn¹¹⁶⁸** de **CBP**⁴⁴. Depuis, d'autres inhibiteurs de protéines à Bromodomaines plus performants (K_d de l'ordre du nanomolaire) ont vu le jour, certains présentant même une spécificité toute particulière à l'égard des protéines à **BET Bromodomaines**, qui font justement l'objet de la présente étude.

I.3.3.b. Les protéines à BET Bromodomaines :

• Genèse, structure et fonctions des protéines à BET Bromodomaines :

Chez l'Homme, la famille de protéines à **Bromodomaines BET (Bromodomain and Extra-terminal Domain)** comprend quatre membres, très conservés à travers l'évolution, **BRD2, BRD3, BRD4** et **BRDT**, partageant tous dans leur partie N-terminale, deux Bromodomaines associés en tandem (domaines **BD1** et **BD2**). Pour un membre donné de cette sous-famille de protéines, les deux domaines BDs présentent moins de 45% d'homologie de séquence entre eux, alors que cette homologie est supérieure à 75% entre deux membres différents pour un domaine BD donné. Ces données suggèrent ainsi qu'au cours de l'évolution et de la genèse de cette famille de protéines, la duplication de ces domaines eut été un évènement antérieur à la duplication du gène initial lui-même, permettant alors de donner naissance aux quatre paralogues de cette famille⁴⁵. Alors que *BRD2, BRD3* et *BRD4* sont des gènes dont l'expression est **ubiquitaire**, celle de *BRDT* est quant à elle, restreinte au tissu testiculaire⁴⁶.

Les protéines à BET Bromodomaines sont impliquées dans les processus liés au **développement** et à l'**organogénèse** ainsi que dans les **fonctions de différenciation cellulaire** et de **reproduction**. Il a en effet été démontré que la délétion du gène *bdf1* (*bromodomain factor 1*) induisait un retard de développement chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae* et que les délétions simultanées de *bdf1* et *bdf2* étaient létales⁴⁷. Chez la Drosophile, les mutations de *fs(1)h* (*female sterile homeotic*) induisent des anormalités dans la segmentation et dans la formation des organes lors du développement embryonnaire⁴⁸. Par ailleurs, les modèles murins KO pour BRD2 ou BRD4 ne sont pas viables^{49,50} et l'élimination du domaine BD1 de BRDT induit des défauts de **spermiogénèse**⁵¹. Enfin, alors que BRD2 est impliquée dans la différenciation des oligodendrocytes, BRD3 régule quant à elle, la maturation des progéniteurs érythroïdes, notamment par l'intermédiaire de sa fixation au facteur **GATA1** acétylé⁵².

L'une des particularités de la sous-famille des protéines à **BET Bromodomaines** réside dans leur capacité de reconnaissance de **deux résidus lysines acétylées** via un seul de leurs domaines BDs, caractéristique non partagée avec les autres protéines à Bromodomaines⁵³. La mécanique de ce type d'interaction a d'ailleurs été bien détaillée sur le plan moléculaire, notamment dans le cadre de la fixation de **BRD4** aux lysines acétylées de l'histone H4, aux positions 8 et 12 (**H4K8acK12ac**) ou encore à celles des positions 12 et 16 (**H4K12acK16ac**) (<u>Figure 5A et 5B</u>). Il a ainsi été décrit que la première lysine acétylée s'arrimait directement à l'Asn¹⁴⁰ du domaine **BD1** de **BRD4**, les molécules d'eau présentes dans la cavité du Bromodomaine contribuant alors à la formation des liaisons hydrogène stabilisatrices de la seconde lysine acétylée⁵⁴.

Il est important de souligner que la grande diversité dans les fonctions biologiques assurées par les protéines à BET Bromodomaines ne réside pas uniquement dans leur simple rôle de « lectrices » du code épigénétique des histones. Ces protéines sont en effet également directement impliquées dans sa mise en place, comme l'illustre le fait que des délétions monoalléliques de BRD4 induisent une réduction des profils d'acétylation des histones⁵⁵. En dehors des domaines BDs, les autres motifs qui structurent ces protéines leurs confèrent ainsi des fonctions bien spécifiques. C'est notamment le cas de ceux retrouvés dans leur partie C-terminale, qui permettent à ces protéines d'échafaudage d'assurer le recrutement d'autres facteurs (Figure 5C). Par exemple, le domaine PID (P-TEFb Interaction Domain) de BRD4 lui permet d'interagir avec P-TEFb (Positive-Transcription Elongation Factor-b), un médiateur important dans la fixation de l'ARN polymérase II (ARN pol II) aux régions promotrices de l'ADN, au cours de l'étape d'élongation de la transcription⁵⁶. Il a par ailleurs été rapporté que le domaine acide PDID (Phosphorylation-Dependent Interaction Domain) ainsi que le domaine BID (Basic Residue-Enriched Interaction Domain), tous deux également impliqués dans les interactions protéines-protéines, permettaient le recrutement du gène suppresseur de tumeurs **p53** et l'activation de la transcription⁵⁷. Enfin, le domaine **B** de ces protéines leur permettrait non seulement de rester associées aux chromosomes durant la mitose, mais aussi de s'homo-/ hétéro-dimériser⁵⁸.

Le rôle du domaine **Extra-terminal (ET)** de ces protéines est encore mal documenté mais il a récemment été montré qu'il permettait à BRD2, -3 et -4 d'interagir avec l'histone méthyltransférase **NSD3**, l'histone déméthylase **JMJD6** (**Jumonji Domain Containing 6**) ainsi que les protéines **CHD4** (**Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4**), **GLTSCR1** (**Glioma Tumor Suppressor Candidate Region Gene 1**) et **ATAD5** (**ATPase Family, AAA Domain Containing 5**), impactant ainsi leur activité transcriptionnelle⁵⁹. Ce domaine permet également l'interaction de BRD4 avec certaines protéines du complexe **Mediator** ainsi que les **cohésines**, participant alors à l'organisation de la structure tridimensionnelle de la chromatine⁶⁰.



Figure 5 | Les BET Bromodomaines : Caractéristiques structurales des domaines de reconnaissance et de fixation aux lysines acétylées et organisation structurale des différents domaines de la famille des protéines à BET Bromodomaines.

(A) Zoom sur le domaine BD1 de BRD4 (en vert) au niveau de son site de liaison aux lysines acétylées de l'histone H4 (H4K12acK16ac) (en jaune). Les résidus clés de cette interaction sont représentés (N140, Y97 et Y139). La liaison hydrogène entre l'Asn¹⁴⁰ et la lysine acétylée K12ac est illustrée par des pointillés rouges. D'après Sanchez R. et al., 2015. La structure de cette protéine est disponible suivant le lien : http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3uvx. (B) Conservation des sites de liaison aux lysines acétylées au sein des domaines BDs chez l'Homme. La structure ainsi que la conservation des séquences du domaine BD1 de BRD4 sont représentées. Les positions les plus conservées sont représentées en vert, les moins conservées en blanc; d'après une analyse de comparaison de l'alignement de séquences multiples de tous les domaines BDs humains. D'après Sanchez R. et al., 2015. (C) Les domaines conservés entre les membres de la famille des protéines à BET Bromodomaines (BRD2, -3, -4 et -T) sont illustrés en couleur: on distingue ainsi les Bromodomaines BD1 et BD2 impliqués dans la reconnaissance des lysines acétylées (violet), les motif ET, A et B, impliqués dans les interactions protéines-protéines (orange et bleu respectivement), la région SEED, riche en acides aminés Ser/Glu/Asp (rouge) et le domaine PID de BRD4 (vert). Les régions PDID (Phosphorylation-Dependent Interaction Domain) et BID (Basic Residue-Enriched Interaction Domain), également conservées entre les différents membres, sont soulignées. Le nombre d'acide aminés composant chaque membre de la famille des protéines à BET Bromodomaines est également indiqué. Modifié d'après Jung M. et al., 2015.

• Protéines à BET Bromodomaines et pathologies :

De par les multiples **interactions** auxquelles elles participent, ces protéines sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques, leur rôle étant particulièrement bien documenté dans les contextes d'**infections virales** ainsi que les **cancers**.

Il est en effet désormais clairement établi que les **virus** les utilisent en les détournant de leurs fonctions cellulaires, au profit de l'activation de leur propre machinerie transcriptionnelle. A titre d'exemple, la fixation de la protéine E2 du **Papillomavirus Bovin de Type 1 (PBV1)** sur BRD4, lui permet d'assurer ses fonctions d'activation de la transcription, ainsi que le maintien de l'intégrité de son génome viral⁶¹.

Une dérégulation de l'expression des protéines à BET Bromodomaines favorable à la progression tumorale a été rapportée dans de nombreux cancers, BRD4 étant surexprimée dans les mélanomes primaires et métastatiques par exemple⁶². Par ailleurs, les oncogènes de fusion BRD3-NUT et BRD4-NUT sont à l'origine de l'agressivité des carcinomes de la ligne médiane (NMC, NUT Midline Carcinoma)⁶³. En activant la transcription de nombreux oncogènes, les protéines à BET Bromodomaines initient et entretiennent la progression tumorale des cancers : on sait notamment qu'elles induisent l'expression des facteurs de transcription C-Myc et E2F dans les cancers hématopoïétiques, celle de NF-κB (Nuclear Factor-kappa B) dans le cancer du sein, celle de N-Myc et Gli1 dans le neuroblastome et le médulloblastome, celle de FOSL1 (Fos-Like Antigen 1) et de la protéine de structure HMGA2 (High-Mobility Group AT-Hook 2) dans les cancers pancréatiques, ou encore qu'elles contrôlent l'expression de la kinase mitotique Aurora B ainsi que celle de la Cycline D1⁶⁴. Dans le cancer du sein, il a été décrit que BRD3 et -4 avaient la capacité de se fixer au promoteur du récepteur aux œstrogènes ER alpha (ERα), impactant en conséquence l'expression de ses gènes cibles⁶⁵. De plus, dans le cancer de la prostate, BRD2, -3 et -4 se lient aux Récepteurs aux Androgènes (ARs) et contribuent à l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-2⁶⁶. Enfin, l'interaction de BRD4 avec la sous-unité RelA du complexe NF-KB contribuerait à la prolifération cellulaire des adénocarcinomes pulmonaires⁶⁷.

A l'inverse, les protéines à BET Bromodomaines peuvent également exercer un effet inhibiteur de l'expression de gènes **suppresseurs de tumeurs**, comme cela a été démontré dans les mélanomes, dans lesquels BRD4 s'oppose à la transcription de **p21** et de **p27**⁶². BRD4 peut aussi s'associer avec certaines protéines du complexe **Condensine II**, réduisant ainsi l'activation de la voie de réparation des dommages à l'ADN, favorable à la poursuite du cycle cellulaire⁶⁸.

Les protéines à BET Bromodomaines favorisent également la dissémination métastatique, comme en témoigne une étude récente menée dans le cancer du sein⁶⁹. Il est ainsi rapporté que l'interaction du domaine **BD2** de **BRD4** avec le facteur de transcription **Twist** di-acétylé, permette d'induire l'expression de **Wnt5a** (**Wingless-Type MMTV**)

Integration Site Family, Member 5a), contribuant ainsi à la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM). La prolifération des cellules cancéreuses étant par ailleurs corrélée au processus de stress oxydatif, il est également intéressant de souligner que BRD4 se lie aux régions promotrices du gène *HMOX1* (Heme Oxygenase (Decycling) 1), impliqué dans les mécanismes de protection contre ce stress, influençant alors l'activation de la voie **KEAP1/NRF2** (Kelch-like ECH-Associated Protein 1/Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-like 2)⁷⁰.

Devant tant de preuves de leur implication dans les cancers, le développement d'inhibiteurs spécifiques de ces protéines est en plein essor depuis 2010. Des techniques de screening d'activité d'Apolipoprotéine A-1 (Apo A-1) au sein de banques de molécules thérapeutiques ont ainsi permis aux groupes pharmaceutiques du Structural Genomic Consortium et de GlaxoSmithKline (GSK), d'identifier que JQ1 et I-BET présentaient de telles propriétés inhibitrices des BET Bromodomaines (Figure 6). Ces deux triazolodiazépines hydrosolubles présentent en effet des propriétés d'inhibiteurs compétitifs spécifiques des BET Bromodomaines, via leur capacité de fixation directe à la poche de reconnaissance des lysines acétylés. Ces composés présentent une affinité identique pour les domaines BD1 et BD2 mais celle de JQ1 est meilleure à l'égard de BRD4 ($K_d = 50$ nM) comparée aux autres protéines à BET Bromodomaines (K_d allant de 60 à 190 nM)³⁶.



Figure 6 I Structure chimique des deux inhibiteurs spécifiques de BET Bromodomaines, JQ1 et I-BET :

D'après Hewings et al., 2011.

I.3.4. L'ARN interférence (4) :

I.3.4.a. Les ARNs non-codants :

Bien que la portion codante du génome humain soit estimée à **1,2%** seulement, la partie non traduite reste tout de même le support d'une information génétique « **utile** » et « **exploitée** », dont la transcription est nécessaire à tout un ensemble de fonctions cellulaires. Chez les Mammifères, il apparaîtrait ainsi qu'environ **98%** de l'activité transcriptionnelle aboutisse à la production d'**ARNs non codants (ncARNs)**⁷¹. Ces ARNs furent ainsi pendant longtemps assimilés à de simples débris ou à du « bruit de fond génétique», dépourvu de toute propriété biologique particulière⁷². Même si certaines de leurs fonctions demeurent encore obscures, on sait désormais qu'il en existe plusieurs sous-catégories, agissant très souvent par l'intermédiaire de **complexes protéiques**.

Parmi ces différentes catégories, on peut citer les **ARNs ribosomiques (ARNr)**, associés aux petites et aux grandes sous-unités des ribosomes, ainsi que les **petits ARNs nucléolaires (snoARNs** ou small nucleolar RNAs) qui contribuent à la maturation des précédents. On peut également mentionner les **ARNs de transfert (ARNt)**, qui interviennent dans la traduction protéique ou encore les **petits ARNs nucléaires (snARNs** ou small nuclear RNAs), qui participent aux mécanismes d'épissage des ARNm. Enfin, il existe aussi les **larges ARNs non-codants intergéniques (LincARNs** ou large intergenic non-coding RNAs), impliqués dans la différenciation et le maintien de l'identité cellulaire ou encore les **ARNs qui interagissent avec les protéines Piwi (piARNs** ou Piwi interacting RNAs) qui jouent, quant à eux, un rôle dans l'inhibition de l'expression des rétro-éléments mobiles de l'ADN lors des phases embryonnaires. Une toute nouvelle classe d'ARNs non-codants a récemment été découverte, les **ARNs circulaires (circARNs**), qui permettraient de réguler les pools d'ARNs non-codants endogènes en les piégeant, un peu à la manière d'« éponges ».

Les **microARNs** (**miARNs**) sont une autre sous-catégorie de ces ncARNs dont les fonctions de petits **régulateurs épigénétiques** ont été largement étudiées ces dernières années. Cette thèse ne traitera que de ce type de ncARNs et s'attachera à mettre en lumière leur rôle d'« **ARNs interférents** », plus particulièrement dans un contexte **d'échappement tumoral** mettant en jeu les mécanismes de **dissémination métastatique** et de **chimiorésistance**.

I.3.4.b. Historique de l'ARN interférence :

Le dernier **mécanisme épigénétique** dont il sera ainsi question dans ce travail de thèse concerne la régulation de l'expression génique au niveau **post-transcriptionnel** par **ARN interférence-dépendante des miARNs (4)**.
Le mécanisme épigénétique d'ARN interférence a été découvert en 1990 par les botanistes américains Napoli et Jorgensen, de façon tout à fait fortuite, alors qu'ils cherchaient à accentuer la couleur violette de Pétunias, en introduisant le gène de la Chalcone Synthase (CHS) chez ces plantes⁷³. Contrairement à l'effet recherché, ils obtinrent une variété dont les fleurs étaient complètement blanches, comme si cette manipulation génétique avait empêché l'expression de la CHS endogène. Ce n'est que huit ans plus tard, suite à des travaux réalisés chez le Nématode C.elegans, que les intermédiaires moléculaires à l'origine de ce mécanisme, les ARNs doubles brins, furent identifiés et que le terme d'ARN interférence apparut⁷⁴. En 2001, les études de Tuschl et al., menées sur des extraits cellulaires d'embryons de Drosophile, permirent d'affiner la caractérisation de ces intermédiaires, précisant alors qu'il s'agissait de petits ARNs double brins d'une vingtaine de nucléotides de long, dénommés siARNs (small interfering RNA)⁷⁵. L'implication de l'endonucléase Dicer (de l'anglais « to dice », signifiant « couper en dés ») dans la biogénèse de ces molécules ainsi que leur couplage avec le complexe protéique RISC (RNA-Induced Silencing Complex), furent identifiés par la suite^{76,77}. On sait désormais que les mécanismes épigénétiques d'ARN interférence dépendant des siARNs interviennent en premier lieu dans la défense des organismes eucaryotes contre les acides nucléiques étrangers tels que les virus pathogènes, les éléments transposables ou les transgènes^{78,79}. Bien que partageant de nombreux points communs avec les siARNs, les miARNs présentent aussi des caractéristiques propres et les mécanismes d'ARN interférence par lesquels ils agissent leur permettent de contrôler finement l'expression génique endogène.

I.3.4.c. Les microARNs :

• <u>Généralités sur les microARNs ; fonctions, historique et composante</u> <u>génétique :</u>

Les **miARNs** sont de **petits régulateurs épigénétiques** dont la découverte est relativement récente au regard de l'Histoire de la Biologie : le premier à avoir été identifié, *Lin-4*, fut ainsi mis en évidence en **1993** par l'équipe de Lee et al., des suites de leurs études développementales menées chez le vers *C. elegans⁸⁰*. Ce groupe a ainsi pu démontrer que ce miARN inhibait l'expression du gène *Lin-14* chez ce Nématode, son implication dans la régulation de ses **stades larvaires** ainsi que son lien avec la voie de l'**IGF-1 (Insulin Growth Factor 1)** n'étant établis qu'un peu plus tard⁸¹. En 2000, *let-7 (lethal-7)*, fut ensuite identifié dans ce même modèle, comme répresseur de *Lin-4⁸²*. Depuis ces premières études, le nombre de miARNs identifié n'a cessé de croître ; d'après les dernières mises à jour de la base de données miRBase (juin 2014), **28 645** miARNs auraient ainsi été répertoriés, tant chez les animaux que les plantes, les bactéries ou les virus (<u>http://www.miRBase.org</u>). Ces

molécules sont par ailleurs très conservées à travers l'évolution, comme peut en témoigner la grande homologie de leurs séquences, retrouvée chez différentes espèces.

Les miARNs sont impliqués dans presque tous les processus biologiques fondamentaux, tels que le développement, la prolifération cellulaire, la différenciation, le contrôle du cycle cellulaire ou encore l'apoptose⁸³. D'une taille d'environ **21-22 nucléotides** de long, ces petits ARNs non-codants présentent des fonctions d'inhibiteurs de l'expression génique, relayées par leurs capacités de fixation à la partie 3' non traduite (3'UTR, Untranslated Region) des ARNm qu'ils ciblent. Contrairement aux siARNs, l'appariement des miARNs à leurs cibles n'est pas toujours total, le degré de complémentarité de leurs séquences avec celles de leurs ARNm-cibles conditionnant alors leur mécanisme d'action. Deux processus distincts coexistent ainsi; une parfaite complémentarité de bases entre miARN et ARNm-cible induit la dégradation de ce dernier, alors qu'une complémentarité imparfaite conduirait plutôt à **un blocage de la machinerie traductionnelle**⁸⁴. L'orientation vers l'un ou l'autre de ces mécanismes dépend en particulier de la nature des nucléotides des positions 2 à 8 du miARN, définissant une région appelée « seed sequence », déterminante dans la précision du ciblage des transcrits à inhiber⁸⁵. Par ailleurs, un même miARN possédant plusieurs centaines de cibles, ces molécules se positionnent comme des médiateurs fondamentaux dans la régulation des fonctions cellulaires. Ils peuvent ainsi moduler de façon très fine des cascades de signalisation complètes, leurs cibles pouvant en effet appartenir à une même voie de signalisation ou bien à des voies différentes, dont l'activation converge vers des fonctions cellulaires identiques.

Chez les Métazoaires, la plupart des gènes codant pour les miARNs sont organisés en clusters, majoritairement transcrits sous forme d'ARNs polycistroniques à partir de séquences introniques⁸⁶. Une étude portant sur l'analyse de 232 miARNs de Mammifères rapporte en effet qu'environ 56% des *loci* de ces miARNs seraient situés dans les introns de gènes codants, 17% étant quant à eux localisés dans ceux de ncARNs⁸⁷. D'une manière générale, les *loci* des miARNs sont transcrits de façon unidirectionnelle même si quelques cas de transcription bidirectionnelle ont toutefois été rapportés, chez les Insectes tels que la Drosophile et le Scarabée par exemple. C'est ainsi le cas des miARNs du *locus* iab-4/iab-8, dont l'implication dans la régulation de l'expression des gènes homéotiques de la famille Hox détermine l'organisation de l'axe antéropostérieur de ces Insectes ⁸⁸. Par ailleurs, d'un point de vue fonctionnel, il est important de souligner que la transcription des miARNs à partir d'introns sous-entende que leurs cibles présentent des fonctions antagonistes à celles de leur gène hôte⁸⁹.

<u>Biogénèse des microARNs :</u>

Chez les animaux, la biogénèse des miARNs est un processus **multi-étapes** impliquant la génération de précurseurs à la structure caractéristique, dite « en épingle à cheveux », maturés par la suite en miARNs biologiquement actifs (**Figure 7**).

Dans un premier temps, les miARNs sont transcrits en **pri-miARN** (<u>Figure 7, étape 1</u>) par l'**ARN polymérase II** (**ARN pol II**)⁹¹. Ces pri-miARNs sont de longs transcrits primaires présentant une structure en tige-boucle (ou épingle à cheveux), s'étendant sur environ **33 nucléotides** imparfaitement appariés⁸³. A la manière des ARNm, les pri-miARNs sont **cappés** dans leur partie 5' et **polyadénylés** dans leur partie 3'⁹².

Le pri-miARN est ensuite clivé en pre-miARN (Figure 7, étape 2), d'environ 65 nucléotides de longueur, par le complexe endonucléasique DROSHA (RNase III-like enzyme)⁹³. DROSHA reconnaît et clive ainsi les pri-miARNs juste à la jonction de leurs structures tiges-boucles. Il est par ailleurs décrit que cette enzyme est associée à plusieurs autres protéines, formant des complexes nucléaires aux fonctions biologiques variées : on retrouve ainsi au sein de ces complexes des hélicases à ARNs (capables de dérouler les structures en double-hélices des acides nucléiques), des ribonucléoprotéines et des protéines de la famille du Sarcome d'Ewing (famille des gènes EWS). Dans le contexte de maturation du pri-miARN en pre-miARN, les cofacteurs associés à DROSHA tels que DGCR8 (Di George Critical Region 8) par exemple, permettent la formation d'un complexe appelé le Microprocesseur. On peut souligner que ces cofacteurs portent notamment des domaines dsRBD (double strand RNA-Binding Domains), qui interviennent dans la stabilisation des complexes ARNs-protéines⁹⁴. Sur le plan mécanistique, il est décrit que DGCR8 interagit de façon directe avec la structure tige-boucle du pri-miARN ainsi qu'avec une petite portion des segments simples brins qui l'entourent⁹⁵. De cette manière, ce facteur positionne le site catalytique de DROSHA à la bonne distance de la base de la tige-boucle, assurant ainsi un clivage précis du pri-miARN en pré-miARN.

Le **pré-miARN** est ensuite exporté hors du noyau par l'intermédiaire du complexe dépendant de la GTPase Ran, **Exportin 5** (Figure 7, étape 3)⁹⁶. Une fois dans le **cytoplasme**, il est finalement clivé par l'enzyme **DICER** (RNase III-like), associée à son cofacteur, la protéine **TRBP** (**TAR RNA Binding Protein**). L'interaction entre l'extrémité 3' du **pré-miARN** et le domaine **PAZ** (**PIWI**, **AGO**, **Zwille**) de DICER détermine ainsi l'ultime site de clivage, générant un duplexe **miARN/miARN*** (brin guide/brin passager) de **21-22** nucléotides environ (Figure 7, étape 4)⁷⁹.

Le **brin guide** du miARN est finalement pris en charge par le complexe **RISC** (**RNA Induced Silencing Complex**)⁹⁷ (<u>Figure 7, étape 5</u>) alors que le miARN* (brin passager) est dégradé⁹⁸. La détermination du brin guide au sein du complexe miARN/miARN* repose sur des contraintes thermodynamiques, celui présentant la partie 5' terminale la plus instable

étant alors sélectionné⁹⁹. Ce dernier interagit enfin avec la protéine **Argonaute**, **Ago2** du complexe **RISC**, les fonctions de reconnaissance et de clivage de ces deux partenaires permettant alors la **dégradation** ou l'**inhibition de la traduction** des **ARNm cibles complémentaires du miARN**. Une étude de 2008 suggère que même si ces deux types de mécanismes inhibiteurs coexistent, la répression de l'expression des gènes induite par les miARNs serait, par défaut, due à une **inhibition de la traduction** plutôt qu'à une **dégradation des ARNm** (Figure 7, étape 6)¹⁰⁰.



Figure 7 I Représentation schématique des différentes étapes de la biogénèse des miARNs:

Modifiée d'après Baulina NM. et al., 2015.

Le pri-miARN est d'abord transcrit par l'ARN Polymérase II, le plus souvent à partir des introns des gènes (1). Le pri-miARN est ensuite clivé en pré-miARN par le complexe Microprocesseur (DROSHA/DGCR8) (2), puis exporté hors du noyau par l'Exportin 5 Ran-GTPase-dépendante (3). Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN est clivé par le complexe DICER/TRBP (4), générant le duplexe miARN/miARN*. Le miARN* est dégradé alors que le miARN guide, mature, est incorporé au complexe RISC (5), au sein duquel il pourra reconnaître ses ARNm-cibles. Selon le degré de complémentarité entre le miARN et ses transcrits-cibles, le complexe RISC conduira à l'inhibition de la traduction protéique des ARNm-cibles ou bien à leur dégradation (6). Les exons 1 et 2 illustrés ici sont ceux du gène hôte du miARN intronique.

II. LE TISSU OSSEUX

II. Le tissu osseux :

II.1. L'os : des fonctions protectrices, mécaniques et métaboliques :

Au sein du règne animal, le **squelette** est l'apanage des **Vertébrés** : bien que celui-ci apparaisse comme une structure inerte, l'os est néanmoins un tissu dynamique, essentiel au bon fonctionnement de ces organismes de part les fonctions **biomécaniques** et **métaboliques** qu'il assure. Le squelette est en effet la **charpente** du corps, permettant de **protéger** les organes internes, comme c'est le cas de la cage thoracique vis-à-vis du cœur et des poumons par exemple, de la boîte crânienne vis-à-vis de l'encéphale ou encore des corps vertébraux vis-à-vis de la moelle épinière. Il assure également la **motricité** et la **locomotion** via les insertions musculaires et tendineuses qu'il porte, lui permettant de transmettre les forces musculaires nécessaires aux mouvements. Physiologiquement, le tissu osseux joue un rôle clé dans l'immunité (la moelle osseuse étant le siège de l'**hématopoïèse**), mais aussi dans le **métabolisme minéral**. Il constitue en effet le principal réservoir d'ions minéraux de l'organisme et est un des acteurs principaux dans l'**homéostasie phosphocalcique** des fluides extracellulaires, les sels minéraux y étant puisés ou stockés selon les besoins.

Par ailleurs, l'os n'est pas un tissu figé, mais bien au contraire, en perpétuel renouvellement tout au long de la vie. Il est ainsi continuellement soumis à un mécanisme nommé « **remodelage osseux** », impliquant des cellules spécialisées et au cours duquel la matrice osseuse âgée est dégradée (par les **ostéoclastes**) puis remplacée (par les **ostéoblastes** et les **ostéocytes**). Des paramètres d'ordres **mécaniques** et **moléculaires** contrôlent ces phases, dites de « **résorption** » osseuse et « d'**apposition** » de néo-matrice osseuse, modulant ainsi la masse de l'os et lui permettant de s'adapter aux besoins de l'organisme.

II.2. Structure et composition de l'os :

D'un point de vue histologique, le tissu osseux est un tissu conjonctif solidifié, hautement spécialisé, constitué d'une **portion cellulaire** incluant les **ostéoblastes**, les **ostéoclastes**, les **ostéocytes** et les **cellules bordantes** (le rôle de chacun de ces types de cellules et les interactions qu'elles entretiennent entre elles seront développés plus tard dans ce manuscrit), ainsi que d'une **portion extracellulaire**, elle-même divisée en deux sous-types de matrices extracellulaires (<u>Table 1</u>). Ces dernières correspondent à 65% en une **fraction minérale (1)**, la **fraction organique (2)** composant les 25% restant.

Composée de **sels de phosphate de calcium**, la **fraction minérale (1)** de la matrice extracellulaire est responsable de la dureté de l'os. Ces sels sont précipités sous la forme de **cristaux d'hydroxyapatite** $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ et constituent ainsi le réservoir principal de l'organisme en ions **calcium** (99%) et **phosphore** (88%)¹⁰¹. Par ailleurs, chez l'Homme, le tissu osseux fournit également 50% de **magnésium** et 80% de **carbonates**.

La fraction organique (2) de cette matrice se distingue par une partie principale, fibrillaire, composée à 95% de collagène de type I, auquel viennent également s'ajouter des fibres de collagène de type III, mais aussi des protéines de structure et d'adhérence telles que la fibronectine ou l'élastine (Table 1). Cette partie fibrillaire est entourée d'une matrice dite extra-fibrillaire, au sein de laquelle diverses protéines sont présentes : c'est le cas des protéoglycanes (fibromoduline, biglycan, décorine), glycosaminoglycanes et glycoprotéines par exemple, qui vont intervenir dans les mécanismes de diffusion des nutriments, mais également de l'ostéocalcine, qui joue un rôle clé dans la minéralisation, en permettant le recrutement des ostéoclastes au niveau des sites de résorption (Table 1). L'ostéopontine et les BSPs (Bone Sialoproteins), impliquées quant à elles, dans les phénomènes d'adhérence des ostéoclastes à la matrice, sont également présentes dans cette fraction. Ces protéines possèdent un domaine RGD (arginine/glycine/acide aspartique), caractéristique d'un pouvoir de fixation aux intégrines¹⁰², elles-mêmes retrouvées à la surface des ostéoclastes¹⁰³. De nombreuses cytokines et facteurs de croissance comme le TGF-β (Transforming Growth Factor-β), les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), le TNF (Tumor Necrosis Factor) ou l'IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) par exemple, entrent également dans la composition de cette fraction et régulent la différenciation et les activités biologiques des ostéoblastes et des ostéoclastes.

D'un point de vue **architectural**, les matrices **extracellulaires minérales** et **organiques** sont intimement liées puisque les cristaux d'hydroxyapatite constituant la première sont intercalés et orientés par les fibres de collagène de la deuxième.

TISSU OSSEUX	portion cellulaire	ostéoblastes	cellules bordantes	ostéocytes	ostéoclastes
				Y	38
	portion extra- cellulaire	fraction minérale (65%)		cristaux d'hydroxyapatite (Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂), phosphore, calcium, magnésium, carbonates	
				fraction fibrillaire	collagène I
		fraction organique (25%)			<u>protéines de structure et</u> <u>d'adhérence</u> (fibronectine, élastine)
				fraction extra- fibrillaire	protéoglycanes (fibromoduline, biglycan, décorine) <u>diffusion des</u> <u>nutriments</u>
					glycosaminoglycanes
					glycoprotéines (BSP, ostéopontine) <u>adhérence</u>
					ostéocalcine <u>minéralisation</u>
					cytokines et facteurs de croissance (TGF-β, BMP, TNF, IGF-1) <u>différenciation</u> <u>ostéoblastique et</u> <u>ostéoclastique</u>

Table 1 I Tableau récapitulatif des différents constituants de la matrice osseuse :

Images tirées du site http://www.servier.fr

BMP: Bone Morphogenic Protein; BSP: Bone Sialoprotein; IGF-1: Insulin Growth Factor-1; TGF-β: Transforming Growth Factor-β; TNF: Tumor Necrosis Factor.

Les proportions des cases de cette table ne respectent pas la part de chaque portion (cellulaire ou extracellulaire, minérale ou organique) au sein du tissu osseux.

II.3. Organisation macroscopique de l'os :

Sur un **plan macroscopique**, les os **longs** chez l'adulte sont organisés autour d'un corps central appelé **diaphyse**, encadré à ses extrémités proximales et distales par des **épiphyses**, elles-mêmes entourées de cartilage (**Figures 8A et 8B**). Diaphyses et épiphyses sont connectées par des parties intermédiaires coniques, les **métaphyses**. A l'exception de ses surfaces articulaires, l'os cortical est ceint par des tissus richement vascularisés, d'origines mésenchymateuses, l'endoste et le **périoste**, impliqués dans la croissance de l'os dans son épaisseur (**Figures 8B et 8C**). L'endoste est le tissu conjonctif qui tapisse la surface interne de l'os cortical alors que le périoste recouvre sa face externe. Ce dernier assure l'approvisionnement du tissu osseux en **cellules souches mésenchymateuses** (dont dérivent les ostéoblastes) et permet également l'innervation de l'os en fibres sensitives et sympathiques.

II.4. Genèse, classification et organisation structurale de l'os lamellaire :

Au cours du développement embryonnaire et tout au long de la vie, plusieurs types de tissus osseux sont formés.

Dans les **ébauches osseuses fœtales**, on distingue ainsi le tissu osseux **primaire**, **non lamellaire** (ou **réticulaire**), qu'on qualifie de la sorte car, bien qu'étant minéralisée, sa trame collagénique ne présente **pas d'orientation spécifique**. Ce type de tissu osseux subsiste à l'âge adulte dans les osselets de l'oreille moyenne (*malleus*, *incus* et *stapes*), mais aussi de **façon transitoire**, dans les cals de fracture, générés lors du processus de cicatrisation osseuse.

Le tissu osseux **lamellaire**, issu du précédent type, doit son nom à l'organisation sous forme de **lamelles** de ses fibres de **collagène**. On le retrouve dans les os **longs** (humérus, fémur), **courts** (triquetrum), **irréguliers** (vertèbres) et **plats** (côtes, sternum) (<u>Figure 8A</u>). Ce tissu lamellaire est lui-même subdivisé en **deux sous-types**, l'os **spongieux** (1) et l'os **cortical** (2), qui permettent de définir la topographie osseuse (<u>Figure 8B, 8C et 8D</u>).

Le premier sous-type est l'os **spongieux** ou **trabéculaire** (1) : hébergeant la moelle, il présente un aspect très **alvéolaire** et est retrouvé en **partie centrale** des pièces osseuses, principalement au niveau des métaphyses et des épiphyses des os longs (Figure 8B, 8C et <u>8D</u>). Il présente une architecture caractérisée par un ensemble de plaques osseuses unies les unes aux autres par des piliers. Ces structures sont composées de **lamelles osseuses**, formées par superposition d'**ostéocytes** et tapissées de **cellules bordantes**. Les espaces entre ces structures abritent les **progéniteurs hématopoïétiques** de la moelle.

Le second sous-type est l'os **compact** ou **cortical (2)** qui délimite la pièce osseuse dans sa **partie corticale**. Son épaisseur est variable et dépend de l'importance des contraintes mécaniques auxquelles l'os est soumis. Cet os présente une topographie particulière sous forme d'**ostéons** (ou **systèmes de Havers**), parallèles au grand axe de la cavité médullaire osseuse, chacun correspondant à des unités cylindriques organisées en fuseaux (Figure 8D). Leur diamètre varie de 100 µm à 1 mm et ils mesurent de quelques millimètres à 1 cm de long. Ces ostéons sont organisés en une succession de cinq à quinze lamelles osseuses concentriques, traversées en leur centre par le canal de Havers et délimitées en périphérie par une ligne dite « cémentante ». Un capillaire sanguin et une fibre nerveuse amyélinique circulent à l'intérieur du canal de Havers. Chaque lamelle concentrique constituant un ostéon contient des fibres de collagène de type I, parallèles les unes aux autres, disposées de façon hélicoïdale et oblique par rapport au canal de Havers (Figure 8D). Par ailleurs, chaque lamelle contient également des ostéocytes, organisés de la même manière. Les propriétés de solidité et de flexibilité intrinsèques de l'os sont assurées par le changement d'orientation des fibres de collagène d'un angle de 90°, d'une lamelle sur l'autre. Sur le plan cellulaire, chaque ostéon constitue une entité indépendante dans la mesure où il n'existe pas de communication entre les ostéocytes de deux ostéons différents. En revanche, des jonctions communicantes entre les ostéocytes d'un même ostéon sont établies. Par ailleurs, les canaux de Havers de plusieurs ostéons communiquent entre eux par l'intermédiaire de canaux obliques, de plus gros diamètres, les canaux de Volkmann, qui s'abouchent dans la cavité médullaire de l'os (Figure 8D). Les cellules qui tapissent l'intérieur des canaux de Havers et de Volkmann sont nommées les cellules bordantes.

Figure 8 : Α Os long (humérus) В Osplat (sternum) Os spongieux (ou trabéculaire) Rei Epiphyse Os irrégulier proximale (vertèbre en vue **Cartilage articulaire** latérale gauche) Métaphyse Oscourt Ligne épiphysaire (triquetrum) Périoste Os compact С Cavité médullaire Endoste -Os trabéculaire Diaphyse Cavité médullaire Artère nourricière (dans un trou nourricier) Moelle osseuse Métaphyse Os compact (ou cortical) Périoste Epiphyse Fibres perforantes (de Sharpey) distale Artères nourricières Artère/veine se Structures ramifiant en au centre capillaire D du canal Fibre nerveuse de Havers amyélinique Lamelles Ostéon Fibres de concentriques Ostéocyte collagène de type I (disposition hélicoïdale) Ligne cémentante Jonction communicante entre ostéocytes Ostéon (Système de Havers) Lacune 100 um-1 mm de diamètre Canalicule Lamelles **Canal de Havers** intersticielles Os cortical Lamelles Os spongieux (5-15) (cavité médullaire) Vaisseau sanguin d'un canal Ostéon de Volkmann s'abouchant dans la cavité médullaire Os spongieux Trabécule **Fibres de Sharpey** Os cortical Lacune Vaisseaux sanguins du périoste Lamelles **Canal de Havers** Canal de Havers Périoste intersticielles Canal de Volkmann Vaisseau sanguin Cellules bordantes tapissant les canaux de Havers et de Volkmann

Figure 8 | Représentations schématiques et organisation structurale de l'os lamellaire composant le squelette humain:

Modifiée d'après le site http://classes.midlandstech.edu.

(A) Nature et exemples des différents os de type lamellaire du corps humain (os longs, courts, plats ou irréguliers). (B) Représentation schématique de l'organisation structurale des os de type lamellaire. Une vue d'un os long entier ainsi que des représentations en coupe à différentes échelles détaillent l'organisation des os lamellaires, divisés en os cortical et trabéculaire (C et D). L'os cortical, délimité par son périoste, encadre le réseau trabéculaire de l'os spongieux. Des photos illustrent la partie minérale de l'os spongieux ainsi que la structuration en os cortical et trabéculaire, d'un os en coupe (Miniatures figure 8B et 8C respectivement). L'organisation en ostéons de l'os cortical est également illustrée (Miniatures gauche et centrale de la figure 8D). L'irrigation sanguine est assurée au sein du tissu osseux par un ensemble de vaisseaux cheminant entre les trabécules de l'os spongieux, ainsi que dans les canaux de Volkmann et de Havers, l'organisation de ces derniers étant également précisée sur ce schéma (Miniatures gauche et centrale de la figure 8D). Une représentation d'une vue en coupe des canaux de Havers est également illustrée (Miniature droite de la figure 8D).

II.5. Composante cellulaire de l'os lamellaire :

La portion cellulaire du tissu osseux est constituée de **quatre différents types** de cellules, les **ostéoblastes**, les **ostéoclastes**, les **ostéocytes** et les **cellules bordantes**, dont l'étroite communication qu'elles entretiennent les unes avec les autres revêt une importance capitale dans la dynamique du remodelage de l'os tout au long de la vie.

II.5.1. Ostéoblastes, cellules bordantes, ostéocytes et apposition osseuse :

Tout comme les lignées fibroblastiques, chondroblastiques, adipocytaires et tendinocytaires, les **ostéoblastes** sont issus de la différenciation de **cellules souches mésenchymateuses (CSMs)** et sont responsables de la formation de la **matrice osseuse organique** ou « **apposition osseuse** »¹⁰⁴.

Dans leur état de quiescence, les ostéoblastes sont dénommés **cellules bordantes** et tapissent la surface de cette matrice (**Figure 9**). Ils s'organisent alors en une monocouche et présentent un cytoplasme aplati et peu développé, car pauvre en organites intracellulaires. Sous l'impulsion de *stimuli* mécaniques et/ou chimiques, les **cellules bordantes** se différencient en **ostéoblastes**, de forme plus cubique, pouvant alors synthétiser la néomatrice osseuse sur des surfaces de cartilage calcifié ou de tissu osseux préexistant¹⁰⁵.

Les ostéoblastes possèdent un réticulum endoplasmique granuleux (REG), des ribosomes libres, un appareil de Golgi et un réseau mitochondrial très développés. L'ensemble de ces organites leur permet ainsi d'assurer une importante activité de synthèse protéique, nécessaire à la production de la matrice organique extracellulaire. Cette dernière est sécrétée au pôle basal des ostéoblastes (ou **bordure ostéoïde**) et la nature de ses constituants varie selon leur stade de différenciation. On peut ainsi y retrouver du **collagène de type I**, des **protéoglycanes**, des **glycoprotéines**, de l'**ostéocalcine (OCN)** et de l'**ostéopontine (OPN) (Figure 9**). Toutes ces molécules sont sécrétées par l'intermédiaire de **vésicules matricielles** qui contiennent également des enzymes (pyrophosphatases et phosphatases alcalines (ALPs)) et des ions (calcium et phosphate). Les **cristaux d'hydroxyapatite** constituant la matrice osseuse sont formés par la précipitation de ces ions au sein des vésicules matricielles, formant alors des structures partiellement minéralisées lors de leur sécrétion, appelées **germes de minéralisation**. L'accumulation de ces germes permettra ensuite la formation d'une néo-matrice osseuse totalement minéralisée, ce processus étant alors appelé « accrétion ».

Le stade de différenciation terminal de l'ostéoblaste est l'**ostéocyte**, dont le REG et l'appareil de Golgi sont beaucoup moins développés que ceux de son précurseur. Les ostéocytes sont emmurés dans la matrice organique minéralisée produite par les ostéoblastes, au sein d'une logette appelée **ostéoplaste** (<u>Figure 9</u>). Bien qu'enchâssés dans la matrice minéralisée, les ostéocytes établissent des liaisons entre eux ainsi qu'avec les ostéoblastes de surface via des **jonctions communicantes**. Ces cellules présentent

également de fins prolongements cytoplasmiques cheminant dans la matrice, à travers de longs **canalicules**. Même si, biologiquement, les ostéocytes correspondent à des ostéoblastes âgés, ils n'en demeurent pas moins pleinement impliqués dans l'orchestration du remodelage osseux. Leurs **intégrines** de surface leur permettent en effet d'interagir avec les fibres de collagène qui tapissent les ostéoplastes, ceci leur conférant un rôle de senseur des contraintes mécaniques exercées sur la matrice organique minéralisée¹⁰⁶. Faisant écho à leur rôle de **mécanorécepteurs**, ils sont aussi dotés de **capacités sécrétoires** (sclérostine soluble notamment), leur permettant de moduler la différenciation et l'activation des ostéoblastes de surface¹⁰⁷.



Figure 9 l Représentation schématique des étapes de l'activation et de la différenciation des Ostéoblastes :

Images tirées du site http://www.servier.fr

Les Ostéoblastes matures sont issus de l'activation des cellules bordantes alors que les ostéocytes correspondent au stade de différenciation terminal des Ostéoblastes matures. Les principales caractéristiques morphologiques de ces cellules (encadrés) ainsi que leurs fonctions biologiques majeures sont représentées sur ce schéma.

II.5.2. Ostéoclastes et résorption osseuse :

Les **ostéoclastes** sont des cellules de grande taille (de 50 à 100 μ m), en forme de dôme, dérivées de précurseurs hématopoïétiques et générées par fusion de **monocytes circulants** (Figure 10). Ces cellules **multinucléées** (entre quatre et dix noyaux, positionnés en partie apicale) présentent en conséquence un cytoplasme très développé, doté de nombreuses mitochondries, appareils de Golgi et lysosomes, eux-mêmes enrichis en enzymes telles que la TRAP (Phosphatase Acide Résistante au Tartrate)¹⁰⁸. Ces organites sont indispensables à l'exécution des fonctions de **dégradation** de la matrice osseuse ou « **résorption osseuse** » propres à ces cellules.

Les ostéoclastes se regroupent ainsi en **foyers de résorption**, leur pôle basal en **bordure en brosse** (nombreux replis de membrane) se plaçant en regard de la matrice minéralisée à dégrader (**Figure 10**). Ce positionnement délimite ainsi un espace appelé **chambre de résorption**, dont l'étanchéité est assurée au moyen d'interactions fortes établies entre les intégrines des ostéoclastes et les constituants de la matrice osseuse.

La résorption osseuse est relayée par l'action d'enzymes telles que la TRAP, la cathepsine K, la MMP-9 (Métalloprotéinase Matricielle 9), ou encore l'anhydrase carbonique de type II, cette dernière intervenant notamment dans l'activation de pompes à protons ATP-dépendantes (Adénosine Triphosphate-dépendantes). Ces pompes génèrent un pH acide dans les zones de résorption sous-ostéoclastique, nécessaire à l'activation de certaines enzymes. On peut par ailleurs souligner que les ostéoblastes agissent conjointement aux ostéoclastes dans le phénomène de résorption osseuse, puisqu'ils peuvent également eux-mêmes sécréter des enzymes qui y participent, telles que la MMP-2 ou les cathepsines B et L. Toutes ces enzymes contribuent ainsi à la dissolution des phases minérales, les produits de dégradation étant alors expulsés de la chambre de résorption par le pôle apical des ostéoclastes. D'un point de vue mécanistique, le déplacement de ces cellules à la surface de la matrice osseuse est assuré par la libération d'ions calcium provenant des phases minérales dissoutes, induisant alors la dépolymérisation de leurs filaments d'actine. Après avoir été résorbée, la matrice osseuse présente un aspect lacunaire caractéristique, dit en « lacunes de Howship ».



Figure 10 l Représentation schématique des étapes de l'activation et de la différenciation des Ostéoclastes :

Images tirées du site http://www.servier.fr

Les Ostéoclastes matures sont issus de l'activation de pré-Ostéoclastes immatures, générés par la fusion de monocytes circulants. Les principales caractéristiques morphologiques de ces cellules (encadrés) ainsi que leurs fonctions biologiques majeures sont représentées sur ce schéma.

II.6. Le remodelage osseux :

II.6.1. Les étapes du remodelage osseux :

Le processus de remodelage osseux se produit tout au long de la vie des os adultes, assurant ainsi la préservation des fonctions et des qualités intrinsèques du tissu osseux. Ce mécanisme implique un **couplage** de l'activité des ostéoclastes et celle des ostéoblastes, dans le **temps** et dans l'**espace**, de telle manière que l'apposition osseuse se produise uniquement sur des sites préalablement résorbés.

Plusieurs étapes découpent ce processus (**Figure 11**) : la première correspond à la **phase de quiescence (1)**, au cours de laquelle les cellules bordantes (ostéoblastes inactivés) tapissent simplement la surface de la matrice osseuse.

Vient ensuite la **phase d'activation (2)**, pendant laquelle les ostéoclastes mononucléés, immatures, reconnaissent la surface à résorber, s'y fixent, puis fusionnent. L'initiation de cette phase est dépendante des conditions environnementales, c'est-à-dire, de la production de facteurs chimiques (hormones ou cytokines ostéorésorbantes) par les cellules du microenvironnement osseux ou bien de contraintes mécaniques (fracture, prise de poids), permettant aux cellules bordantes quiescentes de se rétracter, laissant la place aux ostéoclastes immatures.

S'ensuit la **phase de résorption (3)** à proprement parler, caractérisée par la destruction du tissu osseux par les ostéoclastes actifs.

Intervient ensuite la **phase d'inversion (4)**, qui correspond à la mort par apoptose de ces ostéoclastes, suivie de leur remplacement par des cellules mononuclées de type macrophagique et des précurseurs ostéoblastiques, qui agissent en « comblant » le fond des lacunes, lissant ainsi la surface osseuse.

La dernière étape de ce processus correspond à la **phase de formation (5)**, au cours de laquelle les cellules bordantes, les cellules macrophagiques et les pré-ostéoblastes sont recrutés et activés en ostéoblastes matures, formant alors la **bordure épithélioïde ostéoblastique** sur le site osseux à combler. La nouvelle matrice ostéoïde est ainsi produite et apposée par les ostéoblastes avant d'être minéralisée. Une fois cette phase achevée, ces cellules meurent par apoptose ou sont emmurées dans la matrice osseuse nouvellement formée : on parle alors d'**ostéocytes**. De nouvelles cellules bordantes vont alors recouvrir la surface de l'os et rester en quiescence jusqu'à une activation ultérieure des ostéoclastes.

Au niveau de l'os cortical, la phase de résorption dure environ dix jours, celle d'inversion, quinze jours et celle de formation, quatre-vingt-dix jours. Toutefois, dans l'os trabéculaire, l'ensemble des étapes de ce processus peut prendre jusqu'à six mois.



Figure 11 I Représentation schématique des différentes phases du remodelage osseux: *Images tirées du site http://www.servier.fr*

II.6.2. Le contrôle du remodelage osseux :

Le remodelage osseux est contrôlé par des facteurs d'ordres **mécaniques** (1) et chimiques (2).

Les **contraintes mécaniques** (1) exercées sur le tissu osseux sont perçues par les **ostéocytes**, qui transmettent ensuite ces messages aux **ostéoblastes** et aux **cellules bordantes** par l'intermédiaire de leurs propriétés sécrétoires. Selon la nature des variations mécaniques et des signaux émis par les ostéocytes, les ostéoblastes et les cellules bordantes répondent par l'intermédiaire de leur activité d'apposition osseuse intrinsèque ou bien à l'inverse, en induisant l'activation des ostéoclastes. De faibles contraintes mécaniques favorisent ainsi plutôt l'activation des ostéoclastes.

Des facteurs chimiques (2) permettent également de contrôler le remodelage osseux. Parmi ceux-ci on peut citer des ions, des protéoglycanes comme la fibromoduline ou les biglycans, des vitamines comme notamment la 1α ,25-dihydroxyvitamine D3, des cytokines ou encore des hormones comme l'hormone parathyroïdienne (PTH) ou la calcitonine. La PTH agit indirectement en faveur de la résorption osseuse : elle stimule en effet l'activité sécrétoire des ostéoblastes, qui produisent alors en retour certaines cytokines dont l'IL-6, activatrice de l'activité ostéoclastique. A l'inverse, la calcitonine, une hormone thyroïdienne, agit en se fixant directement sur des récepteurs de surface des ostéoclastes, inhibant alors leur activité. De même, la leptine, « l'hormone de la satiété », produite par les cellules adipeuses, stimule la différenciation et l'activité d'apposition osseuse des ostéoblastes¹⁰⁹.

Trois autres éléments majeurs dans la biologie de l'os permettent également de moduler l'activation des ostéoblastes et des ostéoclastes. Ces modulateurs appartiennent aux cytokines de la superfamille du TNF (Tumor Necrosis Factor) et à leurs récepteurs associés. Ces molécules sont RANK (Receptor Activator of NF-κB), son ligand RANKL (RANK Ligand) et l'OPG (Ostéoprotégérine), ces deux dernières étant produites à la fois par les cellules stromales médullaires et les ostéoblastes¹¹⁰.

RANK est un récepteur membranaire présent à la surface des ostéoclastes, dont l'activation dépend de la fixation du facteur soluble **RANKL**. Ce récepteur est impliqué dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes¹¹¹. L'**OPG** est, quant à elle, un récepteur soluble de **RANKL** : la séquestration de RANKL par l'OPG empêche donc sa fixation à RANK. Ce mécanisme permet ainsi à l'OPG de jouer un rôle d'inhibiteur compétitif de l'activité ostéoclastique.

Ces grands principes de la physiologie de l'os étant posés, il apparaît ainsi évident que toute anomalie dans la structure des constituants inertes de la matrice extracellulaire de l'os ou bien dans l'activité biologique de ses constituants cellulaires puisse conduire au développement de pathologies osseuses. Ainsi, une dérégulation du remodelage osseux en faveur de l'activité des ostéoclastes peut être à l'origine de l'**ostéoporose** ou bien de la **maladie de Paget**, de même que des mutations des gènes *COL1A1* et *COL1A2*, codant pour les chaînes polypeptidiques du collagène de type I, conduiront à une **ostéogénèse imparfaite** (ou **maladie des os de verre**)¹¹². Il a également été rapporté que des mutations du gène *CLCN7*, codant pour un canal au chlore impliqué dans les fonctions de résorption des ostéoclastes, pouvaient induire la **maladie des os de marbre** (ou **ostéopétrose**)¹¹³. De même, des défauts de remodelage osseux caractérisés par des dérégulations dans l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes sont également associés au développement des tumeurs osseuses primitives malignes, comme l'**Ostéosarcome** et le **Sarcome d'Ewing** et dont il sera question tout au long de ce manuscrit.

III. LES SARCOMES OSSEUX

III. Les Sarcomes Osseux :

III.1. Caractérisation des Sarcomes Osseux :

III.1.1. Epidémiologie des Sarcomes Osseux :

Les Sarcomes Osseux correspondent à un sous-type de tumeur d'origine **mésenchymateuse**. Ils touchent surtout les **enfants** et les **adolescents** et en dépit de leur dénomination, peuvent aussi bien survenir au niveau des **os** que dans les **tissus mous**¹¹⁴.

Les Sarcomes Osseux primaires, l'**Ostéosarcome**, le **Sarcome d'Ewing** et le **Chondrosarcome** sont des pathologies très rares : elles représentent en effet seulement **0,2%** des nouveaux cas de cancers répertoriés en 2016 aux Etats-Unis (d'après la base de données SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results)). En Europe, l'incidence des Sarcomes Osseux primaires est de 2 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes.

D'un point de vue Historique, ces pathologies existent depuis l'Antiquité : le cas le plus ancien d'Ostéosarcome humain répertorié à ce jour date en effet d'environ **-800 avant Jésus Christ**. Il a été mis en évidence sur les ossements d'un jeune celte, retrouvés en Suisse, la masse osseuse formée au niveau de sa métaphyse humérale présentant toutes les caractéristiques radiographiques qui définissent actuellement l'Ostéosarcome¹¹⁵. Le premier cas de Sarcome d'Ewing a quant à lui, été découvert en Espagne, sur un crâne d'enfant daté de **l'Age de Bronze**.

En dépit de leur rareté, ces pathologies représentent tout de même une cause de mortalité importante pour les jeunes de moins de 19 ans, puisqu'elles sont à l'origine d'environ **13%** des décès par cancers dans cette tranche d'âge. Dans le cas de l'Ostéosarcome et du Sarcome d'Ewing, on retrouve un premier pic d'incidence dans la **seconde décade** de la vie, suivi d'un second, passé soixante ans, résultant alors bien souvent d'autres pathologies du remodelage osseux comme la maladie de Paget¹¹⁶. Alors que l'Ostéosarcome touche autant les garçons que les filles, une **prévalence masculine** apparaît dans le Sarcome d'Ewing, le sexe-ratio étant de deux pour un. Des analyses par GWAS (Genome Wide Association Studies) ont récemment permis de mettre en évidence qu'il existait une **différence** d'origine **raciale** dans l'incidence du Sarcome d'Ewing. Ainsi, l'absence de certains polymorphismes dans les lignées germinales des individus d'origine africaine permettrait d'expliquer la rareté de ce cancer dans ces populations, les enfants de « race **blanche** » étant **six fois** plus touchés que les noirs¹¹⁷.

III.1.2. Anatomie et localisation des Sarcomes Osseux :

Anatomiquement, les Sarcomes Osseux se localisent principalement sur les os longs des extrémités : l'**Ostéosarcome** primaire se développe ainsi surtout au niveau des **métaphyses** osseuses, même si, selon l'étendue de la tumeur, les épiphyses et les diaphyses peuvent également être touchées. Certains os semblent par ailleurs plus exposés, 80% d'entre eux se retrouvant en parties proximales et distales du **fémur** ou en partie proximale du **tibia** et de l'**humérus**. Des cas d'Ostéosarcome sont également rapportés sur les os crâno-faciaux et ceux de la mâchoire, leur prise en charge et leur évolution différant alors de celles des os longs¹¹⁸.

Le Sarcome d'Ewing est quant à lui, plus souvent initié au niveau des **diaphyses** osseuses, pouvant ensuite s'étendre sur les métaphyses. En plus de toucher les os longs, ce type de tumeur est également retrouvé au niveau des **os plats** (pelvis, omoplates et côtes) et dans les **tissus mous**. D'après les études de « l'European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies », portant sur 1426 patients, 26% de ces tumeurs se développent au niveau du pelvis, 20% au niveau des fémurs et 10% au niveau des tibias¹¹⁹.

III.1.3. Symptômes et diagnostic des Sarcomes Osseux :

Cliniquement, les symptômes les plus courants des Sarcomes Osseux sont caractérisés par une **douleur locorégionale** continue ou intermittente, qui peut être ressentie plus intensément durant la nuit, accompagnée ou non de **paresthésie** (fourmillements, picotements)¹²⁰. S'ensuit alors un gonflement de la zone touchée, puis le développement d'une **masse palpable**, déjà présente chez **plus d'un tiers** des patients lors du diagnostic initial. Dans les cas de Sarcome d'Ewing pelviens ou localisés au niveau de la cage thoracique, la masse tumorale peut malheureusement demeurer indiscernable pendant plusieurs mois, ralentissant alors le diagnostic. Le développement néoplasique pourra ensuite, selon la localisation et l'étendue de la tumeur, gêner la mobilité de l'articulation du membre touché.

Dans les stades les plus avancés de ces pathologies, des signes d'inflammation cutanée sont également visibles, la vascularisation faisant alors saillie sous la peau, indiquant un état de stase veineuse, également associé à une hyperthermie. Des symptômes moins spécifiques tels que des malaises fréquents, une fatigue chronique, de la fièvre, une perte de poids et d'appétit sont souvent également ressentis lorsque des métastases sont présentes. Ces dernières se développent principalement aux poumons, à l'os, ainsi qu'à la moelle osseuse ; les ganglions lymphatiques, le foie ou le système nerveux central étant plus rarement touchés.

Compte tenu de l'âge des patients concernés par ces maladies, ces douleurs sont malheureusement bien souvent considérées, à tort, comme étant liées à la croissance osseuse ou comme résultantes des diverses activités sportives pratiquées par ces jeunes. Lors du premier examen médical, ces tumeurs sont ainsi fréquemment diagnostiquées comme des **tendinites** chez les adolescents et les adultes, alors que chez les enfants plus jeunes, elles sont souvent assimilées à des **inflammations** des hanches ou des **ostéomyélites** (maladies infectieuses de l'os, causées par des contaminations bactériennes).

Plusieurs techniques **d'imagerie médicale** permettent de confirmer le diagnostic lors d'une suspicion de Sarcome Osseux. La mise en évidence par **radiographie** de zones ostéolytiques étendues, aux limites imprécises, d'un détachement du périoste (aussi appelé « **triangle de Codman** »), ainsi que de **spicules** de calcification irradiant dans les tissus mous environnant la tumeur, permettent d'orienter le diagnostic vers ce type de pathologie. L'**imagerie par résonance magnétique (IRM)** permet une définition plus fine de l'étendue de la tumeur et notamment de son envahissement intra médullaire ainsi que de ses rapports avec les parties molles adjacentes, les vaisseaux sanguins et les nerfs environnants¹¹⁹. L'ultime test diagnostic des tumeurs osseuses demeure toutefois la **biopsie** : elle sera pratiquée par un oncologue orthopédiste expérimenté, de préférence dans un centre de référence, avant d'être analysée par **cytogénétique** et **histopathologie**.

III.1.4. Prise en charge thérapeutique des Sarcomes Osseux :

La prise en charge thérapeutique des Sarcomes Osseux dépend de l'**étendue** de la tumeur au moment du diagnostic, de l'**âge** du patient, de sa **situation** personnelle, de la balance entre les **bénéfices** attendus et les **risques** encourus selon la méthode de traitement choisie ainsi que des **référentiels** disponibles. Sa détermination fait l'objet d'une discussion avisée entre oncologues, orthopédistes et médecins spécialistes lors de réunions collégiales dite de « **concertation pluridisciplinaires** » (**RCPs**).

Elle est toutefois très souvent basée sur une combinaison de **chirurgie**, de **polychimiothérapie** (néo-adjuvante et/ou adjuvante) et de **radiothérapie locale**, dont les récentes optimisations ont largement contribué à l'amélioration des taux de survie^{119,121}. Ces derniers se situent en effet aux alentours de **60-70%**, cinq ans après traitement pour les formes localisées, mais chutent malheureusement à **25-30%** seulement lorsque des **nodules métastatiques** sont déjà présents au moment du diagnostic¹²². Par ailleurs, compte tenu de l'importance relative des doses d'agents de chimiothérapie auxquels ils sont soumis dès le plus jeune âge, les patients atteints de Sarcomes Osseux sont malheureusement sujets à de lourds effets secondaires, entravant grandement leur qualité de vie et compromettant leurs chances de survie à long terme.

III.2. L'Ostéosarcome :

III.2.1. Etiologie de l'Ostéosarcome :

D'après le rapport de Classification des Tumeurs de l'Organisation Mondiale de la Santé, établi en 2011, l'Ostéosarcome représente **35%** des **tumeurs osseuses** diagnostiquées à travers le monde, en faisant ainsi la plus fréquente des tumeurs osseuses malignes primitives. Son étiologie est encore inconnue à ce jour mais des cas d'**Ostéosarcomes secondaires** ont été rapportés des suites de maladies de Paget, d'irradiations par radiothérapie, d'ostéomyélites chroniques ou encore de dysplasies cartilagineuses bénignes¹²³. De façon anecdotique, quelques rares cas d'Ostéosarcome ont également été décrits comme étant consécutifs à une exposition à certains métaux (tels que le **chrome**, le **nickel**, le **titane**...) ou apparaissant après implantation de **prothèses métalliques**, mais aucune étude fiable n'a toutefois pu confirmer que ces facteurs en soient réellement responsables¹²⁴.

III.2.2. Caractérisation clinique et histologique de l'Ostéosarcome :

L'Ostéosarcome clinique est un cancer caractérisé par la production de substance ostéoïde (ou os dit « ectopique ») par les cellules malignes, conduisant à la formation de masses tumorales dites ostéocondensantes (Figure 12A). A la radiographie, ces tumeurs sont toutefois très hétérogènes, pouvant présenter plusieurs types de profils. On peut ainsi retrouver des Ostéosarcomes exclusivement ostéocondensants, mais aussi à l'inverse, exclusivement ostéolytiques, la dérégulation du remodelage osseux inhérente à cette pathologie conduisant également à une forte activité ostéoclastique. Dans la majorité des cas toutefois, ces lésions présentent les deux types de profils (Figure 12B).

Selon leur localisation, de la périphérie de l'os à son centre, on distingue **trois soustypes** cliniques d'Ostéosarcome : les Ostéosarcomes de **surfaces**, de bons pronostics ; les Ostéosarcomes **intra-corticaux**, très rares et les Ostéosarcomes **intra-médullaires**, qui sont quant à eux, les plus fréquents mais aussi les plus agressifs.

« L'Atlas of Musculoskeletal Tumors and Tumorlike Lesions », édité en 2014, rapporte que, sur le plan microscopique, les cellules d'Ostéosarcome de haut grade correspondent à de grosses cellules **sarcomateuses**, aux **nucléoles** très développés. Ces cellules présentent une **hyperchromie** et un **pléiomorphisme** marqués et se divisent souvent par mitoses atypiques (Figure 12C). Elles produisent une **matrice ostéoïde** caractéristique, pouvant apparaître sous plusieurs aspects, allant de simples petits **ilots ostéoïdes** semblables à de la **dentelle**, jusqu'à présenter une organisation en **couches osseuses denses** d'aspect **tissé**. Ces substances ostéoïdes enrichissent très souvent le centre des tumeurs, leurs périphéries, moins ostéogéniques, étant majoritairement cellulaires. Les cellules tumorales peuvent également présenter une légère **anaplasie**, conduisant dans 10% des cas, à les confondre avec des entités bénignes, comme celles caractérisant l'ostéoblastome, le chondroblastome ou les tumeurs à cellules géantes.

Les Ostéosarcomes sont également caractérisés par une grande diversité de profils de **différenciation histologique** : des zones fibreuses, chondroïdes, riches en cellules géantes ou à l'inverse, riches en petites cellules faiblement productrices de matrice ostéoïde (Ostéosarcome à petites cellules), peuvent en effet être retrouvées, en plus des régions de **déposition ostéoïde** des cellules tumorales¹²⁵. Les cellules tumorales peuvent aussi, dans certains cas, être accompagnées par de larges **cavités sanguines**; on parle alors d'**Ostéosarcome télangiectasique** (Figure 12D).

Figure 12 :



Figure 12 I L'Ostéosarcome clinique:

(A) Imagerie par radiographie d'un Ostéosarcome de type ostéocondensant présentant un profil caractéristique en "feu d'herbe" localisé au niveau de la diaphyse proximale du tibia. Une telle localisation fait de ce patient un candidat idéal à une chirurgie conservatrice du membre. (B) Imagerie par radiographie d'un Ostéosarcome présentant des lésions à la fois ostéolytiques et ostéocondensantes au niveau de la métaphyse distale du fémur d'un patient au squelette encore immature. La radiodensité présente un aspect cotonneux. D'après "Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissues and Bone", rapport du World Health Organization Classification of Tumours et de l'International Agency for Research on Cancer (IARC), 2002. (C) Tissu sarcomateux présentant des cellules productrices d'ostéoïde et d'os. (1) Tissu Sarcomateux. L'aspect cellulaire caractéristique des tumeurs de haut grade est ici évident : les cellules sont très grosses, pléïomorphes et hyperchromiques. (2) Tissu ostéoïde et os néoplasique, présentant une organisation anarchique. Il est ici quasiment impossible de retrouver des trabécules bien définies, bordées d'une couche régulière d'ostéoblastes. (3) Abondants vaisseaux sanguins, ne présentant pas ici de paroi régulière et continue. On peut voir à certains endroits qu'ils sont directement ceints par les cellules sarcomateuses. (D) Cavités gorgées de sang d'un Ostéosarcome télangiectasique, bordées de cellules tumorales mésenchymateuses ne produisant de la matrice ostéoïde que sous forme d'îlots focaux. Modifié d'après "The Atlas of Musculoskeletal Tumors and Tumorlike Lesions: The Rizzoli Case Archive", édité par Piero Picci, Marco Manfrini, Nicola Fabbri, Marco Gambarotti et Daniel Vanel, Springer, 2014. (E) Caryotype de cellules d'Ostéosarcome. Variation du nombre de copies des gènes dans un Ostéosarcome de haut grade, mise en évidence par hybridation génomique comparative. L'hybridation des chromosomes en métaphase est représentée, l'ADN de la tumeur étant coloré en vert, l'ADN de référence étant marqué en rouge, le marquage au DAPI étant, quant à lui, représenté en bleu. Les zones vertes en position 8q indiquent un gain du nombre de copies d'ADN dans la tumeur. Modifié d'après "Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissues and Bone", rapport du World Health Organization Classification of Tumours et de l'International Agency for Research on Cancer (IARC), 2002. (F) Pièce chirurgicale d'Ostéosarcome, caractérisée par une localisation de la tumeur primaire au niveau du fémur distal, ainsi que de skip-métastases dans une partie plus proximale. (G) Imagerie par scanner d'un patient corps entier, après radio-marquage osseux au Tm⁹⁹. Une concentration significative de l'isotope est retrouvée au niveau de la tumeur primaire et on peut noter la présence d'une lésion secondaire discontinue dans la partie proximale de la diaphyse fémorale. (H) Pièce opératoire d'Ostéosarcome après chimiothérapie pré-opératoire. La cystification ainsi que l'absence d'éclat caractéristique, indiquent une nécrose totale de la tumeur. D'après "Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissues and Bone", rapport du World Health Organization Classification of Tumours et de l'International Agency for Research on Cancer (IARC), 2002.

III.2.3. Génétique de l'Ostéosarcome :

Les avancées techniques de ces dernières années en termes de **séquençage à haut débit** ont permis de mieux caractériser l'Ostéosarcome d'un point de vue **génétique**, mettant ainsi en évidence son importante **complexité**. Son génome présente en effet de nombreuses **variations structurales** ainsi que des **anomalies caryotypiques**, sans toutefois être caractérisé par une mutation exonique particulière (<u>Figure 12E</u>).

Même s'ils ne représentent pas une signature moléculaire propre à cette pathologie, on peut toutefois noter que certains gènes sont fréquemment **mutés** ou **délétés** dans l'Ostéosarcome : c'est le cas de **TP53**, principalement inactivé dans ce modèle par des **translocations** de l'**exon 1**¹²⁶. Le lien entre ce gène et la survenue de l'Ostéosarcome est également souligné par le fait que les malades atteints du **syndrome de Li-Fraumeni**, luimême dû à des mutations autosomales dominantes de *TP53*, développent souvent des Ostéosarcomes secondaires¹²⁷. Par ailleurs, une analyse génétique récente a pu établir que l'implication de ce gène dans le développement de ce cancer dépendait de l'âge des patients¹²⁸. Il semblerait en effet que la susceptibilité génétique de survenue de l'Ostéosarcome chez les sujets jeunes diffère de celle des sujets âgés : les premiers (moins de 29 ans) présentant une forte fréquence de mutation **des gènes associés au syndrome de Li-Fraumeni** ainsi que des **variants exoniques rares de TP53**, de telles caractéristiques génétiques n'étant pas retrouvées chez les sujets ayant développé un Ostéosarcome après 30 ans.

Par ailleurs, les cellules d'Ostéosarcome sont aussi soumises à des phénomènes mutationnels affectant des gènes autres que *TP53*. C'est notamment le cas de *Rb1*, *ATRX*, *PI3KCA*, *AKT1* et *DLG2* par exemple, altérés dans 29 à 53% des cas d'Ostéosarcome¹²⁶. D'autres analyses rapportent encore une altération de l'expression de gènes impliqués dans des voies de contrôle de la **prolifération** et de la **survie cellulaire** (voie **PI3K/mTOR** par exemple) ou encore, dans des voies permettant le maintien de la longueur des télomères^{129,130}. Une étude récente de séquençage d'exome fait également état d'un ensemble d'altérations chromosomiques retrouvées dans plus de 80% des échantillons d'Ostéosarcome analysés, comprenant des substitutions nucléotidiques ou des pertes d'hétérozygotie caractéristiques des tumeurs déficientes en *BRCA1/2* (*Breast Cancer 1/2*)¹³¹.

En 2013, la première étude d'association pangénomique (Genome Wide Association Study, GWAS) a été réalisée dans l'Ostéosarcome¹³². Elle a permis de mettre en évidence que sa prédisposition était associée au polymorphisme nucléotidique (SNP, single nucleotide polymorphism) des *loci* 6p21.3 et 2p25. Le premier (rs1906953) concernerait ainsi le gène *GRM4*, codant pour le Récepteur Glutamate Métabotropique 4 (Glutamate Receptor Metabolotropic 4), impliqué dans les fonctions cérébrales ; le second (rs7591996), ne codant en revanche pour aucun gène connu. Plus récemment, il a été décrit que le SNP rs7034162 du *locus* 9p24.1 était associé à de plus faibles chances de survie chez des patients

Européens, Africains et Brésiliens atteints d'Ostéosarcome¹³³. Ce SNP affecte quant à lui le gène **NFIB**, codant pour le **Facteur Nucléaire I/B** (**Nuclear Factor I/B**), impliqué dans l'activation de la transcription et la réplication de l'ADN.

Par ailleurs, des profils particuliers de **variants nucléotidiques isolés (SNV, singlenucleotide variation)** sont également retrouvés dans 50% des cas d'Ostéosarcome. Ces profils se distinguent par des **hypermutations** localisées en des endroits précis du génome, appelées **kataegeis¹²⁶**. Ces zones de kataegeis sont principalement caractérisées par des mutations de cytosines en thymines, au niveau des dinucléotides TpCs.

Toutefois, même si ces études mettent en évidence que certains facteurs génétiques semblent favoriser l'apparition de l'Ostéosarcome, aucune des signatures moléculaires précédemment évoquées n'est retrouvée dans cent pourcent des cas. Par ailleurs, la mise en parallèle des données issues des analyses les plus récentes de séquençage à haut débit ne permet pas non plus de retrouver d'altérations génétiques communes au sein des échantillons d'Ostéosarcome étudiés. Dans un tel contexte, la mise en place d'une stratégie d'étude épigénétique de l'Ostéosarcome semble tout à fait à propos et l'investigation du rôle des protéines à BET Bromodomaines ainsi que celui des miARNs dans la progression de cette pathologie pourrait permettre et développer et/ou d'améliorer les outils utiles à sa prise en charge thérapeutique.

III.2.4. Prise en charge thérapeutique de l'Ostéosarcome :

La prise en charge thérapeutique de l'Ostéosarcome repose sur une **poly**chimiothérapie néo-adjuvante, visant dans un premier temps, à réduire la taille de la tumeur et à éradiquer un éventuel phénomène métastatique. Au moment du diagnostic, ce dernier peut alors n'être qu'initié, sous forme de **micro-métastases** ou bien, être déjà bien en place, se caractérisant alors par des **macro-métastases**, souvent **pulmonaires** (<u>Figure 12F</u> <u>et 12G</u>). Cette étape est ensuite suivie de la résection chirurgicale de la masse tumorale, la qualité des **marges d'exérèse** étant déterminante quant à la palliation des récidives de la maladie. Une chimiothérapie adjuvante, associée ou non à un traitement par **rayonnements ionisants** finalisent enfin la procédure thérapeutique (<u>Figure 12H</u>).

Les quatre agents de chimiothérapie les plus employés à l'heure actuelle demeurent inchangés depuis les années 1970-1980 et comprennent : la **Doxorubicine (Adriamycine)**, le **Cisplatine (cis-diamminedichloroplatinum)**, le **Méthotrexate** à hautes doses, et/ou l'**Ifosfamide** et l'**Etoposide**, utilisés seuls ou en combinaison¹³⁴. Par ailleurs, le **Mifamurtide**, un agent immunostimulant a récemment été autorisé en Europe pour le traitement des patients de moins de 30 ans, en rémission chirurgicale complète¹²².

La **Doxorubicine** (ou **Adriamycine**) est une anthracycline agissant à la fois comme agent **alkylant de l'ADN**, mais aussi comme inhibiteur de l'activité de la **Topoisomérase II**, une enzyme impliquée dans le contrôle de la formation des super-enroulements de l'ADN¹³⁵. Elle induit toutefois des problèmes d'insuffisance médullaire et son emploi est également déconseillé chez les patients ayant des antécédents cardiaques, du fait de sa forte toxicité vis-à-vis de cet organe. Plusieurs agents **antioxydants** tels que la **Dexrazoxane**, les **statines** ou les **β-bloquants** ont par ailleurs déjà démontré leurs effets cardio-protecteurs à l'égard des anthracyclines et peuvent ainsi être utilisés conjointement à la Doxorubicine¹³⁶.

Les sels de platine tels que le **Cisplatine**, sont aussi des agents **alkylants de l'ADN**, qui, en formant des « ponts » entre les bases puriques, permettent une inhibition de la réplication et de la transcription, conduisant à la mort cellulaire. Les effets secondaires de ce composé sont une ototoxicité, une neurotoxicité ainsi qu'une néphrotoxicité. Des études cliniques ont montré que les toxicités rénales et auditives induites par les fortes doses de Cisplatine pouvaient être contrecarrées par perfusion préalable des patients avec des solutions de **mannitol** à des doses de 5 mg/kg¹³⁷.

Le Méthotrexate est un inhibiteur de la dihydrofolate réductase, une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'acide folique, conduisant à la synthèse *de novo* des bases puriques ainsi que de la thymidine. Cet agent cytostatique agit ainsi en s'opposant à la synthèse de l'ADN, mais induit également, malheureusement, des toxicités hématopoïétiques, digestives et rénales. Cette dernière peut toutefois être contrée par l'administration d'acide folinique, lorsque la concentration sanguine en Méthotrexate est supérieure à 0,1 μ M.

L'**Ifosfamide** est également un agent **alkylant** de l'ADN dont l'emploi repose sur des cures intraveineuses cycliques. Une méta-analyse récente a démontré son efficacité dans l'amélioration clinique de l'Ostéosarcome, la survie sans rechute et la survie globale des patients traités avec cette drogue étant augmentées¹³⁸. Toutefois cette même étude démontre aussi que son utilisation est liée à une fréquence de **perfusion de plaquettes** plus élevée, ainsi qu'à une plus grande incidence de **fièvres** chez les patients. Retrouvé chez la moitié des patients traités avec cet agent, le principal effet secondaire de cette drogue reste cependant l'**encéphalopathie**, dont la gravité s'étend de la simple céphalée à un état de somnolence ou de confusion, pouvant même aller jusqu'à des troubles de la conscience¹³⁹. L'administration conjointe de **mesna (2-mercaptoethane <u>s</u>ulfonate <u>Na</u>), permet de pallier l'incidence des cystites hémorragiques également associées à son emploi.**

Enfin, l'**Etoposide** est un agent semi-synthétique dérivant de la podophyllotoxine de l'herbacée vivace *Podophyllum peltatum*, également connu pour ses propriétés inhibitrices de la **Topoisomérase II**. Il s'administre en association avec les agents de chimiothérapie cités précédemment, à une concentration comprise entre 100 et 200 mg/m²/jour, par perfusion continue de trente minutes. Ses principaux effets secondaires se manifestent par des

toxicités **hématologiques** et **gastro-intestinales**, ainsi que par une **alopécie** réversible, pouvant aller jusqu'à la calvitie totale, cette dernière étant observée chez 70% des patients.

Malgré l'emploi de cocktails des agents de chimiothérapie décrits ci-avant, l'optimisation de leurs doses et la rationalisation de leurs cycles d'administration, de nombreux patients demeurent **mauvais répondeurs** et développent des **métastases pulmonaires** qui compromettent grandement leurs chances de survie. Des approches **thérapeutiques alternatives** sont donc nécessaires dans le cadre de l'Ostéosarcome et les stratégies de **ciblage épigénétique** pourraient, à juste titre, constituer un nouvel espoir dans l'amélioration de la prise en charge des jeunes patients atteints de ce cancer.

III.3. Le Sarcome d'Ewing :

III.3.1. Caractéristiques histologiques du Sarcome d'Ewing :

Avec une incidence annuelle de deux à trois nouveaux cas par an et par million d'enfants de moins de 15 ans en France, le Sarcome d'Ewing est le second type de tumeur osseuse primitive maligne le plus fréquent après l'Ostéosarcome. Décrit pour la première fois en **1921** par le pathologiste américain **James Ewing** sous le terme « d'endothéliome diffus de l'os », il se classe aujourd'hui parmi les tumeurs osseuses les plus agressives (<u>Figure</u> <u>13A et 13B</u>)¹⁴⁰ et appartient à la famille des **tumeurs neuroectodermiques primitives** (PNETs, Primitive Neuroectodermal Tumors).

Il se définit d'un point de vue histologique, par des nappes denses et compactes de petites cellules monomorphes, rondes et bleutées, pourvues de chromatine et de membranes nucléaires fines (Figure 13C panels de gauche et du milieu)¹⁴¹. Ces cellules présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, leurs noyaux arrondis à ovalaires occupant la majeure partie du cytoplasme. Par ailleurs, 70% de ces cellules renferment du glycogène, particulièrement bien visible sur des prélèvements congelés.

A l'instar des cellules de rhabdomyosarcome, les cellules de Sarcome d'Ewing expriment fortement la sialoglycoprotéine membranaire MIC2/DC99 (Figure 13C panel de droite)¹⁴². L'avènement et les améliorations des techniques de fluorescence par hybridation *in situ* (FISH) et de RT-qPCR (Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction) ont par ailleurs permis d'améliorer l'exactitude du diagnostic de ce cancer¹⁴³. Sa validation définitive repose ainsi désormais très souvent sur la détection d'un marqueur caractéristique, l'oncogène chimérique EWS-Fli1, dont le rôle crucial sera détaillé plus loin dans ce manuscrit.



Figure 13 | Biopsie, imagerie et histologie du Sarcome d'Ewing :

(A) Résection chirurgicale d'un fémur entier de patient atteint d'une tumeur de Sarcome d'Ewing. *D'après http://www.thefreedictionnary.com, Fletcher 2007.* (B) Image IRM d'un Sarcome d'Ewing localisé au pelvis. *D'après Bernstein M. et al., 2006.* (C) Caractéristiques histologiques et immunohistologiques du Sarcome d'Ewing. (Panel de gauche) Les cellules de Sarcome d'Ewing apparaissent classiquement comme des couches de petites cellules rondes et bleutées. (Coloration : Hématoxyline-Eosine, grossissement : x 200). (Panel du milieu) Les cellules présentent un cytoplasme peu abondant et des noyaux ronds, à l'intérieur desquels on peut distinguer une répartition uniforme de la chromatine, dont les contours sont fins et granuleux. Les nucléoles sont par ailleurs discrets (Coloration : Hématoxyline-Eosine, grossissement : x 400). (Panel de droite) Un marquage membranaire fort et diffus est observé après marquage des cellules avec l'anticorps monoclonal O13, dirigé contre le CD99. (Révélation: Immuno-peroxydase, grossissement: x 400). *D'après Bernstein M. et al., 2006.*

III.3.2. Origines du Sarcome d'Ewing :

L'origine du Sarcome d'Ewing est encore débattue : les deux principales théories suggèrent que cette tumeur provienne soit, de **cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BM-MSCs)** ou bien qu'elle dérive de **cellules souches des crêtes neurales (Neural Crest Stem Cells, NCSCs)**. La première hypothèse tient au fait que les BM-MSCs sont des cellules **permissives aux transfections par EWS-Fli1**, ceci n'étant pas le cas de tous les types cellulaires. Par ailleurs, l'expression ectopique de ce gène dans ces cellules leur confère non seulement un phénotype cancéreux proche de celui des cellules de Sarcome d'Ewing, mais aussi un programme d'expression génique très similaire¹⁴⁴. La seconde hypothèse est, quant à elle, soutenue par le fait que les tumeurs d'Ewing présentent très souvent un phénotype **neural immature** : elles sont, de plus, capables de se différencier en **cellules neuronales** (sous l'action de l'AMP cyclique (Adénosine Monophosphate cyclique, AMPc)) et expriment enfin certaines **enzymes** et **marqueurs neuronaux** comme le CD57, la synaptophine, S-100 et la NSE (Neural-Specific Endolase)¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

III.3.3. Génétique du Sarcome d'Ewing :

III.3.3.a. Translocations chromosomiques et Sarcome d'Ewing :

Sur le plan génétique, les Sarcomes d'Ewing sont très souvent caractérisés par des **translocations chromosomiques** entre les domaines amino-terminaux des gènes de la famille *EWS* (*Ewing Sarcoma Gene*) et la portion carboxy-terminale d'un des cinq gènes de la famille *ETS* (*E-Twenty-Six Transformation Specific*) : *Fli1, ETV1, ETV5* et *FEV*¹⁴⁸. Une étude de **1983** a ainsi pu mettre en évidence que la translocation **t(11;22)(q24;q12)**, impliquant les gènes *EWSR1* et *Fli1* (*Friend Leukemia Integration 1*), caractérisait 83% des cas de Sarcome d'Ewing (Figure 14A, 14B, 14C et 14D)¹⁴⁹. Elle conduit à la production d'un facteur de transcription chimérique, EWS-Fli1, dont l'ARNm a été identifié pour la première fois en 1994 par une équipe de chercheurs français¹⁵⁰. Les propriétés oncogéniques de cette protéine en font un élément clé dans la progression tumorale de ce cancer : elle est ainsi aujourd'hui considérée comme un de ses marqueurs cytogénétiques, mais aussi comme une cible thérapeutique idéale.

En dehors des translocations t(11;22)(q24;q12) ou celles associées à la génération des autres facteurs chimériques **EWS-ETS**, les Sarcomes d'Ewing présentent des caryotypes relativement simples, uniquement pourvus de quelques aberrations chromosomiques d'ordre numériques et structurales. Il est d'ailleurs intéressant de souligner que ces cancers font partie des tumeurs les **moins sujettes à mutations**¹⁵¹. Ceci justifie d'autant plus l'intérêt porté à l'étude des **mécanismes épigénétiques** qui régulent l'expression des oncogènes de

fusion caractéristiques de ces pathologies, ces « signatures moléculaires » étant considérées comme des cibles thérapeutiques idéales.








Figure 14 | Sarcome d'Ewing, translocation t(11 ;22)(q24 ;q12) et oncogène EWS-Fli1:

(A) La translocation réciproque entre les chromosomes 11 et 22 donne naissance à l'oncogène de fusion EWS-Fli1, anormalement localisé sur le chromosome 22. La protéine qui en résulte porte la partie N-terminale transactivatrice du gène EWS et le domaine de liaison à l'ADN de Fli1, localisé dans sa partie C-terminale. DBD : DNA Binding Domain, domaine de liaison à l'ADN ; CTA : Carboxy-terminal Transcriptionnal Activation ; FLS : Fli1-Specific domain, domaine spécifique de Fli1 ; H-L-H : Helix-Loop-Helix, Hélice-Boucle-Hélice ; IQ : domaine de liaison à la Calmoduline ; SF1 BD : SF1 Binding Domain, domaine de liaison au facteur SF1 ; SYQG : domaine riche en Sérine-Tyrosine-Glutamine-Glycine ; RGG : domaine riche en Arginine-Glycine-Glycine ; TA : domaine de Transactivation. Les extrémités amino- et carboxy-terminales des protéines sont indiquées, les acides aminés définissant les différents domaines sont numérotés. D'après Bernstein M. et al., 2006. (B) Translocation t(11;22)(q24;q12) dans le Sarcome d'Ewing, mise en évidence par marquage chromosomique par la technique du G-banding. D'après le site http://www.atlasgeneticsoncology.org et les données de G. Reza Hafez, Eric B.Johnson, et Sara Morrison-Delap (UW Cytogenetic Services). (C) Représentation schématique de la translocation t(11;22)(q24;q12) caractérisant le Sarcome d'Ewing, le chromosomes 11 étant représenté en noir, le 22 en bleu. Les régions vertes et rouges représentent les sondes d'hybridation in situ appariées au gène EWSR1 (technologie Vysis). Ce schéma illustre le mécanisme mis en évidence par la technologie FISH représenté en (D). (D) Image de FISH : la colocalisation des sondes vertes et rouges indique un chromosome 11 intègre lors de l'interphase de mitose. Les signaux rouges et verts séparés témoignent quant à eux, d'une translocation du gène EWSR1, générant des chromosomes dérivés des chromosomes 11 (der(11)) et 22 (der(22)). Modifié d'après le site http://www.muirspathology.com.

III.3.3.b. EWS-Fli1, l'oncogène caractéristique du Sarcome d'Ewing :

<u>Dépendance du Sarcome d'Ewing vis-à-vis d'EWS-Fli1 et ses variants :</u>

De nombreux exemples illustrent « l'addiction » du Sarcome d'Ewing pour EWS-Fli1, le maintien des caractéristiques tumorales de ce type de cellules **dépendant** de la **présence** et de **l'activité** de cette protéine. *In vitro*, il a ainsi été démontré que la réduction artificielle de son expression dans ce modèle induisait un blocage du cycle cellulaire et la mort cellulaire par apoptose¹⁵². *In vivo*, une telle inhibition conduit à un ralentissement de la croissance tumorale chez les animaux porteurs de xénogreffes de Sarcome d'Ewing. Par ailleurs, cet oncogène possède un véritable **pouvoir transformant** *in vitro*, comme ont pu le démontrer les études de Thompson et al., menées dans la lignée de fibroblastes murins NIH3T3¹⁵³. La modulation artificielle de son expression dans de nombreuses lignées a révélé qu'il existait des **différences significatives** dans les **signatures moléculaires** qui lui sont associées. Ces dernières dépendent en effet du contexte cellulaire, témoignant ainsi de la **plasticité** des mécanismes épigénétiques qui conditionnent l'exécution des fonctions de ce gène. Toutefois, l'expression d'*EWS-Fli1* est toujours associée avec l'activation des gènes **fonctionnellement** liés à la **prolifération cellulaire** et la répression de ceux gouvernant le **développement** et la **différenciation**¹⁵⁴.

Il existe **plusieurs variants** des transcrits d'EWS-Fli1, différant les uns des autres par leurs points de cassure chromosomique et possédant des potentiels de **transactivation** plus ou moins élevés¹⁵⁵. La protéine **EWS-Fli1 de type 1**, la forme la plus courante, est ainsi retrouvée dans **60%** des cas et correspond à la fusion des 264 premiers acides aminés d'EWS avec les 233 acides aminés carboxy-terminaux de Fli1, suite à la cassure des gènes correspondants dans les exons 7 et 6 respectivement. La protéine **EWS-Fli1 de type 2** ne représente que **25%** des cas et correspond quant à elle, à la fusion de l'exon 7 d'*EWS* avec l'exon 5 de *Fli1*. D'autres points de cassure de ces gènes existent également mais leur fréquence est beaucoup moins élevée¹⁵⁶.

Cliniquement, il a été décrit que le type même de cette protéine oncogénique, revêtait une valeur **pronostique** pour les patients : plusieurs études rapportent en effet l'association du **type 1 d'EWS-Fli1** avec de meilleures chances de survie^{157,158}. Ceci serait possiblement dû à la plus faible capacité d'**activation** de la **transcription** de la protéine EWS-Fli1 de type 1, comparé à celle de la protéine de type 2. Il est toutefois important de noter que, quel que soit le variant, les capacités d'**activateur transcriptionnel d'EWS-Fli1** sont bien supérieures à celles de *Fli1* seul¹⁵⁹.

• Organisation structurale et fonctions biologiques des gènes EWSR1 et Fli1:

Le gène Fli1 est impliqué dans le contrôle des programmes d'expression génique régulant les voies de différenciation mégacaryocytaires et plaquettaires¹⁶⁰. Dans les cancers, il tient un rôle de proto-oncogène, initialement mis en évidence dans les leucémies rétrovirales murines, dans lesquelles il est surexprimé¹⁶¹. Curieusement, sa surexpression artificielle dans des lignées de carcinomes mammaires s'oppose à la prolifération ainsi qu'aux capacités migratoires et invasives de ces cellules¹⁶². Sur le plan architectural, l'extrémité N-terminale de la protéine Fli1 porte deux domaines transactivateurs de la transcription : un premier domaine partagé par l'ensemble des protéines de la famille ETS, le second, le domaine FLS (Fli1-Specific), étant quant à lui, propre à Fli1 (Figure 14A). EWS-Fli1 étant généré par fusion de la partie C-terminale de Fli1 uniquement, cette protéine chimère ne conserve donc pas ces domaines transactivateurs. Le domaine de fixation à l'ADN de cette protéine se trouve quant à lui dans sa partie C-terminale et s'étend des acides aminés 277 à 330, alors organisés en structures secondaires du type Hélice-Boucle-Hélice (H-L-H, Helix-Loop-Helix)¹⁶³. Ce domaine confère ainsi à Fli1 et à EWS-Fli1, des capacités de liaison spécifique aux séquences consensus ACCGGAAG/aT/c¹⁶⁴, leur permettant de moduler la transcription de gènes-cibles tels que MDM2 (Mouse Double Minute 2 Homologue) ou Bcl-2^{165,166}. Un troisième domaine transactivateur a également été décrit dans la partie C-terminale de Fli1, le domaine CTA (Carboxy-Terminal Transcriptional Activation), incluant les acides aminés 402 à 452. Par ailleurs, la richesse en acide aminé proline de la partie C-terminale de Fli1 contribuerait aussi à l'augmentation de ses capacités transcriptionnelles¹⁶⁷.

Le gène *EWSR1* code pour la protéine ubiquitaire EWS, dont le rôle a été particulièrement bien décrit dans le maintien de la survie cellulaire au niveau du système nerveux central¹⁶⁸. Cette protéine présente des capacités de liaison à l'ADN simple brin ainsi qu'à l'ARN via trois domaines riches en motifs « Arginine-Glycine-Glycine », localisés dans sa partie C-terminale, non conservés lors de la génération d'EWS-Fli1 (Figure 14A)¹⁶⁹. Sa partie N-terminale porte, quant à elle, un motif d'activation de la transcription, caractérisé par des répétitions de séquences consensus d'acides aminés « Sérine-Tyrosine-Glutamine-Glycine » des positions 1 à 285. Cette partie inclut également un domaine d'interaction avec le facteur SF1 (Splicing Factor 1), s'étendant des acides aminés 228 à 264 et un domaine dit « IQ », d'interaction avec la calmoduline (acides aminés 256 à 285). En interagissant avec des facteurs et des co-activateurs transcriptionnels tels que TFIID, l'ARN polymérase II, P300, CREBBP ou OCT4, EWS contribue à l'activation de la transcription de nombreux gènes^{170,171}. Il a toutefois été décrit que le recrutement de SF1 au niveau de son domaine de fixation inhibait ses fonctions transactivatrices¹⁷².

• <u>Gènes-cibles et implications fonctionnelles du facteur de transcription EWS-</u> <u>Fli1 :</u>

Les fonctions de **facteur de transcription** de la protéine chimérique **EWS-Fli1**, issue de la fusion des deux gènes précédemment décrits, lui permettent d'activer l'expression génique, mais aussi de l'inhiber, faisant de cette protéine un médiateur central dans l'acquisition du **phénotype cancéreux** des cellules de Sarcome d'Ewing. Ainsi, de part sa liaison directe au niveau de leurs zones promotrices, EWS-Fli1 peut activer l'expression de gènes-cibles tels que le récepteur orphelin *NROB1*¹⁷³, *Gli1*, un des effecteurs majeurs de la voie **Sonic Hedgehog (HH)**¹⁷⁴ ou encore *hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase)*, un gène s'opposant à la sénescence¹⁷⁵. De la même façon, EWS-Fli1 permet d'activer l'expression du gène *Id2*, à la fois connu pour ses fonctions d'inhibiteur de la différenciation cellulaire, mais aussi pour son rôle de perturbateur de la liaison du facteur de transcription **E2A** à l'ADN. Ce facteur étant justement impliqué dans l'activation de la transcription du gène suppresseur de tumeurs *p21*, ce mécanisme illustre ici parfaitement les fonctions indirectes d'EWS-Fli1 sur la modulation de l'expression de ce type de gènes¹⁷⁵.

Les implications biologiques **fonctionnelles** d'EWS-Fli1 sont nombreuses et les mécanismes moléculaires par lesquels cette protéine y contribue sont de mieux en mieux détaillés. On sait désormais qu'en activant directement l'expression des **Métalloprotéinases matricielles MMP-1** et **MMP-3** (**Matrix Metalloproteinase -1 et -3**), impliquées dans la destruction des membranes basales et des matrices extracellulaires, EWS-Fli1 participe à l'échappement tumoral en facilitant les processus d'invasion et de dissémination métastatique¹⁷⁶. Par ailleurs, son rôle de stimulateur de la prolifération cellulaire s'explique par sa capacité à induire l'expression de **PDGF-C** (**Platelet-Derived Growth Factor C**), de **CCND1** (**Cycline D1**), de **C-Myc** ou du facteur de transcription de la famille des Forkhead Box, **FOXM1**¹⁷⁷. EWS-Fli1 active aussi de façon indirecte l'expression de **VEGFA** (**Vascular Endothelial Growth Factor A**), un facteur clé de l'angiogénèse¹⁷⁸.

Le **TGF6-RII** (**Transforming Growth Factor-8 Récepteur II**), les inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes, **p21** et **p57**^{KIP2}, l'IGFBP-3 (Insulin-like Growth Factor Binding-Protein-**3**), un facteur inducteur d'apoptose, **FOXO1** ou encore le facteur soluble **LOX** sont en revanche, des exemples de gènes réprimés de façon directe par EWS-Fli1^{179,180}.

III.3.4. Prise en charge thérapeutique du Sarcome d'Ewing :

A l'instar de celle de l'Ostéosarcome, la prise en charge thérapeutique du Sarcome d'Ewing inclut en premier lieu une **poly-chimiothérapie néo-adjuvante**, à laquelle viennent s'ajouter la **résection chirurgicale** de la tumeur locale, ainsi qu'un traitement par **chimiothérapie adjuvante**. Dans quelques cas, ce protocole peut également être complété par de la **radiothérapie**. Les traitements thérapeutiques standards font principalement intervenir les agents chimiothérapeutiques suivants : la **Vincristine**, l'**Actinomycine D**, le **Cisplatine**, la **Doxorubicine** (ou **Adriamycine**), le **Cyclophosphamide** ou l'**Ifosfamide**, associés ou non à l'**Etoposide**¹¹⁹. Le détail des mécanismes moléculaires ainsi que les effets secondaires du Cisplatine, de la Doxorubicine, de l'Ifosfamide et de l'Etoposide figurent déjà dans la partie concernant les traitements de l'Ostéosarcome.

La **Vincristine** est un alcaloïde extrait des fleurs de Pervenche de Madagascar (*Catharantus roseus*). Il agit au cours de la métaphase de la division cellulaire, sa fixation à la tubuline lui permettant d'inhiber la polymérisation des microtubules, une étape nécessaire à la formation du **fuseau mitotique**¹⁸¹. Son effet secondaire principal est la **neuropathie du système nerveux périphérique**, pouvant aller de la simple sensation de picotement à la paralysie musculaire ou pouvant encore conduire à une cécité transitoire. Des difficultés respiratoires ou des troubles du système gastro-intestinal sont aussi des symptômes fréquemment observés.

L'Actinomycine D est un des plus anciens antibiotiques utilisés dans le traitement des cancers. Sa fixation dans des régions promotrices riches en bases GC lui permet de réprimer la transcription¹⁸². Son effet, conjoint à ceux de la Vincristine et du Cyclophosphamide (constituant le protocole de traitement « VAC », Vincristine; Actinomycine D; Cyclophosphamide) a été démontré depuis longtemps dans le Sarcome d'Ewing¹⁸³. Cette drogue présente néanmoins des effets secondaires gastro-intestinaux, cutanés et hépatiques principalement.

Le protocole combinant l'emploi de la Vincristine, de l'Actinomycine D, du Cyclophosphamide et de l'Adriamycine (VACA) a longtemps été utilisé dans ces tumeurs avant d'être optimisé par l'ajout de l'Ifosfamide puis de l'Etoposide, permettant alors d'améliorer la survie sans récidive des patients non-métastatiques uniquement¹⁸⁴. Intitulé Euro-EWING 99 (EUROpean Ewing Tumor Working Initiative of National Groups), le protocole de traitement de référence du Sarcome d'Ewing en Europe depuis 1999 inclut une chimiothérapie néo-adjuvante associant la Vincristine, l'Ifosfamide, la Doxorubicine (ou Adriamycine) et l'Etoposide (protocole VIDE), suivie d'une résection chirurgicale de la tumeur quand cela est possible pour le patient. Le protocole de traitement diffère ensuite selon le statut métastatique ou non de la tumeur à cette étape. Les patients du groupe R1, présentant des pathologies localisées reçoivent ainsi soit, des cures adjuvantes VAC (Vincristine, Actinomycine D, Cyclophosphamide) ou bien VAI (Vincristine, Actinomycine D, Ifosfamide). Les bras R2 et R3, concernent quant à eux, les patients dont la pathologie est déjà plus avancée et selon les degrés métastatiques, diverses combinaisons de VAI, de Busulfan et de Mephalan sont employées. Les récents résultats de cette étude concernant le bras R1 ont démontré que le protocole VAC pourrait potentiellement remplacer le VAI, même si ses effets toxiques à long terme sur les fonctions reproductives et rénales doivent encore être envisagés¹⁸⁵. D'autres essais cliniques sont actuellement en cours tels que le protocole Euro Ewing 2012, qui vise à comparer les schémas de chimiothérapie employés en France et en Angleterre, avec ceux actuellement en vigueur aux Etats-Unis.

La nécessité d'optimisation des protocoles de traitement actuels ainsi que le développement de nouveaux essais cliniques dans le cadre du Sarcome d'Ewing, attestent que la prise en charge thérapeutique de ce cancer pourrait encore être améliorée. Compte tenu de la caractérisation de ces tumeurs par la présence des protéines de fusion **EWS-ETS** et de l'évidente **dépendance** de ces cancers à l'**activité** de ces **oncogènes**, une stratégie d'analyse **épigénétique** pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes contrôlant l'expression de ces gènes chimériques. A terme, une telle stratégie pourrait ainsi conduire au développement de nouveaux outils thérapeutiques intéressants dans le cadre de cette pathologie et justifie pleinement l'intérêt porté aux protéines à BET Bromodomaines ainsi qu'aux miARNs dans la progression tumorale et l'échappement de ce cancer.

IV. LA FAMILLE DE TP53

IV. La famille de TP53 :

Au cours du chapitre suivant, nous verrons qu'une partie des résultats de ce travail de thèse fait état des **régulations épigénétiques** impliquant les **miARNs** dans un contexte relatif à certaines protéines de la famille du gène suppresseur de tumeurs **TP53**. Les <u>Articles</u> <u>**4** et 6</u> se sont ainsi plus particulièrement attachés à mieux définir le rôle des isoformes **ΔNp63** α et **TAp73** β , deux membres de la famille de *TP53*, dans l'échappement tumoral des Sarcomes Osseux. Cette famille de protéines aux fonctions complexes inclut en effet plusieurs membres, chacun d'entre eux présentant des caractéristiques biologiques particulières dues à leur singularité en termes de structure et d'interactions protéiques. Afin de permettre une meilleure compréhension de leurs implications dans l'épigénétique des Sarcomes Osseux, quelques notions concernant leur organisation structurale ainsi que leurs fonctions seront ici présentées, constituant ainsi la dernière partie de cette introduction.

IV.1. Mutations et implications biologiques des gènes de la famille de TP53 :

La famille des **facteurs de transcription** apparentés à **p53** compte **trois membres**: **p53**, qu'on qualifie également de gardienne du génome, **p63** et **p73**. Encodés par les gènes *TP53*, *TP63* et *TP73* respectivement, ils exercent tous trois un rôle important au cours du **développement embryonnaire** (lors des étapes de l'organogénèse notamment), mais participent aussi à la **progression tumorale** de nombreux cancers¹⁸⁶. *TP53* est sans conteste le membre de cette famille de gènes suppresseurs de tumeurs le plus étudié dans le domaine de la Cancérologie. Il contribue notamment aux processus de **réparation de l'ADN**, de **sénescence**, de contrôle du **cycle cellulaire** et d'induction de mort cellulaire par **apoptose** et est muté ou inactivé dans environ 50% des cancers chez l'Homme¹⁸⁷.

La littérature rapporte également une dérégulation de l'expression de **TP63** dans certains cancers tels que le cancer du poumon ou certains carcinomes¹⁸⁸ et les mutations de ce gène ont aussi des implications dans d'autres contextes pathologiques. Elles sont en effet associées à divers syndromes tels que l'**EEC (Ectrodactylyl Ectodermal Dysplasia**), le **LMS (Limb-Mammary Syndrom)** ou encore le **SHFM4 (Split-Hand/Split-Foot Malformation 4**), chacun se caractérisant par des **malformations sévères** des extrémités¹⁸⁸. Il a par ailleurs été démontré que des souris KO pour *TP63* présentaient d'importants défauts de **développement** parmi lesquels on peut notamment citer, une absence totale d'**épithéliums squameux stratifiés**, de **glandes mammaires**, **lacrymales** et **salivaires**, des anomalies **crânofaciales** associées à la présence de **fentes labiales** et **palatines** ou encore une **absence de dents**¹⁸⁹.

Contrairement à *TP53* et *TP63*, **TP73** est, quant à lui, très rarement touché par les phénomènes mutationnels¹⁹⁰. La région chromosomique 1p36 sur laquelle ce gène est

localisé est toutefois très fréquemment **délétée** dans les cancers, comme cela a été décrit dans le mélanome, le neuroblastome ou les cancers du colon et du sein¹⁹¹. Des modèles de souris KO pour ce gène ont par ailleurs permis de démontrer son implication dans le développement des **systèmes nerveux** et **sensoriels** ainsi que ses fonctions **inflammatoires**, **neurologiques** et **phéromonales**¹⁹².

IV.2. Structure des protéines de la famille de *TP53* : facteur de complexité de leurs effets biologiques:

Sur le plan structural, les facteurs de transcription p53, p63 et p73 partagent une **architecture** commune, très conservée à travers l'évolution, de la Drosophile à l'Homme. Celle-ci comprend plusieurs domaines de forte homologie (**Figure 15A**): un domaine de **transactivation** (**TA**), retrouvé dans la partie N-terminale de ces protéines et nécessaire à leurs propriétés d'activateurs transcriptionnels, un domaine central de **fixation** à **l'ADN** (**DBD**, **DNA Binding-Domain**), déterminant dans la sélectivité de leurs gènes-cibles, ainsi qu'un domaine d'**oligomérisation** (**OD**), situé dans leur partie C-terminale¹⁹³.

Les propriétés de suppresseurs de tumeurs de cette famille de gènes sont principalement liées à leurs capacités à activer la transcription de gènes-cibles, dépendantes de la présence du domaine de transactivation TA. Ce dernier permet en effet d'activer la transcription de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, dans la réparation des dommages à l'ADN ou dans l'enclenchement de la mort cellulaire par apoptose tels que Noxa, PUMA, MDM2, 14-3-3 σ ou p21 par exemple¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Il est toutefois important de souligner qu'il existe un nombre important d'isoformes des protéines p63 et p73, toutes n'étant pas pourvues du domaine **TA** et n'étant en conséquence pas dotées de telles propriétés de suppresseurs de tumeurs. Seules les formes longues (formes dites « TA »), générées à partir du promoteur P1, situé en amont de l'exon 1, possèdent ce domaine (Figure 15B). Le promoteur P2, situé dans l'intron 3 de ces gènes, génère quant à lui, des isoformes courtes (formes dites (ΔN) , qui en sont dépourvues. Même si elles sont incapables de transactiver l'expression génique, les isoformes ΔN conservent toutefois leurs capacités de liaison aux séquences promotrices de leurs gènes-cibles et agissent ainsi comme formes dominantes négatives vis-à-vis des formes TA. Il est donc admis que les isoformes TAp63 et TAp73 présentent des fonctions biologiques redondantes à celles de p53, « remplaçant » alors ce gène dans le cas où il est muté. En revanche, les formes ΔNp63 et ΔNp73, en bloquant l'accès de p53 et des formes TA sur leurs sites de fixation à l'ADN (et donc la transcription de leurs gènes-cibles), possèdent, à l'inverse, des fonctions d'oncogènes (Figure 15C panel du haut). De plus, les isoformes ANp63 et ANp73 peuvent aussi bloquer les fonctions de p53 et des formes TA par un second mécanisme, puisqu'elles peuvent s'associer physiquement avec ces facteurs, par l'intermédiaire de leur domaine d'oligomérisation (OD) (Figure 15C panel du bas)¹⁹⁷.

Enfin, de nombreuses isoformes de ces protéines sont également produites par épissage alternatif (Figure 15B): opérant dans la partie C-terminale de p73, ce mécanisme génère possiblement au moins **sept isoformes** distinctes (formes α , β , γ , δ , ϵ , ζ , et η); quatre autres pouvant également être produites en partie N-terminale. Bien qu'au total, 35 transcrits ARNs de p73 puissent être exprimés, quatorze de ces variants protéiques ont réellement été identifiés¹⁹³. Concernant p63, au moins **trois isoformes** (α , β et γ) ont été décrites, suite à l'épissage alternatif de son extrémité C-terminale¹⁹⁸. Les différents domaines (conservés ou non par épissage alternatif) des parties C-terminales de ces gènes ajoutent encore un niveau de complexité aux fonctions biologiques de cette famille de protéines, puisqu'ils permettent encore de moduler les interactions protéiques qu'elles entretiennent entre elles ainsi qu'avec d'autres facteurs. Ceci s'illustre notamment par le fait que les isoformes TA possèdent des capacités de transactivation variables: il a ainsi été démontré que TAp73β pouvait induire l'expression de p57/kip2/CDKN1C par exemple, alors que **TAp73** α ou **p53** n'en sont pas capables¹⁹⁹. On peut également noter que certaines isoformes de p63 et p73 portent dans leur partie C-terminale un domaine SAM (Sterile α -Motif) composé de quatre hélices- α et d'une hélice-3₁₀, impliqué dans les interactions protéiques, que p53 ne possède pas (Figure 15D)²⁰⁰. Le domaine PS (Post-SAM), lui aussi uniquement présent dans les parties C-terminales de certaines isoformes de p63 et p73, est, pour sa part, impliqué dans les mécanismes de suppression de la transcription (Figure 15D).

Les isoformes dont il sera ainsi question dans ce travail de thèse sont $\Delta Np63\alpha$ et TAp73 β , dont l'implication dans les processus épigénétiques dépendants des miARNs sera traitée dans les <u>Articles 4</u> et <u>6</u> respectivement. Impliquée dans la prolifération et la migration cellulaire, $\Delta Np63\alpha$ présente donc des fonctions d'oncogène et est surexprimée dans de nombreux cancers tels que les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou²⁰¹. De plus, il est clairement admis que cette isoforme participe activement aux processus de tumorigénèse par l'intermédiaire de ses fonctions d'inhibiteur des formes pro-apoptotiques TAp73²⁰². TAp73 β en revanche, est impliquée dans la médiation des mécanismes de mort cellulaire par apoptose et joue un rôle dans la chimiosensibilité des cellules cancéreuses, arborant ainsi des caractéristiques de gène suppresseur de tumeurs²⁰³. Même si de plus en plus d'études se sont intéressées à $\Delta Np63\alpha$ et TAp73 β au cours de ces dernières années, les rôles antagonistes de ces deux isoformes nécessitent encore d'être éclaircis, tout particulièrement dans le contexte des Sarcomes Osseux.



Figure 15 | Organisation structurale et mécanismes de répression transcriptionnelle des gènes de la famille de p53:

Modifié d'après Yang et al., 2002.

(A) Comparaison des différents domaines structuraux de p53 et des isoformes « longues » de p63 et p73. TA: Domaine de Transactivation; DNA binding: Domaine de liaison à l'ADN; Oligo: Domaine d'oligomérisation. (B) Isoformes de p63 et p73. Chaque gène s'étend sur environ 100 kb, les introns allant de quelques centaines de paires de bases à 40 kb. Le promoteur proximal P1 donne naissance aux isoformes TA et TA* (les isoformes TA* possèdent 39 acides aminés supplémentaires en partie N-terminale). Le promoteur distal P2 génère les isoformes ΔN. Les arrangements de p63 et p73 par épissage alternatif génèrent aussi de nombreuses isoformes. Seuls les schémas d'épissage alternatif des parties C-terminales les plus courants sont représentés ici (formes α , β , γ et δ). TA: Domaine de Transactivation; ΔN : isoformes issues du promoteur P2, dont la partie N-terminale est tronquée. (C) Détail des mécanismes de suppression de la transcription par lesquels agissent les isoformes ΔN de p63 et p73. DBD: DNA Binding-domain : Domaine de fixation à l'ADN. (Haut) Mécanisme de compétition entre les formes inactives ΔN et les formes TA transactivatrices (dont p53), pour les sites de liaison à l'ADN. La fixation des formes ΔN résulte en une diminution de l'expression de leurs gènes-cibles. (Bas) Mécanisme d'interaction physique entre les isoformes ΔN et TA, via leurs domaines d'oligomérisation, résultant également en une suppression de l'activité de transactivation des isoformes TA. (D) Homologies de séquences entre p63 et p73. Les séquences en acides aminés ont été comparées entre p63 et p73 et révèlent un fort degré d'identité entre ces deux protéines, ce dernier étant supérieur à celui qu'elles partagent avec p53. SAM: Motif "stérile alpha", impliqué dans les interactions protéiques ; PS: Domaine post-SAM, impliqué dans la suppression de la transcription.

OBJECTIFS PRINCIPAUX DE LA THESE

Objectifs principaux de la thèse :

L'épigénétique est une notion qui caractérise l'ensemble des mécanismes permettant de réguler l'expression des gènes, indépendamment de toute mutation de leur séquence ADN. Ces mécanismes sont nombreux, chacun mettant en jeu divers facteurs aux fonctions et propriétés bien particulières, tels que les protéines à **BET Bromodomaines** ou les **microARNs**. A l'heure actuelle, le rôle de ces composants n'est pas encore complètement élucidé et demeure donc toujours un des enjeux majeurs de la Recherche en Cancérologie. Une meilleure compréhension du mode d'action des protéines à BET Bromodomaines et des miARNs pourrait en effet permettre d'envisager leur emploi comme **biomarqueurs pronostics** et/ou **prédictifs** de la réponse aux traitements de chimiothérapie ou encore, comme **nouvelles cibles thérapeutiques** innovantes. Ceci est particulièrement vrai dans le cadre des **Sarcomes Osseux**, dans lesquels peu d'alternatives cliniques sont disponibles du fait de l'agressivité et de la rareté de ces pathologies.

La <u>PREMIERE PARTIE</u> de ce travail de thèse visera ainsi à étudier le rôle des protéines à BET Bromodomaines, une famille de protéines « lectrices » des marques d'acétylation des histones, dans le développement tumoral des Sarcomes Osseux. Les fonctions de ces protéines épigénétiques seront appréhendées grâce à l'emploi de JQ1, un **inhibiteur** spécifique de ces protéines. En démontrant les effets anti-tumoraux de JQ1 dans le cadre de l'**Ostéosarcome**, l'<u>Article 1</u> fera office d'introduction à cette première partie. L'<u>Article 2</u> s'attachera ensuite à présenter comment l'inhibition des protéines à BET Bromodomaines **impacte le développement tumoral du Sarcome d'Ewing**. Cette étude permettra non seulement de mettre en évidence les effets antinéoplasiques de JQ1 sur le plan fonctionnel, mais aussi de mieux comprendre les **aspects moléculaires** de son mécanisme d'action dans ce modèle.

La <u>SECONDE PARTIE</u> de ce travail de thèse s'attachera quant à elle, à mieux définir comment les miARNs peuvent être impliqués dans l'échappement tumoral des Sarcomes Osseux. Elle sera introduite par l'<u>Article 3</u>, qui se proposera justement d'illustrer l'état de l'art concernant les implications des miARNs dans l'échappement tumoral des cancers du sein et de la prostate, leurs métastases se localisant très souvent en site osseux. Suite à cette introduction, la <u>SECONDE PARTIE</u> de ce manuscrit sera scindée en deux sous-parties, traitant plus spécifiquement du rôle des miARNs dans les phénomènes de dissémination métastatique (1) et de chimiorésistance (2).

La première sous-partie de ce travail (1) sera elle-même introduite par l'<u>Article 4</u>: ce dernier permettra ainsi d'illustrer que certains miARNs sont impliqués dans l'échappement tumoral des carcinomes et de l'Ostéosarcome, en s'opposant à la dissémination métastatique dépendante de facteurs de transcription de la famille de *TP53*. Cette partie (1) sera ensuite poursuivie par la présentation de l'<u>Article 5</u> qui visera à identifier de nouveaux miARNs impliqués dans la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome. L'identification de la principale cible moléculaire de ces miARNs permettra également de mieux

comprendre comment ces derniers s'opposent à ce phénomène dans le contexte de cette pathologie.

La seconde sous-partie de ce chapitre (2) visera pour sa part, à examiner l'effet d'un miARN, le miR-193a-5p, dans la chimiorésistance des Sarcomes Osseux au Cisplatine (*Article 6*). Ce travail envisagera également de mieux définir l'implication d'un des membres de la famille de *TP53*, à savoir, *TAp736*, dans la médiation des effets pro-apoptotiques de cet agent dans le cadre de ces pathologies.

La <u>TROISIEME PARTIE</u> de cette thèse permettra finalement de relier les deux grandes parties précédentes, en s'inscrivant dans une démarche d'ouverture et de perspectives sur la relation entre les **miARNs** et la **chimiorésistance** aux **inhibiteurs de BET Bromodomaines**. En **établissant** et en **caractérisant** une lignée d'**Ostéosarcome résistante à JQ1**, ce travail a pour objectif de mieux appréhender dans quelle mesure la dérégulation d'un **miARN** pourrait potentiellement être à l'origine de la chimiorésistance de ces cellules à cet agent. De nombreuses hypothèses restent toutefois à éprouver dans cette dernière partie, les résultats préliminaires mis en valeur ici nécessitant une validation qui dépasse le cadre de cette thèse.

L'ensemble de ce travail de thèse ambitionne donc de mieux comprendre les mécanismes d'action de certains facteurs épigénétiques tels que les protéines à BET Bromodomaines et les miARNs dans la progression tumorale et la chimiorésistance des Sarcomes Osseux.

RESULTATS

PARTIE I : IMPACT DE L'INHIBITION DES PROTEINES A BET BROMODOMAINES DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL DES SARCOMES OSSEUX :

I.1. INTRODUCTION :

PROTEINES A BET BROMODOMAINES ET OSTEOSARCOME :

I.1. Introduction : Protéines à BET Bromodomaines et Ostéosarcome :

Article 1 : « L'inhibition sélective des protéines à BET Bromodomaines interfère avec le cercle vicieux lié au remodelage osseux » :

Nat Commun. 2014 Mar 19.

Lamoureux F, Baud'huin M, Rodriguez Calleja L, Jacques C, Berreur M, Rédini F, Lecanda F, Bradner JE, Heymann D, Ory B.

I.1.1. Introduction à l'Article 1 :

Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction générale de cette thèse, les **protéines à BET Bromodomaines** sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux, de part leur rôle **d'activateurs de la transcription**. Dans une stratégie thérapeutique anticancéreuse, leur inhibition pourrait permettre de réprimer l'expression d'oncogènes, impactant ainsi les voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale.

Le récent développement de **JQ1**, une petite molécule de synthèse fonctionnant comme inhibiteur spécifique des protéines à BET Bromodomaines, ouvre ainsi de nouvelles perspectives cliniques en Cancérologie. Les propriétés anti-tumorales de cette diazépine ont été étudiées en premier lieu dans un modèle de xénogreffe de carcinome de la ligne médiane (**NMC**, **NUT-Midline Carcinoma**), dans lequel elle promeut la différenciation cellulaire au sein de la tumeur, réduit la croissance tumorale et augmente la survie globale des animaux traités²⁰⁴. Depuis, ses effets antinéoplasiques ont été éprouvés dans de nombreux autres modèles, tels que les cancers hématopoïétiques par exemple, dans lesquels elle inhibe l'expression de l'oncogène **C-Myc**²⁰⁵. Plus récemment, il a été démontré que JQ1 conduisait à un ralentissement de la prolifération cellulaire ou encore à une inhibition de l'angiogénèse dans les cancers de l'**ovaire** et du **sein** respectivement^{206,207}.

Ses effets dans le contexte des **Sarcomes Osseux** n'ont toutefois jamais été appréhendés et pourraient s'avérer très prometteurs, notamment dans l'**Ostéosarcome**, dans lequel l'oncogène **C-Myc** tient justement une place importante^{208,209}. Par ailleurs, les protéines à BET Bromodomaines ne régulent pas exclusivement la transcription d'**oncogènes** dans des modèles de **cellules cancéreuses**, mais aussi dans d'**autres types cellulaires**, comme en attestent les effets de JQ1 comme inhibiteur de la voie des **Wnt**, dans des **CSMs**²¹⁰. Dans cette logique, l'inhibition de cette famille de protéines pourrait donc également affecter l'expression de gènes régulant la survie des **ostéoblastes** et des **ostéoclastes** du microenvironnement osseux. En conséquence, JQ1 pourrait peut-être ainsi permettre d'annihiler les communications cellulaires entre les cellules de l'os et les cellules cancéreuses d'Ostéosarcome, de telles communications contribuant à l'établissement du « **cercle vicieux** » caractéristique de cette pathologie. En effet, en entretenant justement un

déséquilibre dans le processus du remodelage osseux, ce cercle vicieux favorise la progression tumorale de l'Ostéosarcome et son ciblage demeure toujours à l'heure actuelle un challenge majeur dans le traitement de ce cancer.

• <u>Préambule :</u>

Déjà initiée au laboratoire avant mon entrée en formation doctorale, cette étude ne constitue pas le sujet principal de ma thèse ; elle permet toutefois de mieux comprendre le contexte dans lequel deux des projets au cœur de mon travail ont pu germer (cf. <u>Article 2 et</u> <u>PARTIE III</u>). Constituant ainsi véritablement une des **pierres angulaires** de cette thèse, l'<u>Article 1</u>, présenté ci-après, fait office d'introduction de cette première partie, tant par ses **implications scientifiques fondamentales**, que par des considérations plus **personnelles**.

Depuis mon arrivée au Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse UMR957 en 2012, à l'occasion de mon stage de **Master 1** et jusqu'à l'achèvement de l'écriture de ce manuscrit, cet Article a en effet toujours constitué pour moi, comme un fil conducteur. En posant les fondements du rôle des protéines à BET Bromodomaines dans l'Ostéosarcome, il a pu servir de point de départ à plusieurs autres projets en parallèle. Les études développées dans l'<u>Article 2</u> et dans la <u>PARTIE III</u> en sont un exemple, mais d'autres travaux, visant notamment à analyser plus en détail le rôle de ces protéines dans la physiologie de **l'os sain**, ainsi que dans des modèles **vivo** d'**ostéoporose** sont actuellement toujours en cours au laboratoire (**data non publiées**). De plus, cette étude reposant sur une collaboration avec le **Dr. James Bradner**, du Dana Farber Cancer Institute (Boston, USA), **éminent** « créateur de JQ1 », elle m'a également permis de réaliser que certaines personnalités telles que J. Bradner pouvaient devenir de réelles **références scientifiques** et **mentors** à suivre quant à leur réussite professionnelle dans le domaine de la Recherche.

D'un point de vue aussi bien **pratique** qu'**analytique**, ma participation à certaines des expérimentations nécessaires à la réalisation de ce projet m'a par ailleurs permis de me former **techniquement**, mais aussi de développer un peu plus **l'esprit scientifique** nécessaire à tout jeune Chercheur. Sur le plan pratique, cette étude m'a ainsi réellement initié à **l'expérimentation animale**, puisque j'ai pu, entre autres, contribuer au **traitement** des animaux par JQ1, le protocole employé, réalisé sur des cohortes importantes, étant très chronophage (injections quotidiennes, matin et soir).

Dans des considérations scientifiques, cette étude a permis de lever en partie le voile sur l'implication de certains mécanismes épigénétiques dans la biologie générale du microenvironnement osseux, permettant, de ce fait, une meilleure compréhension de leurs conséquences sur la progression tumorale de l'Ostéosarcome. Compte tenu de la grande similitude de ce type de tumeur avec le Sarcome d'Ewing, ce travail soulevait également de nouvelles hypothèses dans ce cadre, qui seront développée plus tard dans ce manuscrit (cf. <u>Article 2</u>). Par ailleurs, les mécanismes de chimiorésistance étant malheureusement, encore à l'heure actuelle, un des freins à l'efficacité des nouvelles molécules de chimiothérapie, il était malgré tout important de nuancer l'enthousiasme suscité par les effets encourageants de JQ1 dans l'Ostéosarcome développés ici. Cet <u>Article 1</u> sert ainsi encore une fois de base à notre étude visant à envisager l'apparition de mécanismes d'**échappement** aux inhibiteurs de BET Bromodomaines dans ce contexte (**cf. <u>PARTIE III</u>**).

I.1.2. Présentation de l'Article 1 :

De part les nombreuses communications cellulaires qu'il permet d'initier et d'entretenir, le **cercle vicieux** établi entre les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules cancéreuses d'Ostéosarcome, est un élément indispensable dans le développement des **lésions ostéolytiques** inhérentes à cette pathologie. L'affranchissement de ce cercle vicieux demeure donc une des problématiques majeures dans le succès des traitements des tumeurs osseuses, qu'elles soient primitives ou métastatiques. Cette étude démontre que l'inhibition des protéines à **BET Bromodomaines** par l'emploi de **JQ1** pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante dans la mesure où elle permet un ciblage simultané des trois principaux composants du cercle vicieux (ostéoblastes, ostéoclastes et cellules tumorales).

Afin d'évaluer la pertinence de la stratégie d'inhibition des protéines à BET Bromodomaines dans l'Ostéosarcome, un **screening** de l'expression des quatre membres de cette famille, **BRD2**, **BRD3**, **BRD4** et **BRDT** a d'abord été réalisé dans des biopsies tumorales de patients ainsi que dans un panel de lignées tumorales d'Ostéosarcome. Les résultats ont montré une surexpression significative de ces gènes au niveau transcriptionnel dans ces échantillons comparé à des **CSMs**, excepté pour BRDT, dont l'expression est restreinte au tissu testiculaire (**Fig. 1a, 1d et Supp Fig. 1**).

Sur le plan fonctionnel, nous avons mis en évidence que **JQ1** réduisait la **viabilité** des cellules d'Ostéosarcome de manière **dose-dépendante** (**Fig. 2b**). Les lignées testées présentent toutefois des **différences** de **sensibilité** entre elles. Ceci reflète finalement l'**hétérogénéité** de ce type de tumeur, les IC₅₀ des lignées les plus sensibles étant comprises entre 0,268 et 1,081 μM, alors que celles des plus résistantes sont comprises entre 5,476 et 9,772 μM. Nous avons également pu démontrer que l'inhibition des protéines à BET Bromodomaines permettait de réduire les **capacités clonogéniques** des cellules d'Ostéosarcome et d'induire un **blocage du cycle cellulaire** en phase **sub-G**₁ (**Fig. 2c, 2d et 2e**). De plus, les cellules traitées par JQ1 présentent également une **activité apoptotique** augmentée, dépendante de l'activation des **caspases 3** et caractérisée par une hausse du **clivage des PARPs (poly (ADP-ribose) polymérases)** (**Fig. 2f**).

Sur le plan moléculaire, l'effet inhibiteur de JQ1 sur l'expression de l'oncogène **C**-**Myc**, préalablement décrit dans de nombreux cancers, a conduit à une analyse plus poussée de l'expression de ce gène dans notre modèle. De plus, la fonction d'**oncogène « driver »** de ce gène est clairement admise dans l'Ostéosarcome, comme peuvent d'ailleurs en témoigner les fréquentes amplifications génomiques de son *locus* dans cette pathologie²¹¹. Le screening de l'expression de **C-Myc** que nous avons mené, aussi bien dans des biopsies tumorales que dans des lignées humaines d'Ostéosarcome, a ainsi révélé une **surexpression** significative de ce gène dans cette pathologie (**Fig. 1d et Supp Fig. 1**).

Eu égard à la **dépendance de l'Ostéosarcome** vis-à-vis de l'expression de ce facteur de transcription, l'impact de JQ1 sur son expression a donc été évalué dans ce modèle. Nos résultats ont ainsi pu révéler que l'expression de **C-Myc** était **diminuée** de façon dépendante du **temps** et de la **dose** de JQ1 employée, aussi bien dans des lignées humaines que murines (**Fig. 3a, Supp Fig. 5a et Supp Fig. 5b**). De plus, les sept **miARNs du cluster -17-92** (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a et miR-92a) étant des cibles transcriptionnelles directes de C-Myc, la diminution de leur expression observée en réponse à la même cinétique de traitement par JQ1 confirme bien l'inhibition fonctionnelle de C-Myc (**Fig. 3b et 3c**). Enfin, le gène *p21*, normalement réprimé par les miARNs de ce cluster, voit son expression augmentée d'un facteur douze après seulement 24h de traitement par JQ1 à 0,5 μ M (**Fig. 3d et Supp Fig. 7a**).

Des expérimentations d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP), réalisées dans la lignée d'Ostéosarcome MNNG-HOS, ont révélé que l'effet de JQ1 sur l'expression de C-Myc était en partie dû à la capacité de **liaison de BRD4** aux **histones acétylées** présentes dans la région promotrice de ce gène (**Fig. 3e**). Un enrichissement de BRD2 et de BRD4 a en effet été retrouvé à différents *loci* en amont et en aval du site d'initiation de la transcription de C-Myc, correspondant justement à des zones de fortes densités de H3K27ac. Nos résultats ont pu montrer que JQ1 induisait le déplacement de BRD4 de ces régions, mais qu'en revanche, il n'affectait pas BRD2. Ceci corrobore le fait que JQ1 présente une meilleure affinité à l'égard de BRD4 comparé à BRD2. Ces résultats sont également en accord avec la **corrélation** positive et statistiquement significative retrouvée entre les niveaux d'expression de **C-Myc** et ceux de **BRD4** dans les biopsies tumorales de patients (**Fig. 1b**).

Afin d'évaluer si l'effet inhibiteur de JQ1 sur la viabilité des cellules d'Ostéosarcome est bien lié à l'inhibition de l'expression de C-Myc par cet agent, une stratégie de complémentation a été menée. Dans un premier temps, il a ainsi pu être validé que l'inhibition de l'expression de C-Myc par siARNs reproduisait bien les effets de JQ1 en termes de viabilité cellulaire (Fig. 3f), puis que la surexpression de cet oncogène dans la lignée d'Ostéosarcome MNNG-HOS, suivie d'un traitement par JQ1, contrecarrait effectivement les effets antiprolifératifs de ce composé (Fig. 3g).

Le gène *RUNX2* est un facteur de transcription essentiel à la différenciation ostéoblastique et dont la fonction d'oncogène « driver » est également fortement suspectée dans l'Ostéosarcome²¹². Le screening de son expression dans des biopsies tumorales de patients atteints d'Ostéosarcome a ainsi révélé la **surexpression** de ce gène au niveau transcriptionnel et a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre son niveau d'expression et celui de **BRD4** (Fig. 4a, 4b et Supp Fig. 2). La même stratégie d'analyse d'expression, de ChIP et de complémentation que celle suivie pour C-Myc a été menée ici ; les résultats démontrant également un effet inhibiteur de JQ1 sur l'expression de ce gène, lié dans ce cas aussi, à sa capacité à dépléter BRD4 de son promoteur (Fig. 4d, 4e, 4f, 4g, Supp Fig. 8a et Supp Fig. 8b).

In vivo, les injections intra-péritonéales de JQ1 à 50 mg/kg, deux fois par jour, ont permis de ralentir la **croissance tumorale** de l'Ostéosarcome et d'augmenter la survie globale des animaux, aussi bien dans des modèles murins de **xénogreffes** que dans des modèles **syngéniques** (**Fig. 5a à 5h**). Ces modèles récapitulent les caractéristiques cliniques de la pathologie humaine et ont été générés par injection paratibiale de la lignée humaine MNNG-HOS dans des **souris athymiques** dans un cas ou de la lignée murine POS-1 dans des **souris immunocompétentes**, dans l'autre cas. Nos analyses d'immunohistochimie révèlent par ailleurs une **diminution** du marqueur de **prolifération** Ki⁶⁷ au sein des tumeurs des animaux traités par JQ1 (**Fig. 5i**). De plus, nos analyses par RT-qPCR dénotent une diminution de l'expression de **C-Myc** et **RUNX2** ainsi qu'une augmentation de celle de **p21** dans les cellules tumorales de ces mêmes groupes, comparativement à celle des groupes contrôles, corroborant nos analyses *in vitro* (**Fig. 5j**).

L'effet de l'inhibition des protéines à BET Bromodomaines sur la microarchitecture osseuse des tibias des souris, au niveau des sites de développement tumoraux, a également été évalué, grâce à des techniques d'imagerie et de reconstruction osseuse en trois dimensions. Nos résultats ont ainsi révélé que, non seulement JQ1 protégeait les os des lésions ostéolytiques, mais aussi, qu'il diminuait la formation d'os ectopique tumoral, deux remaniements osseux caractéristiques de l'Ostéosarcome (Fig. 6a, 6b, 6g et Supp Fig. 9). Par ailleurs, JQ1 permet aussi d'améliorer la qualité de l'os environnant la tumeur, comme l'ont révélé nos analyses morphométriques portant sur l'examen des paramètres osseux (volume osseux trabéculaire, nombre et épaisseur des trabécules ou encore épaisseur des séparations entre les trabécules) (Fig. 6c à 6f, 6h et Supp Fig. 9). Il est par ailleurs important de souligner que tous ces paramètres osseux n'ont pas été influencés par JQ1 au niveau de l'os « normal » des pattes controlatérales des souris traitées (Supp Fig. 13b à 13f). Compte tenu de l'importance du microenvironnement osseux dans la progression tumorale de l'Ostéosarcome, l'effet de JQ1 sur le nombre d'ostéoclastes et d'ostéoblastes a été évalué par immunohistochimie sur ces mêmes échantillons, issus de modèles murins d'Ostéosarcome. Les marquages TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase) et Ostérix ont ainsi tous deux révélés une nette diminution du nombre d'ostéoclastes et d'ostéoblastes, respectivement, au niveau des os bordant la tumeur dans les groupes d'animaux traités avec JQ1 (Fig. 6i et 6j).

Ces résultats suggérant le potentiel effet inhibiteur de JQ1 sur les processus de différenciation ostéoblastique et ostéoclastique *in vivo*, cette étude a été poursuivie par des analyses de différenciation *in vitro*, qui ont permis de confirmer cette hypothèse. Des **monocytes CD14**⁺ cultivés en présence de MCSF humain (Human Macrophage Colony Stimulating Factor), de RANKL et de JQ1 ont en effet démontré une réduction de leur propension à la **différenciation ostéoclastique** de l'ordre de 80% (**Fig. 7a et 7b**). Nous avons aussi pu démontrer par gène-rapporteur, que JQ1 diminuait l'activité transcriptionnelle de **NF-κB (dépendante de la stimulation du récepteur RANK par RANKL) (Fig. 7c)**, l'activité de ce gène étant inhérente à la différenciation ostéoclastique. En conséquence, nous avons

également pu montrer que l'expression de *NFATC1* et *MMP9*, deux gènes-cibles de NF-κB ainsi que celle du **récepteur** à la **calcitonine**, un marqueur de différenciation ostéoclastique, étaient réduites suite à un traitement par JQ1 (**Fig. 7d, 7e et 7f**). D'autre part, des tests de minéralisation par coloration au Rouge Alizarine ont permis de démontrer l'effet inhibiteur de JQ1 sur la **différenciation ostéoblastique** de **CSMs** humaines (**Fig. 7h**). Au niveau transcriptionnel, cet effet est dû à l'inhibition de l'expression de **RUNX2** par JQ1, déjà mise en évidence dans les cellules cancéreuses, ainsi que de celle de l'ALP, tous deux nécessaires à la différenciation ostéoblastique (**Fig. 7i et 7j**).

I.1.3. Article 1 : « Selective inhibition of BET Bromodomain epigenetic signaling interferes with the bone-associated tumour vicious cycle » *Nat Commun. 2014 Mar* <u>19.</u>

Lamoureux F, Baud'huin M, Rodriguez Calleja L, Jacques C, Berreur M, Rédini F, Lecanda F, Bradner JE, Heymann D, Ory B.



ARTICLE

Received 24 Oct 2013 | Accepted 25 Feb 2014 | Published 19 Mar 2014

DOI: 10.1038/ncomms4511

Selective inhibition of BET bromodomain epigenetic signalling interferes with the bone-associated tumour vicious cycle

François Lamoureux^{1,2,*}, Marc Baud'huin^{1,2,3,*}, Lidia Rodriguez Calleja^{1,2}, Camille Jacques^{1,2}, Martine Berreur^{1,2}, Françoise Rédini^{1,2}, Fernando Lecanda⁴, James E. Bradner^{5,6}, Dominique Heymann^{1,2,3} & Benjamin Ory^{1,2}

The vicious cycle established between bone-associated tumours and bone resorption is the central problem with therapeutic strategies against primary bone tumours and bone metastasis. Here we report data to support inhibition of BET bromodomain proteins as a promising therapeutic strategy that target simultaneously the three partners of the vicious cycle. Treatment with JQ1, a BET bromodomain inhibitor, reduces cell viability of osteo-sarcoma cells and inhibits osteoblastic differentiation both *in vitro* and *in vivo*. These effects are associated with transcriptional silencing of *MYC* and *RUNX2*, resulting from the depletion of *BRD4* from their respective loci. Moreover, JQ1 also inhibits osteoclast differentiation by interfering with BRD4-dependent RANKL activation of *NFATC1* transcription. Collectively, our data indicate that JQ1 is a potent inhibitor of osteoblast and osteoclast differentiation as well as bone tumour development.

NATURE COMMUNICATIONS | 5:3511 | DOI: 10.1038/ncomms4511 | www.nature.com/naturecommunications

¹ INSERM, UMR 957, Équipe labellisée ligue 2012, 1 Rue Gaston Veil, Nantes 44035, France. ² Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, EA3822, 1 Rue Gaston Veil, Nantes 44035, France. ³ Nantes University Hospital, 1 Rue Gaston Veil, Nantes 44035, France. ⁴ Division of Oncology, Adhesion and Metastasis Laboratory, Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, Pio XII-55, Pamplona, Navarra 31008, Spain. ⁵ Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, 44 Binney Street, Boston, Massachusetts 02115, USA. ⁶ Department of Medicine, Harvard Medical School, 25 Shattuck Street, Boston, Massachusetts 02115, USA. * These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to B.O. (email: Benjamin.ory@univ-nantes.fr).

one malignancies can be divided into two classes, primary and secondary bone tumours. Secondary bone tumours arise from disseminated tumour cells that originate from distant primary sites, most commonly from breast, prostate and lung cancers, which subsequently give rise to metastatic development in the bone¹. Malignant primary bone tumours are rare pathologies, with osteosarcoma being the most frequent type in children and young adults and have a poor prognosis owing to its propensity to metastasize. Osteosarcoma is defined as a malignant tumour of mesenchymal cells and its diagnosis is based on histopathological features characterized by the direct formation of abnormal osteoid and/or woven bone². Current therapeutic regimens for osteosarcoma include neoadjuvant and adjuvant chemotherapy combined with tumour resection³. While survival rate can reach 70% at 5 years in the best series, survival rate is significantly reduced to only 30% when pulmonary metastases are detected at the time of diagnosis. Thus, the overall clinical outcome remains poor despite treatment advances, which underscores the need to identify novel therapeutic strategies for osteosarcoma.

The vicious cycle established between osteoclasts (OCs), bone stromal cells/osteoblasts (OBs) and cancer cells is the driving force of osteolytic lesions during progression of primary bone tumours⁴⁻⁶. Histological analyses of osteolytic primary and secondary bone tumours reveal that the bone destruction is mediated by OCs rather than the tumour cells themselves. The tumour cells modify the bone microenvironment and promote the recruitment of OC progenitors by secreting osteoclasticactivating factors such as interleukin (IL)6, tumour necrosis factor- α , IL1 and parathyroid hormone-related protein. The OCs, in turn, resorb bone tissue and release from the bone matrix growth factors that stimulate the proliferation of tumour cells⁶. A key pathway implicated in OC activation is the receptor activator of nuclear factor kappaB (NFkB) and its ligand (RANK/RANKL), which induces the expression of nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1 (NFATC1), a master transcription factor of OC differentiation and one of its downstream effectors like matrix metallopeptidase 9 (MMP9). Given that the interplay between tumour growth and bone resorption is the basis of the vicious cycle of osteosarcoma, a potential therapeutic strategy is to disrupt this cycle by targeting OC and OB differentiation as well as tumour cell proliferation.

Several genes have been identified as drivers of osteosarcoma development. c-MYC (hereafter referred as MYC) is one of the most highly amplified oncogenes in cancer. It encodes an evolutionarily conserved basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factor that is commonly deregulated in numerous types of human malignancies. Owing to a large number of direct transcriptional targets and the resulting activation of many transcriptional and signalling networks, amplification of MYC results in pleiotropic effects on cancer cell survival, proliferation, metastasis and angiogenesis7. Genomic amplification at 8q24 and overexpression of MYC has been observed in osteosarcoma⁸⁻¹⁰. Moreover, *MYC* overexpression in a Ink4/Arf(-/-) context was not only sufficient to transform bone marrow stromal cells but also led to osteosarcoma development¹¹. In addition, RUNX2, a key transcription factor in OB differentiation, appears to be a potential oncogenic driver in osteosarcoma, depending on its expression level and cellular context¹²⁻¹⁵. Indeed, short interfering RNA (siRNA) knockdown of RUNX2 in U2OS osteosarcoma cells was shown to inhibit cell growth, while overexpression of RUNX2 in T-cell lymphoma synergized with MYC to promote survival and proliferation of cancer cells 13,16 . Thus, inhibition of MYC and RUNX2 transcriptional network may be of clinical relevance in osteosarcoma.

Histone modifications are of critical importance for the maintenance of the transcription programme of both normal and tumour cells. Post-translational covalent modifications of the histone amino-terminal tail influence chromatin structure and the accessibility of DNA to transcriptional machinery. The bromodomain and extra-terminal domain (BET) protein family (BRD2, BRD3, BRD4 and BRDT) is an important class of 'epigenetic reader proteins', which function to recognize the N-acetylation of lysine residues on histone tails¹⁷. Bromodomaincontaining proteins act as a scaffold for molecular complexes at recognized histones' sites to regulate chromatin accessibility to transcription factors and RNA polymerase¹⁸. Very recently, BRD4 has been identified as a potent therapeutic target in acute myeloid leukaemia^{19,20}. Moreover, the BET bromodomain proteins have been shown to regulate the expression of MYC in different tumour types^{19–25}. Several studies have tested the pharmacologic inhibition of bromodomains using JQ1, a thienotriazolo-1,4-diazapine that binds selectively to the acetyllysine-binding pocket of the BET bromodomain proteins, inhibiting only BRD2, BRD3, BRD4 and BRDT among the 47 bromodomain proteins with a prevalent affinity for BRD4 (ref. 26). Pharmacologic inhibition of bromodomains leads to selective alterations in gene expression most probably owing to the disruption of strong enhancer-mediated transcription at oncogenic loci, such as those bound by MYC. Indeed, gene set enrichment analysis indicates that one of the most deregulated network is the MYC transcriptome²². Furthermore, JQ1 treatment resulted in a reduction of MYC expression as well as induced cell death in multiple myeloma, leukaemia and lymphoma both in vitro and in vivo^{20,21}.

In this study, we show that BET bromodomain signalling plays a role in osteosarcoma and that inhibition of this epigenetic recognition pathway suppresses osteosarcoma tumour growth both *in vitro* and *in vivo*. We also identify *RUNX2* as a new direct transcriptional target of BRD4, linked to the bone-associated tumour context as inhibition of RUNX2 reduced both osteoblastic differentiation and primary bone tumour development. In addition, we show that the unique and selective BET bromodomain inhibitor JQ1 potently represses not only MYC gene expression but also RUNX2 gene expression as well as their transcriptional network in osteosarcoma cell lines and in vivo tumour models. The JQ1-mediated transcriptional silencing of MYC and RUNX2 corresponds with the release of BRD4 from their respective loci, which further supports the direct transcriptional activation of these genes by BRD4. Finally, we uncover a BRD4-dependent RANKL activation pathway in osteoclastogenesis, which is also inhibited by JQ1 treatment. Taken together, our findings indicate that targeting the BET bromodomain signalling pathway in primary bone cancer can effectively disrupt the vicious cycle through transcriptional repression of oncogenic drivers in osteosarcoma as well as through the inhibition of OB and OC differentiation. Importantly, our work provides a strong clinical rationale for the use of BET bromodomain inhibitors, specifically JQ1, as a therapeutic approach for osteosarcoma.

Results

BET bromodomain proteins and *MYC* **overexpression in patients**. To assess the therapeutic potential of targeting BET bromodomain signalling in osteosarcoma, we first evaluated the messenger RNA expression level in human osteosarcoma patient samples of *BRD2, BRD3, BRD4* and *BRDT* as well as *MYC*, since it has been associated to the *BRD4* inhibition effects^{17,18}. Compared with normal mesenchymal stem cells (MSCs), 9 out of 14 patients overexpressed both *BRD4* and *MYC*, 11 out of 14

overexpressed BRD2 and MYC and 7 out of 14 overexpressed BRD3 and MYC (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1). None of the patients expressed BRDT, which is a tissue-specific protein. This finding suggests that the majority of osteosarcoma patients express the required molecular targets for an inhibition of BET bromodomains epigenetic signalling strategy, which is the minimal rational to make them candidates to this therapy. Moreover, we observed a strong correlation (P < 0.001) between the expression level of BRD4 with MYC, using the Pearson product-moment correlation coefficient (R^2 ; Fig. 1b). As the size of our patient cohort was limited, we validated this correlation in a lager cohort of 27 osteosarcoma patients' biopsy samples obtained by Dr Yamada T from the National Cancer Center of Tokyo (GEO Series GSE14827)²⁷. The expression array study confirmed the strong correlation between BRD4 and MYC expression level (Supplementary Fig. 2).

No correlation has been observed between *MYC* and *BRD2* or *BRD3* using either our patient tumour samples or the larger Yamada lab cohort. Unfortunately, the sizes of our patient cohort or even the complete Yamada's patient cohort are not big enough to correlate the clinical outcome of the patient with *BRD4* or *MYC* expression or with age, sex, tumour location, histological origin or response to chemotherapy (Fig. 1c and Supplementary Fig. 2). We then evaluated the *BRD2, BRD3, BRD4* and *MYC* expression level in various patient-derived osteosarcoma cell lines and murine osteosarcoma cell lines. We observed an interesting variability, comparable to our patient cohort, which prompted a more detailed study of BET bromodomain signalling in osteosarcoma (Fig. 1d and Supplementary Figs 1 and 3).

Inhibition of BET bromodomain proteins *in vitro*. To evaluate the therapeutic potential of BET bromodomain inhibition in



Figure 1 | Brd4 and MYC messenger RNA levels are overexpressed in osteosarcoma patients. (a) Expression of *BRD4* and *MYC* mRNA levels were evaluated by qRT-PCR in human osteosarcoma biopsies compared with normal cells. (b) Correlation between *BRD4* and *MYC* expression in human osteosarcoma specimens, assessed by qRT-PCR and tested by the Pearson product-moment correlation test. (c) Clinical features of osteosarcoma patients. (d) Expression of *BRD4* and *MYC* mRNA levels in human osteosarcoma cell lines, assessed by qRT-PCR. Error bars show s.e.m. for n = 3 measurement from representative experiments.

osteosarcoma, we used the pharmacological inhibitor JQ1, a thienotriazolo-1,4-diazapine that binds selectively to the acetyl-lysine-binding pocket of the BET bromodomain protein (Fig. 2a)²⁶. We first treated a panel of nine genetically defined human osteosarcoma cell lines (Fig. 2b) with the BET inhibitor JQ1 to assess its effect on cell viability. A dose-dependent inhibition of cell viability was observed in all cell lines studied. Comparison of the GI₅₀ of each tumour cell line revealed no significant difference in cell viability sensitivity for MNNG/HOS, KHOS, U2OS and MG63 cell lines as they exhibited a GI₅₀ between 0.268 and 1.081 µM. In contrast, the others cell lines tested were about 10 times more resistant compared with the first ones, among them, SaOS2 cells with a GI_{50} of 6.457 μ M (Fig. 2b). Then we performed a colony formation assay in the presence or absence of JQ1, which revealed significant differences between the cell lines in terms of their capacity to recover following 2 days of BET inhibitor treatment (1µM). Indeed, while U2OS and MNNG/HOS exhibited significant reduction in colony formation, MG63 and SaOS2, respectively, exhibited moderate sensitivity or no sensitivity at all to JQ1 treatment (Fig. 2c,d). These differences were further confirmed by cell cycle analysis. The proportion of cells in subG₁ (representing dead cells as determined by propidium iodide staining) was strongly induced by JQ1 treatment in U2OS and MNNG/HOS, but was only modestly increased in MG63 and unchanged in SaOS2 (Fig. 2e). Finally, apoptosis was evaluated in osteosarcoma cells by assessing the level of cleaved poly (ADP-ribose) polymerase after JQ1

treatment. Consistent with the results of the colony formation assays and cell cycle analysis, the same sensitivity profile was observed in the two cell lines with the lowest level of both BRD4 and MYC, namely, MNNG/HOS and U2OS were the most sensitive to apoptosis induction as revealed by the level of cleaved poly (ADP-ribose) polymerase, whereas two cell lines with a high level of BRD4 and MYC, namely, MG63 and SaOS2 were more resistant to the apoptotic effect of JQ1 (Fig. 2f). In addition, the induced apoptosis was confirmed in MNNG/HOS to be caspase-3 dependent (Supplementary Fig. 4A). These results confirmed our hypothesis that sensitivity of osteosarcoma tumours to BET bromodomains signalling inhibition is dependent on the expression level of BRD4 and MYC. We confirmed this hypothesis by the study of JQ1-resistant cell lines. We established MNNG/HOS-resistant cells by long-term exposure to increasing concentrations of JQ1. Once a significant difference in term of GI₅₀ could be observed, we performed quantitative reverse transcription (qRT)-PCR expression analysis for the BET bromodomains and MYC. As predicted by our hypothesis, we observed an overexpression of MYC and BRD4 in the resistant cell line, we also observed an overexpression of BRD2 but not BRD3, suggesting a possible implication of several members of the BET bromodomain family in the mediation of JQ1 effects (Supplementary Fig. 4B). The sensitivity of murine osteosarcoma was also confirmed by the decrease in MYC expression, cell viability and colony formation in MOS-J, POS-1 and K7M2 cell lines (Supplementary Fig. 4C,D).



Figure 2 | JQ1 inhibits cell growth and induces apoptosis in human osteosarcoma cell lines. (a) Chemical structure of JQ1. (b) Human osteosarcoma cell lines (U2OS, MNNG/HOS, MG63, KHOS, SJSA-1, 143B, Cal72, G292 and SAOS2) were cultured for 72 h in the presence of JQ1 at the indicated concentration, and cell growth was determined by crystal violet assay and compared with control. GI_{50} for JQ1 in tumour cell lines. (c) Osteosarcoma cells were treated with 1µM JQ1 for 2 days, and then plated at clonal density for colony counts (d). (e) Osteosarcoma cells were treated with 1µM JQ1 for 2 days, and then plated at clonal density propidium iodide staining. (f) Osteosarcoma cells were treated with 1 or 10 µM JQ1 for 2 days and apoptosis was evaluated by cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) level by western blotting. All experiments were repeated at least twice. Error bars show s.e.m. for n = 3 measurement from representative experiments.

MYC-dependent growth inhibitory effect of BET inhibition. Since downregulation of MYC expression has been previously described as a consequence of BRD4 inhibition¹⁹, we accordingly examined the expression level of MYC after JQ1 treatment. In all the osteosarcoma cell lines tested, IO1 treatment decreased MYC expression in a dose- and time-dependent manner (Fig. 3a, Supplementary Fig. 5A,B). We observed the same results in murine cell lines (Supplementary Fig. 6). Indeed, after only 30 min of 0.5 µM JQ1, MYC expression was decreased by 30% in all cell lines studied, and 1h of 0.1 µM JQ1 was sufficient to observe a significant effect (Fig. 3a). To confirm the functional impact of MYC transcriptional inhibition by JQ1, we assessed its effect on the expression of the MYC target gene mir-17-92 (Fig. 3b). After 24 h in the presence of $0.5 \,\mu\text{M}$ of JQ1, all seven microRNAs in the mir-17-92 cluster were significantly downregulated (Fig. 3c), Furthermore, p21, a direct target known to be repressed by the mir-17-92 cluster, was highly upregulated by 12-fold (Fig. 3d and Supplementary Fig. 7A). Interestingly, the rapid transcriptional effect of the BET inhibitor on MYC gene expression suggests the possibility that BET proteins may exert direct activation of the MYC locus. To determine whether BET proteins bind directly to the MYC locus, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies by using an antibody targeting BRD4 in MNNG/HOS cells. We detected specific enrichment of BRD4 within the MYC promoter region at several locations including both upstream and downstream sites relative to the transcriptional start site (Fig. 3e). Furthermore, treatment of these cells with JQ1 induced the release of BRD4 from the promoter and binding sites (Fig. 3e, bottom). The presence of DNAse hypersensitive sites and increased enrichment for histone 3 lysine 27 acetylation (H3K27ac) at the MYC promoter region indicates active transcription, perhaps associated with 'super-enhancer region' as recently described^{28,29}. The specificity of the BRD4 antibody used in this study was assessed in a gene desert region that displayed no BRD4 enrichment. As mentioned for the resistance experiment, it looks like BRD2 (but not BRD3) might also be involved in the JQ1 effects on osteosarcoma. To validate our hypothesis, we performed the same ChIP at the MYC promoter region with a BRD2 antibody. While we observed an enrichment of BRD2 for the same regulatory areas as BRD4 on the MYC promoter region, no release of BRD2 was observed in the presence of JQ1. We even observed an opposite effect with a strong enrichment of BRD2 after JQ1 treatment. This effect is possibly due to the higher affinity of JQ1 for BRD4, interfering in the competition between BRD2 and BRD4 for the same binding sites. This effect did not lead to more MYC transcription, which is in agreement with the fact that neither BRD3 nor BRD2 were correlated with MYC expression in our patient cohort and BRD2 does not seem to be involved in JQ1 effects (Supplementary Fig. 7B). These findings demonstrate that BRD4 is present on the MYC promoter region and that JQ1 is able to deplete BRD4 from the promoter, thus inhibiting MYC transcription in an osteosarcoma cell line. Next, the growth-promoting activity of MYC was validated in our model using siRNA (Fig. 3f). To evaluate whether suppression of MYC mediates the growth inhibitory effect of BRD4 inhibition by JQ1, we performed a recovery assay by transfecting MYC or empty vector control into MNNG/HOS cells (Fig. 3g), followed by treatment with JQ1. Overexpression of MYC decreased significantly the antiproliferative effect of JQ1 in osteosarcoma cells. Interestingly, it did not however inhibit fully the anti-proliferative effect of JQ1.

anti-proliferative effect of JQ1, we then focused our attention on *RUNX2*, a master transcription factor in osteosarcoma and OB. The expression level of *RUNX2* was next evaluated in osteosarcoma patient samples compared with normal MSCs. We found that all the patient samples overexpressed *RUNX2* (Fig. 4a). Moreover, we observed a strong correlation (P < 0.0001) between the expression levels of *BRD4* and *RUNX2* using the Pearson product-moment correlation coefficient (R^2 ; Fig. 4b). We validated this correlation in a lager cohort of 27 osteosarcoma patient biopsy samples obtained by Dr Yamada T from the National Cancer Center of Tokyo (GEO Series GSE14827)²⁷. The expression array study confirmed the strong correlation between the expression levels of *BRD4* and *RUNX2* (Supplementary Fig. 2).

No correlation has been observed between RUNX2 and BRD2 or BRD3 using either our patient tumour samples or the larger Yamada's lab cohort. Next, we evaluated the expression level of RUNX2 in different osteosarcoma cell lines and murine osteosarcoma cell lines. We observed an interesting variability, comparable to that observed within our patient cohort, which prompted us to study in greater detail the consequences of RUNX2 sensitivity to BET inhibition (Fig. 4c and Supplementary Fig. 3). Interestingly, the two cell lines that express the highest level of RUNX2 (MNNG/HOS and U2OS) also express the lowest level of MYC, suggesting that different oncogenic processes may be driving these tumour cell lines (Figs 1d and 4c). We next investigated the expression level of RUNX2 after JQ1 treatment. In all the examined osteosarcoma cell lines, JQ1 treatment decreased RUNX2 expression in a time- and dose-dependent manner (Fig. 4d,e and Supplementary Fig. 8A,B). Similar to MYC, the growth-promoting activity of RUNX2 in osteosarcoma was validated in our cell model by siRNA knockdown and colony formation assay (Fig. 4f). Interestingly, we observed also the relatively fast transcriptional effects of BET inhibition on RUNX2 gene expression. This finding suggests that BET proteins might exert direct effects on the RUNX2 locus. To determine whether BET proteins bind directly to the RUNX2 locus, we performed ChIP studies by using an antibody against BRD4 in MNNG/HOS cells. While no enrichment of BRD4 within the RUNX2 promoter was detected, specific binding at the major H3K27 acetylated rich sites was observed (Fig. 4g). Treatment with JQ1 induced the release of BRD4 from these sites (Fig. 4g). The presence of DNAse clusters and the higher level of H3K27 acetylation in the identified binding sites indicate transcriptional activity and suggest the presence of a putative 'super-enhancer region'^{28,29}. The specificity of the BRD4 antibody used in this study was also assessed in a gene desert region that displayed no BRD4 enrichment. For the same reasons as the MYC promoter, we performed a BRD2 ChIP for the RUNX2 locus. While we observed an enrichment of BRD2 for the same regulatory areas as BRD4 on the RUNX2 promoter region, no release of BRD2 could be observed in the presence of JQ1. We observed an opposite effect with a strong enrichment of BRD2 after JQ1 treatment (Supplementary Fig. 8C). To validate that the specificity of JQ1 effects on RUNX2 gene expression was mediated through the inhibition of BRD4-binding activity, we also assessed BRD4 enrichment at the IL7R locus following JQ1 treatment. IL7R is a recently described target of JQ1, BRD4 being removed from its promoter after treatment²². In our model, absolutely no BRD4 binding was detected at the IL7R promoter area with or without JQ1 treatment, confirming context-specific regulation of gene expression (Supplementary Fig. 8D).

BET protein inhibition depletes BRD4 from the *RUNX2* **promoter.** As *MYC* downregulation did not account for all the

JQ1 delays osteosarcoma development and prolongs survival. To investigate the *in vivo* therapeutic potential of BET inhibition in osteosarcoma, we used two models, a human xenograft model



Figure 3 | Growth inhibition by JQ1 in osteosarcoma cells is dependent on MYC downregulation. (a) qRT-PCR for MYC RNA levels in JQ1-treated osteosarcoma cell line at (i) different time points (500 nM JQ1) and at (ii) different doses (1h). analysis of variance (ANOVA), Bonferroni multiple comparisons statistical test has been used. (b) Schematic representation of the relationship between *MYC, mir-17-92* cluster and *p21*. (c) qRT-PCR for the mir-17-92 expression in JQ1-treated osteosarcoma cell (24 h, 0.5 μ M JQ1). (d) qRT-PCR for p21 RNA levels in JQ1-treated osteosarcoma cell line (500 nM JQ1). ANOVA, Bonferroni multiple comparisons statistical test has been used. (e) ChIP with a BRD4 antibody at two sites within the *MYC* promoter region in cells treated with 500 nM JQ1 for 4 h. Enrichment is shown as the percentage of total input DNA. The top track shows the levels of enrichment of the H3K27Ac histone mark across the genome as determined by a ChIP-seq assay on seven cell lines from ENCODE (f) Immunoblotting for MYC in siCT (control siRNA) or siMYC (MYC siRNA) transfected MNNG/HOS cells and inhibition of cell proliferation in corresponding cells treated with JQ1 (500 nM, 72 h). *t*-test statistical analysis has been used. (g) Immunoblotting for MYC from empty pCDNA vector- or *MYC* overexpression vector-transduced MNNG/HOS cells and inhibition of cell proliferation in corresponding cells treated with JQ1 (500 nM, 72 h), *t*-test statistical analysis has been used. Fror bars show s.e.m. for *n*=3 measurement from representative experiments.

(using the MNNG/HOS cell line) and a syngeneic model (using the POS-1 cell line), both of which are known to recapitulate the features of the human disease. The POS-1 tumour cells were implanted in C3H mice while MNNG/HOS cells were injected in athymic mice at day 1 with 2 million cells in paratibial, and mice were then injected with JQ1 (50 mg kg⁻¹ intraperitoneally (IP))



Figure 4 | The anti-tumoral activity of JQ1 involves the BRD4 depletion from the Runx2 promoter. (a) Expression of *RUNX2* messenger RNA level was evaluated by qRT-PCR in human osteosarcoma biopsies compared with normal cells. (b) Correlation between *BRD4* and *RUNX2* expression in human osteosarcoma specimens, assessed by qRT-PCR and tested by the Pearson product-moment correlation test. (c) Expression of *RUNX2* mRNA level in human osteosarcoma cell lines, assessed by qRT-PCR and tested by the Pearson product-moment correlation test. (c) Expression of *RUNX2* mRNA level in human osteosarcoma cell lines, assessed by qRT-PCR. (d,e) qRT-PCR for *RUNX2* RNA levels in JQ1-treated MNNG/HOS cell line at (d) different time points (500 nM JQ1) and at (e) different doses (8 h). Analysis of variance (ANOVA), Bonferroni multiple comparisons statistical test has been used. (f) Immunoblotting for RUNX2 from siCT (control siRNA) or si*RUNX2* (RUNX2 siRNA) transfected MNNG/HOS cells and then plated at clonal density for colony counts and inhibition of cell proliferation. *t*-test statistical analysis has been used. (g) ChIP with a BRD4 antibody at three sites around the *RUNX2* promoter region in cells treated with 500 nM JQ1 for 4 h. Enrichment is shown as the percentage of total input DNA. The top track shows the levels of enrichment of the H3K27Ac histone mark across the genome as determined by a ChIP-seq assay on seven cell lines from ENCODE. Error bars show se.m. for n = 3 measurement from representative experiments.

or vehicle twice a day for the indicated time. JQ1 treatment had a dramatic anti-tumoral effect, significantly reducing the average tumour volume in both mouse models. (Fig. 5a,e). Furthermore, the individual tumour volumes of treated mice compared with control group demonstrated a consistent effect of the treatment across the groups (Fig. 5b,f). Importantly, not a single treated mouse had a tumour progression over 1,000 mm³ at day 20 and day 10 for the human and the mouse model, respectively, while all the untreated mice had tumours that exceeded that volume (Fig. 5c,g). In both models, the reduction in tumour volume obtained at the end of the experiment with JQ1 treatment was \sim 60%. The Kaplan-Meier analysis revealed that JQ1 treatment significantly prolonged survival of tumour-bearing mice. Incredibly, 100% of mice bearing MNNG/HOS tumour cells and 40% of mice bearing POS-1 cells were still alive with JQ1 treatment at the time when untreated mice were killed as their

tumour volume reached institutional limits (Fig. 5d,h). Immunohistochemical staining for the proliferative marker Ki67 in tumour samples from mice showed that JQ1 treatment decreased cell proliferation as compared with the untreated cohort (Fig. 5i). Expression analysis for MYC and RUNX2 was also performed on these mice tumour samples. We observed a significant and reproducible repression of MYC and RUNX2 expression with JQ1 treatment, consistent with our in vitro results (Fig. 5j). Finally, as a functional validation for JQ1-mediated transcriptional repression of MYC in the mice tumour samples, we evaluated p21 expression (Fig. 5j). As expected, p21 expression was highly increased in the mice cohort treated with JQ1. Taken together, these data suggest that the potent in vivo anti-tumoral activity of JQ1 in osteosarcoma is probably mediated through its direct effects on the RUNX2 and MYC/p21 transcriptional network.



Figure 5 | **JQ1 significantly delays tumour growth in MNNG/HOS xenograft and POS-1 syngeneic models and prolongs cancer-specific survival.** Mice were IP injected with 50 mg kg⁻¹ JQ1 or vehicle (10% HP- β -CD) twice a day for the indicated time when tumour volume reached 100 mm³. The mean (**a**, human MNNG/HOS xenograft model and **e**, mouse POS-1 syngeneic model) or the individual (**b**,**f**) tumour volume of mice treated was compared with control group ± s.e.m. (respectively, n = 8 or n = 6). (**c**,**g**) The tumour progression was estimated as the relative tumour volumes (RTV) calculated from the formula: RTV = ($V_{20} - V_1$) where V_{20} is the mean tumour volume at day 20 and V_1 is the mean tumour volume at day 1 after starting treatment. (**d**,**h**) In Kaplan-Meier curves, cancer-specific survival were compared between mice treated with JQ1 and control. (**i**) Tumours were collected after 35 days (MNNG/HOS xenograft model) or 23 days (POS-1 model) and Ki67 was evaluated by immunohistochemical analysis (original magnification, × 200; scale bar, 200 µm). (**j**) *MYC*, *p21* and *RUNX2* were evaluated in tumour tissues, after RNA extraction, by qRT-PCR. Error bars show s.e.m. for n = 3 measurement from representative experiments.

JQ1 prevents osteosarcoma tumour-associated bone deficiencies. We next examined the effects of JQ1 on the bone microarchitecture of tumour-bearing tibia from mice injected with MNNG/HOS cells using microcomputed tomography (microCT; Fig. 6a) followed by three-dimensional reconstruction (Fig. 6b). Surprisingly, JQ1 treatment preserved the bone microarchitecture as there was a marked reduction in tumour-associated osteolysis, a common feature of tumour-bearing bone (Fig. 6a,b). An extensive analysis of multiple bone morphometric parameters revealed a strong and significant amelioration of tumourassociated bone quality in the JQ1-treated group. Indeed, JQ1 treatment prevented destruction of the trabecular bone and improved the trabecular bone volume (BV/TV) from 3 to 13% (Fig. 6c), the trabecular number (per mm) from 0.5 to 1.6 (Fig. 6d), the trabecular thickness (mm) from 0.06 to 0.08 (Fig. 6e) and decreased the trabecular separation (mm) from 0.57

to 0.41 (Fig. 6f). One characteristic of osteosarcoma tumours is the formation of ectopic bone. Our analysis using microCT showed a strong decrease of this ectopic bone formation in the presence of JQ1 on the tumour-bearing tibia, with an average of only 0.13 mm³ against 1.73 mm³ in the vehicle group (Fig. 6g,h). Histological analysis of the tumour-bearing bone with tartrateresistant acid phosphatase (TRAP) and Osterix staining revealed that JQ1 treatment strikingly decreased the number of OCs as well as the number of OBs (Fig. 6i,j). The same bone morphometric analysis was also conducted on tumour-bearing tibia from the syngeneic mouse model and similar results in bone quality improvement were observed in the JQ1-treated cohort (Supplementary Fig. 9).

BET inhibition interferes with the OC and OB differentiation. Given the surprisingly strong effects of BET bromodomain



Figure 6 | BRD4 inhibition prevents MNNG/HOS tumour bone loss. Representative microCT (**a**) and three-dimensional model (**b**) images of the tumourbearing tibia, taken *ex vivo*, from MNNG/HOS-bearing mice treated with JQ1 (50 mg kg⁻¹) or vehicle (Veh.). (**c**-**f**) MicroCT analysis of the BV/TV (%) (**c**), trabecular number (Tb.N (per mm)) (**d**), trabecular thickness (Tb.Th (mm)) (**f**) and trabecular separation (Tb.Sp (mm)) of the tibia of tumour-bearing mice treated JQ1 or vehicle. (**g**) Representative images of the ectopic bone (red) of tumour-bearing tibia, taken *ex vivo*, from MNNG/HOS-bearing mice treated with JQ1 (50 mg kg⁻¹) or vehicle (Veh.). (**h**) MicroCT analysis of the ectopic BV (mm³). TRAP (**i**) and Osterix (**j**) were evaluated by immunohistochemical analysis (original magnification, $\times 200$; scale bar, $200 \,\mu$ m). Specimens were scored and estimated in % of positive cells \pm s.d. for OSTERIX, and the surface occupied by OC was determined by ImageJ in the delimited region of interest (ROI). Error bars show s.e.m. for n = 3measurement from representative experiments.

proteins inhibition on the bone-microarchitecture, tumourassociated osteolysis and OC as well as OB number in the tumour bearing bone, we further evaluated the possible effect of JQ1 on OC and OB differentiation. First, purified human CD14⁺ monocytes were cultured in the presence of human macrophage colony stimulating factor and hRANKL to induce osteoclastic differentiation as well as in the presence or absence of JQ1. Subsequently, TRAP coloration was performed and the number of multinucleated cells was assessed (Fig. 7a). BET bromodomain protein inhibition by JQ1 treatment indeed blocked OC differentiation by more than 80% (Fig. 7b). This block in OC differentiation by JQ1 appears to be independent of its effect on cell proliferation and survival as it had virtually no effect on the cell viability of OC precursors. (Supplementary Fig. 10). To begin to identify the underlying mechanism of JQ1-mediated inhibition of OC differentiation, we first tested the activity of NFkB using a luciferase-based reporter construct containing its consensus binding site. Cells expressing RANK were transfected with the NFkB promoter construct and were then treated with RANKL in the presence or absence of JQ1. Our results show that treatment with JQ1 suppressed by more than 50% RANKL-stimulated NFkB transcriptional activity (Fig. 7c). We then confirmed the suppressive effect of JQ1 on NFkB activity by examining the expression of NFkB target genes that are known to be associated with the differentiation process of OC. JQ1 not only decreased the expression of NFkB target genes NFATC1 and MMP9 but also completely abrogated the expression of calcitonin receptor,

a marker of OC differentiation in OC precursors cultured with RANKL (Fig. 7d-f). Consistent with these findings, ChIP analysis confirmed the presence of BRD4 at several NFkB-binding sites on the NFATC1 and MMP9 promoters. Moreover, we demonstrated enrichment of BRD4 only when NFkB was activated by RANKL and that JQ1 was able to deplete BRD4 from these promoters in RANKL-stimulated OC precursors. As suggested above, BRD2 might be implicated in the JQ1 effects; this hypothesis is even more relevant in the case of NFkB-dependent promoter like NFATC1 and MMP9 because significant published evidence shows that BRD2 has a non-redundant, BRD4-independent role in proliferation and inflammation regulating NFkB target genes, for instance IL-6 and tumour necrosis factor- α transcription³⁰. We performed a BRD2 ChIP looking at several NFkB-binding sites on the NFATC1 and MMP9 promoters. While we demonstrated a RANKL-dependent enrichment of BRD2 on the NFkB-binding sites, no significant depletion of BRD2 in presence of JQ1 could be observed (Supplementary Fig. 11). Altogether, these data indicate that JQ1 likely inhibits pro-osteoclastic differentiation through interference with BRD4-dependent RANKL activation of NFATC1 and MMP9 transcription (Fig. 7g and Supplementary Fig. 12). Next, we interrogated the effect of JQ1 on OB differentiation using human MSCs cultured in OB differentiation medium as well as in the presence or absence of JQ1. After 21 days, we assessed OB differentiation by evaluating the extent of mineralization staining with Alizarin red. JQ1 treatment resulted in a marked decrease by 60% in


Figure 7 | BRD4 inhibition inhibits bone cells differentiation. (**a**,**b**) Purified human CD14⁺ monocytes were cultured for 13 days in the presence of M-CSF, RANKL and JQ1. TRAP colouration was performed at the end of the culture period (**a**) and multinucleated TRAP-positive cells were counted under a light microscope (scale bar, 100 μ m) (**b**), t-test statistical analysis has been used. (**c**) Activity of the transcription factor NFkB as assessed with a luciferase report assay. HEK293-RANK were transfected with NFkB-Luc vector and then treated with and JQ1 (500 nM) for 24 h. Results show relative luciferase units (RLU, in %) normalized to the condition without RANKL. (**d-f**) qRT-PCR for *NFATC1* (**d**), *MMP9* (**e**) and *CTR* (calcitonin receptor) (**f**) RNA levels in human CD14⁺ monocytes cultured in the presence of M-CSF, RANKL and 125 nM JQ1 after 3 days (**d**) or 11 days (**e**,**f**). Analysis of variance (ANOVA), Bonferroni multiple comparisons statistical test has been used. Results are expressed as fold increase compared with the condition without RANKL (100 ng ml⁻¹) for 1h. Enrichment is shown as the percentage of total input DNA. The top track shows the levels of enrichment of the H3K27Ac histone mark across the genome as determined by a ChIP-seq assay on seven cell lines from ENCODE. (**h-j**) Human MSCs were cultured in OB differentiation medium (Diff. medium) and treated with JQ1. After 21 days, mineralization was quantified after staining with alizarin red-S (**h**). Expression of *RUNX2* (**i**) and *ALP* (alkaline phosphatase) (**j**) RNA levels were assessed by qRT-PCR. Results are expressed as fold increase compared with the control condition without differentiation medium. ANOVA, Bonferroni multiple comparisons statistical test has been used. Error bars show s.e.m. for n=3 measurement from representative experiments.

mineralization staining, indicating that BRD4 inhibition blocks OB differentiation (Fig. 7h). This inhibition of OB differentiation by JQ1 is completely independent of its effect on cell proliferation/survival as revealed by cell viability assays (Supplementary Fig. 13A). Then, we examined the expression of RUNX2, which plays a critical role in OB differentiation, in addition to the expression of ALP (alkaline phosphatase), a marker of the osteoblastogenesis. JQ1 treatment leads to significant reduction in RUNX2 and ALP gene expression, emphasizing the inhibitory effect of JQ1 at the transcriptional level (Fig. 7i,j). This finding is consistent with our previous results showing that BRD4 was detected at the RUNX2 DNA locus and that JQ1 was able to deplete BRD4 from those sites (Fig. 4g). Taken together, these data indicate that BRD4 inhibition with JQ1 blocks both osteoclastogenesis and osteoblastogenesis in vitro and in vivo. Finally and equally importantly, we found that microCT analysis of normal bone following JQ1 treatment showed no significant adverse effects on bone morphometric parameters (Supplementary Fig. 13B-F).

Discussion

The vicious cycle established between bone-associated tumours and bone resorption is the fundamental pathophysiologic feature of both primary bone tumours and bone metastasis^{1,5}. While therapeutic interventions have been developed to disrupt the vicious cycle of bone cancer, none to our knowledge targets all three partners of this cycle, the bone-associated tumours, OB and OCs. For example, clinical treatment with the bisphosphonate zoledronic acid induces apoptosis in OC and in some reports cell death in the tumour cells³¹, while treatment with the anti-RANKL monoclonal antibody denosumab inhibits OCs³². In this study, we uncover an essential role of BET bromodomain signalling in the vicious cycle as inhibition of BET bromodomain signalling not only potently suppresses the proliferation of bone-associated tumour cells but the differentiation of both OB and OC as well. Thus, our work is the first to support BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to simultaneously target all three partners of the vicious cycle, which suggest that this approach may yield better therapeutic efficacy than standard treatments for primary and secondary bone cancer.

Since the recent discovery that BET proteins act as mediators in the epigenetic recognition of acetylated lysines to regulate chromatin accessibility, it has become an increasingly attractive therapeutic target in several types of cancer^{19–22,26}. Here we report for the first time data to support bromodomain inhibition as a therapeutic strategy for bone-associated tumours. Using the unique BET protein inhibitor JQ1, we demonstrate potent activity against a range of human and mouse osteosarcoma cell lines as well as in osteosarcoma preclinical models. We observe a strong reduction in cell viability of osteosarcoma cells with BET bromodomain inhibition irrespective of whether the oncogenic 'driver' was MYC or RUNX2. Furthermore, it should be noted that the reduction of MYC gene expression does not fully account for the anti-proliferative effect of BET inhibition, as exogenous expression of MYC could not completely abolish the growth inhibitory effect of JQ1. This observation led us to the finding that BET inhibition also resulted in the downregulation of RUNX2 gene expression in osteosarcoma cells. This finding is of clinical relevance, given the emerging role of RUNX2 as a potential oncogene in osteosarcoma^{12–16}. In addition, we found that RUNX2 gene expression, as well as that of MYC and BRD4, was higher relative to MSCs in the majority of our human osteosarcoma patient samples suggesting an addiction or at least a dependence to those oncogenes. This makes most

osteosarcoma patients likely to be sensitive to this *BRD4-*, *MYC-* and *RUNX2-*dependent therapeutic strategy.

In our model, BRD4 actively binds to both *MYC* and *RUNX2* gene loci, specifically at the sites of highly acetylated H3K27. In support of this, we observe that transcriptional silencing of *MYC* and *RUNX2* following JQ1 treatment is associated with the release of BRD4 proteins from their corresponding loci, indicating that BET proteins directly regulate the expression of *MYC* and *RUNX2* genes. Moreover, BRD4 is released from the acetylated histones of the *MYC* and *RUNX2* gene loci in response to JQ1 treatment, consequently leading to their reduced gene expression.

While we observed striking anti-tumoral activity against primary bone tumours in vivo with BET inhibition, resulting in prolonging overall survival as well as improving tumourassociated bone structural parameters, JQ1 had virtually no adverse effects on normal bone architecture. Although BRD4 is expressed in almost all tissues, no overt toxicity was detected with high doses of JQ1. Indeed, repeated treatments with JQ1 did not result in weight loss or other negative effects during the course of the experiment. This highlights the importance of understanding how the inhibition of a ubiquitous regulator like BRD4 can have such a gene-specific effect on transcription. Interestingly, recent studies have identified an asymmetric distribution of BRD4 at enhancer regions across the epigenome, the so-called superenhancers have a high: density of transcription factors, ability to activate transcription, levels of H3K27 acetylation and sensitivity to perturbation by BET bromodomain inhibition^{28,29}. These super-enhancers are described to be associated with key cell typespecific genes known to play prominent roles in the biology of normal cells, and with oncogenic drivers in tumour cells. Furthermore, JQ1 treatment of multiple myeloma tumour cells caused the preferential loss of BRD4 at super-enhancers and preferential loss of transcription at super-enhancer-associated genes including the MYC oncogene. The mechanistic explanation of this phenomenon is based on the behaviour of regular enhancer regions, where cooperative and synergistic binding of multiple transcription factors can occur. The more cooperatively interacting factors there are bound on enhancers, the more sensitive these enhancers are to small changes in transcription factor concentration^{33–35}. Consequently, super-enhancer regions are extremely sensitive to reduced level of BRD4, which could possibly explain the gene-selective effects of JQ1. It is very likely that the new target of JQ1 identified in our study, namely, RUNX2, fit the definition of a super-enhancer. RUNX2 is not only a key cell type gene for OB but also a potential oncogenic driver for osteosarcoma. Moreover, we observe on ENCODE a high level of H3K27 acetylation mark along with a very high density of transcription factor-binding sites at the BRD4 binding sites of the RUNX2 locus.

An unexpected finding was the effect of BET inhibition on OC differentiation. We observed that JQ1 inhibited NFkB activity without altering its transcription. NFkB is the key upstream regulator of osteoclastogenesis, directly activated by RANK after RANKL binding, and one of its primary transcriptional targets is the transcription factor NFATC1. Under basal condition, we did not detect binding of BRD4 to the NFATC1 promoter irrespective of the level of H3K27 acetylation, emphasizing the possible absence of BRD4 at some gene promoters. However, on RANKL activation, we observed strong binding of BRD4 onto the NFATC1 promoter at the precise NFkB consensus sites previously reported³⁶. Our interpretation of these results is that BRD4 functions as a co-activator of NFkB via specific binding to its acetylated RelA subunit. Indeed, BRD4 has been identified as a co-activator of NFkB through its binding to the acetylated lysine-310 of RelA^{37,38}. In agreement with this, we also found that JQ1 abrogated BRD4 binding to NFkB consensus sites on the



Figure 8 | BET bromodomain inhibition as a new therapeutic strategy to block the vicious cycle in bone tumours. The vicious cycle described in primary bone tumours and bone metastases consists of release of osteolytic mediators by tumour cells and OBs, thus inducing bone degradation and then releasing growth factors from degraded bone, enhancing tumour cell growth and further release of osteolytic mediators. In the present study, we describe for the first time the therapeutic interest of BET bromodomain inhibitor, JQ1, in the treatment of osteosarcoma not only by the prevention of osteosarcoma-induced osteolysis by blocking both OC and OB differentiation, but also by the inhibition of associated tumour development, leading to increased survival rate.

NFATC1 promoter as well as inhibited osteoclastogenesis. Similar results were also found with MMP9, an OC functional protein. Taken together, our results indicate that BRD4 is an essential regulator of osteoclastogenesis and highlights the requirement for BRD4 in regulating *MYC* and *RUNX2* through one specific mechanism, and *NFATC1* through a completely different mechanism.

In conclusion, pharmacological inhibition of BET bromodomain proteins appears to be a promising and relevant strategy for the treatment of bone-associated tumours as it interferes with the vicious cycle between bone tumour development and bone remodelling. Importantly, JQ1 becomes the first described compound to inhibit simultaneously bone tumour growth as well as both OB and OC differentiation. The ability of the BET inhibitor JQ1 to target all three major components of the vicious cycle makes it potentially less sensitive to develop treatment resistance, an aspect that we will further investigate (Fig. 8). This triple inhibitory effect associated with low toxicity *in vivo* makes JQ1 a promising therapeutic agent for the treatment of both primary bone tumours and bone metastasis.

Methods

Tumour cell line and patient tumour material. The human osteosarcoma cell lines MG63 (young male osteosarcoma), SaOS2 (young female osteosarcoma), U2OS (young female osteosarcoma from tibia origin), MNNG/HOS (young female high-grade osteosarcoma from femur origin transformed in vitro by N-methyl-N'nitro-N-nitrosoguanidine treatment), KHOS (this cell line was derived from HOS by transformation using Kirsten murine sarcoma virus (Ki-MSV), SJSA-1 (was established in 1982 from the primary tumour of a patient diagnosed with primitive multipotential sarcoma of the femur, there is amplification of the gene that encodes the p53-associated protein, MDM2, SJSA-1 cells also exhibit a 15-fold amplification of the gli proto-oncogene), 143B (13 years old Caucasian female, thymidine kinase negative) G-292 (young female osteosarcoma), CAL 72 (osteosarcoma of the knee of a 10-year-old boy) and the murine osteosarcoma cell lines POS-1 and MOS-J were purchased from the American Type Culture Collection and maintained in DMEM (Invitrogen-Life Technologies Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum and $2 \text{ mmol } l^{-1}$ L-glutamine. All cell lines were cultured in a humidified 5% CO2/air atmosphere at 37 °C. All cell lines were passaged for less than 3 months.

Patient tumour biopsy specimens were collected at Nantes University Hospital (Nantes, France). Samples were obtained following patient informed consent, and after ethical approval by the Nantes University Hospital Ethics Committee.

Therapeutic agents. Brd4 inhibitor, JQ1, was kindly provided by James Bradner (Dana-Farber Cancer Institute). This synthetic compound targets selectively the acetyl-lysine-binding pocket of the BET bromodomain proteins. For *in vitro* studies, JQ1 was dissolved in dimethyl sulphoxide at 10 mM stock solutions and stored at -20° C. For the *in vivo* studies, JQ1 was dissolved in dimethyl sulphoxide at 50 mg ml⁻¹ and then diluted in 10% hydroxypropyl beta cyclodextrin (HP- β -CD, Sigma-Aldrich) to get the final dose, 50 mg kg⁻¹ and stored at 4 °C. The 10% HP- β -CD is prepared in sterile water, which was filtered with 0.22 μ filter.

MYC expression vector and siRNA. Coding sequence for human *MYC* was cloned into the expression vector pCDNA3 (Life Technologies). Transfection was performed using Jet-PEI, according to the manufacturer's recommendations (Polyplus-Transfection, Illkirch, France).

For siRNA, cells were transfected with Interferin (Polyplus-Transfection) and annealed siRNA (20 nM); (si*MYC* (s9129 from Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and si*RUNX2* (HSS101403 from Life Tecnologies)), according to the manufacturer's recommendations.

Cell proliferation and apoptosis assays. Osteosarcoma cell lines were plated in DMEM with 5% FBS and treated with JQ1 at indicated concentration, and time and cell growth was measured using the crystal violet assay as described previously. Detection and quantitation of dead cells were done by flow cytometry (described below) and western blotting analysis. Each assay was repeated in triplicate.

Cell cycle analysis. Osteosarcoma cell lines were incubated in the absence or the presence of 1 μ M JQ1 for 72 h, trypsinized, washed twice and incubated in PBS containing 0.12% Triton X-100, 0.12 mM EDTA and 100 μ g ml⁻¹ ribonuclease A; 50 μ g ml⁻¹ propidium iodide was then added to each sample for 20 min at 4 °C. Cell cycle distribution was analysed by flow cytometry (Cytomics FC500; Beckman Coulter, Roissy, France) based on 2N and 4N DNA content. Each assay was done in triplicate.

Western blotting analysis. Samples containing equal amounts of protein (depending on the antibody, $5-50 \mu g$) from lysates of cultured osteosarcoma cell lines underwent electrophoresis on SDS–PAGE and were transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were blocked in 3%

BSA-PBS-0.1% Tween at room temperature for 1 h and blots were probed overnight at 4 °C with primary antibodies (MYC and RUNX2, 1:1,000; Cell Signaling Technologies, Beverly, CA) or actin (1:20,000; Sigma-Aldrich) to detect proteins of interests. After incubation, the membranes were washed three times with washing buffer (PBS containing 0.1% Tween) for 5 min. Membranes were then incubated for 1 h with 1:10,000 diluted secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) at room temperature. Specific proteins were detected using G-Box (Syngene, Cambridge, UK) after washing. Uncropped scans of the most important western blots are provided as Supplementary Figs 14–16.

Quantitative reverse transcription-PCR. Total RNA was extracted from cultured cells, human biopsies or xenografts using TRIreagent (Invitrogen-Life Technologies Inc.). Total RNA was reversed transcribed using the ThermoScript RT-PCR System (Life Technologies). Real-time monitoring of PCR amplification of complementary DNA was performed using DNA primers (primers sequences are available in Supplementary Table 1) on CFX96 real-time PCR detector system (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) with SYBR PCR Master Mix buffer (Bio-Rad). Target gene expression was normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase levels in respective samples as an internal standard, and the comparative cycle threshold method was used to calculated relative quantification of target messenger RNAs. Each assay was performed in triplicate.

qRT-PCR microRNA. A specific RT was performed for each miR from 100 ng of total RNA, using a specific stem-loop RT primer (50 nM) and the MultiScribe Reverse transcriptase (Applied Biosystems). The RT conditions were as follows: 30 min at 16 °C followed by 30 s at 20 °C, 30 s at 42 °C, 1 s at 50 °C for 60 cycles, and finally 5 min at 85 °C. Mature microRNAs' expression levels were measured by real-time qRT–PCR using the SYBR PCR Master Mix buffer (Bio-Rad) and an CFX96 real-time PCR detector system (Bio-Rad). The expression of each gene was normalized to the small nuclear U6B RNA or 5S ribosomal RNA as a reference. All experiments were performed in triplicate. Primers sequences are available in Supplementary Table 2.

Quantitative ChIP assay. A ChIP assay was performed by the Magnify ChIP system (Invitrogen-Life Technologies Inc.) using 5 μ g of BRD4 antibody (Bethyl Lab) or control rabbit IgG (R&D Systems). Real-time PCR (Bio-Rad) was performed on fragmented DNA using specific primers for the *MYC*, *RUNX2*, *NFATC1*, *MMP9* and *IL7R* loci. Primers were designed to amplify sites within each gene locus based on the H3K27 acetylation level, and a negative control region was designed outside the promoter region (primers sequences are available in Supplementary Table 3). The levels of enrichment of the H3K27Ac histone mark across the genome has been determined by a ChIP-seq assay on seven cell lines from ENCODE web resourses.

Luciferase assay. The cell line HEK293 overexpressing RANK was obtained by transducing cells with lentivirus containing the coding sequence of RANK and were then selected with antibiotic selection.

HEK293-RANK cells were seeded in 24-well plates and were transfected with the indicated firefly luciferase constructs (pNF-kB-Luc reporter, BD Biosciences, Clonetech) together with an SV40-renilla control vector. Lysates were prepared at 40 h, and luciferase activity was measured using the Dual Luciferase Reporter Assay system (Promega) and a luminometer (MicroLumat Plus; EG&G Berthold).

OC differentiation. OCs were generated from human CD14+ monocytes. Purified CD14+ cells were cultured in α -MEM with 10% FCS and 25 ng0060ml⁻¹ human macrophage colony stimulating factor (R&D Systems). After 4 days of culture, 100 ng ml⁻¹ hRANKL and 125 nM JQ1 were added. Multinucleated cells formed with three nuclei and more were counted after TRAP staining (Sigma, France)³⁹.

OB differentiation. Before passage 5, MSCs were seeded at 10⁴ cells per cm² in 96-well plates in DMEM supplemented with vitamin D3 (10⁻⁸ M; Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland), dexamethasone (10⁻⁸ M; Sigma) and with or without JQ1 as indicated (this represented day 0 for MSC osteogenic differentiation). Three days later, freshly prepared ascorbic acid (50 µg ml⁻¹; Sigma) and β -glycerophosphate (10 mM; Sigma) was added to allow mineralization, this medium being changed every 2–3 days. Alizarin red-S staining was used to detect the mineralized nodules formed *in vitro* as described previously⁴⁰. In brief, between day 19 and 21, cells were fixed in ice-cold 70% ethanol for 1 h and incubated with alizarin red-S (40 mM, pH 7.4; Sigma) for 10 min at room temperature. After extensive washing, images were captured using a stereo microscope (Stemi 2000-C; Zeiss, Oberkochen, Germany, http://www.zeiss.com), and mineralized surfaces were quantified using the Qwin software (Leica, Nussloch, Germany, http:// www.leica-microsystems.com).

Animal treatment. All procedures involving mice (their housing in the Experimental Therapeutic Unit at the Faculty of Medicine of Nantes (France) and care, the method by which they were anaesthetized and killed, and all experimental protocols) were conducted in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA.PdL.06). Mice were anaesthetized by inhalation of a combination of isoflurane/air (1.5%, $11\,\rm{min}^{-1}$) and buprenorphine (0.05 mg kg $^{-1}$; Temgésic, Schering-Plough). Tumour volume was measured three times weekly and tumour volume was calculated by using the formula: length \times width \times depth \times 0.5432. Data points were expressed as average tumour volume \pm s.e.m.

HOS osteolytic xenograft model was induced by an intramuscular injection of 2×10^6 human HOS cells next to the tibia of 5-week-old female athymic nude mice (Harlan Sprague–Dawley Inc.), leading to a rapidly growing tumour in soft tissue with secondary contiguous bone invasion. Once palpable tumours, mice were randomly assigned to vehicle or JQ1. When tumours reached 100 mm³, JQ1 (50 mg kg⁻¹; formulation in 10% HP- β -CD in sterile water) is IP injected twice a day, every day. Each experimental group consisted of eight mice.

To establish syngenic POS-1 tumour model, 5-week-old male C3H/He mice were anaesthetized before subcutaneous inoculation of POS-1 cell suspension (containing 2×10^6 cells) in the hind footpad of the mice. Under these conditions, mice develop a primary tumour at the site of injection in 3 weeks that can be transplanted to mice of the same strain as a small fragment ($2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$) in close contact with the tibia. For this purpose, the periostum of the diaphysis was opened and resected along a length of 5 mm, and the underlying bone was intact. The osteosarcoma fragment was placed contiguous to the exposed bone surface without the periostum, and the cutaneous and muscular wounds were sutured. Tumours appeared at the graft site ~ 8 days later associated with the development of pulmonary metastases in a 3-week period. The tumours that develop in contact to the femora lead to osteolytic lesions that reproduce the osteolytic form of human osteosarcoma⁴¹. When tumours reached 100 mm³, mice were randomly selected for treatment with vehicule or JQ1 (50 mg kg^{-1}). JQ1 was injected I.P twice a day, every day. Each experimental group consisted of six mice.

When tumour volume reached $\geq 10\%$ of body weight, mice were killed and tumours harvested for evaluation of protein expression by western blotting analyses and immunohistochemistry.

MicroCT analysis. MicroCT analysis has been previously described⁴². In brief, tibias were scanned using high-resolution microcomputed tomography (Skyscan 1076, Kontich, Belgium) at 50 kV and 200 μ A using a 0.5-mm aluminium filter and a detection pixel size of 9 μ m. Images were captured every 0.6° through 180° rotation, and analysed using Skyscan software. Trabecular structures positioned 0.2 mm below the growth plate were quantified over a length of 1 mm.

BV/TV, trabecular thickness, trabecular separation and Tb.N. were determined. The BV of ectopic bone was quantified over the total length of tibia bearing tumour.

Bone histomorphometric analysis and immunohistochemistry. Tibias were decalcified with 4.13% EDTA and 0.2% paraformaldehyde in PBS for 96 h using the KOS microwave histostation (Milestone, Kalamazoo, MI, http://www.milestone-med.com) before embedding in paraffin. Sections (3 μ m thick, Leica Microsystems) were analysed by TRAP staining as described previously^{43,44}. Immunostaining for Osterix was performed as described⁴³ with a rabbit anti-osterix antibody (1/25; Abcam, Cambridge, MA, http://www.abcam.com). Quantification of relative OC surface (TRAP + cells) and OB number (osterix + cells) in the metaphyseal spongiosa was evaluated by Qwin (Leica) and ImageJ (NIH, Bethesda, MD) softwares. Immunostaining for Ki67 was conducted using a primary antibody mouse anti-human Ki67 (1:100; Dako) on tumour section. All analyses were assessed by light microscopy using a DMRXA microscope (Leica). All comparisons of staining intensities were made at \times 200 magnifications.

Statistical analysis. For each experimental data point, the s.e.m. from replicate experiments was calculated as noted in the legends and is shown as error bars. All error bars show s.e.m. for at least triplicate measurement from representative experiments. The mean \pm s.e.m. was calculated for all groups and compared by two-tailed paired Student's *t*-test or by analysis of variance, with the Bonferroni multiple comparisons test for *post hoc* analysis. Unless otherwise stated, multiple comparisons were performed by analysis of variance. *P*<0.05 was used as the criteria for statistical significance.

For Figs 1b and 4b, the Pearson product-moment correlation coefficient (R^2) was calculated and a two-tailed *P*-value was generated from a probability table. Prism 3.0 software was used for all statistical analysis.

References

- 1. Clines, G. A. & Guise, T. A. Mechanisms and treatment for bone metastases. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **2**, 295–302 (2004).
- Mohseny, A. B. *et al.* Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *J. Pathol.* 219, 294–305 (2009).
- Rosen, G., Murphy, M. L., Huvos, A. G., Gutierrez, M. & Marcove, R. C. Chemotherapy, en bloc resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer* 37, 1–11 (1976).

ARTICLE

- Braun, S. et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. New Engl. J. Med. 353, 793–802 (2005).
- Kingsley, L. A., Fournier, P. G., Chirgwin, J. M. & Guise, T. A. Molecular biology of bone metastasis. *Mol. Cancer Ther.* 6, 2609–2617 (2007).
- Wittrant, Y. et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1704, 49–57 2004.
- 7. Dang, C. V. MYC on the path to cancer. Cell 149, 22-35 (2012).
- Bogenmann, E., Moghadam, H., DeClerck, Y. A. & Mock, A. c-myc amplification and expression in newly established human osteosarcoma cell lines. *Cancer Res.* 47, 3808–3814 (1987).
- Ikeda, S. et al. Amplification of both c-myc and c-raf-1 oncogenes in a human osteosarcoma. Jpn J. Cancer Res. 80, 6–9 (1989).
- Ueda, T., Healey, J. H., Huvos, A. G. & Ladanyi, M. Amplification of the MYC gene in osteosarcoma secondary to Paget's disease of bone. *Sarcoma* 1, 131–134 (1997).
- Shimizu, T. et al. c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. Oncogene 29, 5687–5699 (2010).
- Martin, J. W., Zielenska, M., Stein, G. S., van Wijnen, A. J. & Squire, J. A. The role of RUNX2 in osteosarcoma oncogenesis. *Sarcoma* 2011, 282745 (2011).
- van der Deen, M. *et al.* MicroRNA-34c inversely couples the biological functions of the runt-related transcription factor RUNX2 and the tumor suppressor p53 in osteosarcoma. *J. Biol. Chem.* 288, 21307–21319 (2013).
- Yang, J. et al. Correlation of WWOX, RUNX2 and VEGFA protein expression in human osteosarcoma. BMC Med. Genomics 6, 56 (2013).
- Lucero, C. M. *et al.* The cancer-related transcription factor Runx2 modulates cell proliferation in human osteosarcoma cell lines. *J. Cell. Physiol.* 228, 714–723 (2013).
- Blyth, K. *et al.* Runx2 and MYC collaborate in lymphoma development by suppressing apoptotic and growth arrest pathways *in vivo. Cancer Res.* 66, 2195–2201 (2006).
- Hewings, D. S. *et al.* Progress in the development and application of small molecule inhibitors of bromodomain-acetyl-lysine interactions. *J. Med. Chem.* 55, 9393–9413 (2012).
- Prinjha, R. K., Witherington, J. & Lee, K. Place your BETs: the therapeutic potential of bromodomains. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 146–153 (2012).
- 19. Zuber, J. et al. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* **478**, 524–528 (2011).
- Delmore, J. E. *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 146, 904–917 (2011).
- Mertz, J. A. et al. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. Proc. Natl Acad. Sci. USA 108, 16669–16674 (2011).
- Ott, C. J. et al. BET bromodomain inhibition targets both c-MYC and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. Blood 120, 2843–2852 (2012).
- Lockwood, W. W., Zejnullahu, K., Bradner, J. E. & Varmus, H. Sensitivity of human lung adenocarcinoma cell lines to targeted inhibition of BET epigenetic signaling proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 19408–19413 (2012).
- 24. Cheng, Z. et al. Inhibition of BET bromodomain targets genetically diverse glioblastoma. Clin. Cancer Res. 19, 1748–1759 (2013).
- Bandopadhayay, P. et al. BET-bromodomain inhibition of MYC-amplified medulloblastoma. Clin. Cancer Res. 20, 912–925 (2013).
- Filippakopoulos, P. et al. Selective inhibition of BET bromodomains. Nature 468, 1067–1073 (2010).
- 27. Kobayashi, E. *et al.* Reduced argininosuccinate synthetase is a predictive biomarker for the development of pulmonary metastasis in patients with osteosarcoma. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 535–544 (2010).
- Loven, J. et al. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. Cell 153, 320–334 (2013).
- Whyte, W. A. et al. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. Cell 153, 307–319 (2013).
- Belkina, A. C., Nikolajczyk, B. S. & Denis, G. V. BET protein function is required for inflammation: Brd2 genetic disruption and BET inhibitor JQ1 impair mouse macrophage inflammatory responses. *J. Immunol.* 190, 3670–3678 (2013).
- 31. Ory, B. et al. Zoledronic acid activates the DNA S-phase checkpoint and induces osteosarcoma cell death characterized by apoptosis-inducing factor

and endonuclease-G translocation independently of p53 and retinoblastoma status. *Mol. Pharmacol.* **71**, 333–343 (2007).

- Bekker, P. J. et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. J. Bone Miner. Res. 19, 1059–1066 (2004).
- Carey, M. The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* 92, 5–8 (1998).
 Giniger, E. & Ptashne, M. Cooperative DNA binding of the yeast
- transcriptional activator GAL4. Proc. Natl Acad. Sci. USA 85, 382–386 (1988).
 35. Griggs, D. W. & Johnston, M. Regulated expression of the GAL4 activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression. Proc. Natl Acad. Sci. USA 88, 8597–8601 (1991).
- Yarilina, A., Xu, K., Chen, J. & Ivashkiv, L. B. TNF activates calcium-nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 signaling pathways in human macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 1573–1578 (2011).
- Zou, Z. et al. Brd4 maintains constitutively active NF-kappaB in cancer cells by binding to acetylated RelA. Oncogene, doi:10.1038/onc.2013.179 (2013).
- Huang, B., Yang, X. D., Zhou, M. M., Ozato, K. & Chen, L. F. Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1375–1387 (2009).
- 39. Duplomb, L. et al. Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. Endocrinology 149, 3688–3697 (2008).
- 40. Chipoy, C. *et al.* Downregulation of osteoblast markers and induction of the glial fibrillary acidic protein by oncostatin M in osteosarcoma cells require PKCdelta and STAT3. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 1850–1861 (2004).
- 41. Lamoureux, F. *et al.* Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.* **67**, 7308–7318 (2007).
- Baud'huin, M. *et al.* A soluble bone morphogenetic protein type IA receptor increases bone mass and bone strength. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 12207–12212 (2012).
- Brounais, B. et al. Oncostatin M induces bone loss and sensitizes rat osteosarcoma to the antitumor effect of Midostaurin in vivo. Clin. Cancer Res. 14, 5400–5409 (2008).
- David, E. et al. Direct anti-cancer effect of oncostatin M on chondrosarcoma. Int. J. Cancer 128, 1822–1835 (2011).

Acknowledgements

This paper was written as a part of research project that received funding from the Seventh Framework Programme ([FP7/2007-2013]) under Grant agreement number 264817—BONE-NET. C.J. is funded by INSERM and Région Pays de la loire. F.La. is funded by INSERM and Fondation ARC. We thank Douangsone Vadysirisack for critical review of the manuscript.

Author contributions

F.La., M.Ba. and B.O. designed research aims, designed and performed experiments, analysed data and wrote the paper. L.R.C., C.J. and M.Be. performed experiments and analysed data. F.Le. and J.B. provided reagents/tissues. F.R., J.B. and D.H. contributed to manuscript preparation.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at http://www.nature.com/ naturecommunications

Competing financial interests: J.E.B. is the scientific founder of Tensha Therapeutics that has licensed drug like inhibitors of BET bromodomains from the Dana-Farber Cancer Institute for clinical translation as cancer therapeutics. The remaining authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/ reprintsandpermissions/

How to cite this article: Lamoureux, F. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomain epigenetic signalling interferes with the bone-associated tumour vicious cycle. *Nat. Commun.* 5:3511 doi: 10.1038/ncomms4511 (2014).

I.1.4. Complément de discussion à l'Article 1 :

Très peu de données concernant les protéines à Bromodomaines dans l'Ostéosarcome sont actuellement disponibles dans la littérature. Les seules études rapportées décrivent les modalités de dégradation du facteur suppresseur de tumeurs BRD7, suite à sa liaison avec le complexe APC/C (Anaphase-Promoting Complex/ Cyclosome)²¹³. Il a par ailleurs été démontré qu'une forte expression de BRD7 corrélait avec une meilleure survie des patients atteints d'Ostéosarcome et que l'utilisation conjointe du proTAME, un inhibiteur spécifique d'APC/C et du Cisplatine ou de l'Adriamycine, potentialisait les effets anti-tumoraux de ces composés. Corroborant ces analyses, il a également été démontré qu'en raison de son ciblage direct de BRD7, le miR-300 favorisait la prolifération et le pouvoir invasif des cellules d'Ostéosarcome de la lignée MG63, de même qu'il induisait l'expression de la N-Cadhérine et de la Vimentine, deux marqueurs également présents lors de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse²¹⁴. Alors que l'ensemble de ces données illustre les effets bénéfiques de BRD7 dans l'Ostéosarcome, le rôle des protéines à BET Bromodomaines demeurait encore inconnu dans ce modèle avant notre étude. L'utilisation de molécules inhibitrices de cette sous-famille de protéines, telle que nous l'avons réalisée dans notre travail, répondait donc à une démarche mécanistique fondamentale et permettait également d'ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'ensemble des résultats du travail présenté dans l'<u>Article 1</u> a ainsi pu montrer qu'en inhibant les protéines à BET Bromodomaines dans les trois types de cellules osseuses participant au cercle vicieux de l'**Ostéosarcome**, JQ1 était non seulement un frein aux processus de **différenciation ostéoblastique** et **ostéoclastique**, mais aussi à la **progression tumorale** de ce cancer. De plus, ce travail met en lumière le rôle crucial des protéines à BET Bromodomaines dans la transcription de *C-Myc*, *RUNX2* et *NFATC1*, trois gènes pivots dans l'exécution des programmes génétiques caractérisant ces sous-types cellulaires.

Par ailleurs, même si nous avons pu mettre en évidence que **C-Myc** et **RUNX2** étaient des gènes-cibles de JQ1 dans l'Ostéosarcome, il apparaît évident qu'ils ne soient pas les seuls impliqués dans les effets antinéoplasiques de cette molécule. Le fait que la surexpression de C-Myc, suivie d'un traitement par JQ1 ne permette pas d'abroger complètement ses effets antiprolifératifs soutient d'ailleurs cette assertion (**Fig. 3g**). Les travaux de Baker et al., la confirment également, ce groupe ayant démontré un effet anti-tumoral de JQ1, **indépendant** de l'inhibition de **C-Myc** dans l'Ostéosarcome, mais reposant sur l'inhibition de l'expression de BRD4 du *locus* de ce gène²¹⁵.

Malgré les effets encourageants de JQ1 dans les lignées d'Ostéosarcome testées, cette pathologie n'en reste pas moins très hétérogène. Ceci est notamment illustré dans notre étude par l'évidente moindre sensibilité de la lignée G292 (IC₅₀ de 9,772 μ M), comparativement aux autres lignées (**Fig. 2b**), suggérant qu'une potentialisation des effets de JQ1 puisse être envisagée, en l'associant avec d'autres traitements de chimiothérapie par exemple. La combinaison de plusieurs molécules de chimiothérapie est en effet une

stratégie clinique couramment employée, puisqu'elle permet un ciblage de voies de signalisation cellulaires complémentaires. Cette stratégie peut ainsi permettre de pallier aux mécanismes de chimiorésistance, dont quelques unes des modalités seront développées plus loin dans ce manuscrit (<u>Article 6 et PARTIE III</u>). Dans cette optique, une étude récente a d'ailleurs démontré les effets synergiques de JQ1 et de la **Rapamycine**, un inhibiteur de la voie **mTOR** (**mammalian Target Of Rapamycin**), sur la croissance et la survie des cellules d'Ostéosarcome, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*²¹⁶. Une autre étude a également rapporté que la sensibilité des cellules d'Ostéosarcome à la **Doxorubicine** était augmentée en présence de JQ1, ce dernier présentant aussi des **effets synergiques** avec le **Flavopiridol** et la **Dinaciclib**, des **inhibiteurs de CDK9 (Cyclin Dependent Kinase 9**)²¹⁵.

Les effets de JQ1 ont par ailleurs été appréhendés dans un modèle de **parodontite**, une pathologie osseuse dentaire, dans laquelle ses effets inhibiteurs de la différenciation ostéoclastique et de la dégradation osseuse ont également été rapportés²¹⁷. De plus, corroborant nos résultats dans l'Ostéosarcome, ce groupe a pu montrer que JQ1 déplaçait BRD4 des régions promotrices de **NFATC-1** mais aussi de celles de **C-Fos** dans ce modèle. Les résultats de l'ensemble de ces travaux nous amènent donc à nous questionner sur le bénéfice potentiel de JQ1 dans un second modèle de Sarcome Osseux : le **Sarcome d'Ewing**.

I.2. PROTEINES A BET BROMODOMAINES ET SARCOME D'EWING :

I.2. Protéines à BET Bromodomaines et Sarcome d'Ewing :

<u>Article 2 : « Le ciblage des lecteurs épigénétiques inhibe l'expression du facteur de transcription oncogénique EWS-Fli1 dans le Sarcome d'Ewing » :</u>

Oncotarget. 2016 Mar 19.

Jacques C, Lamoureux F, Baud'huin M, Calleja LR, Quillard T, Amiaud J, Tirode F, Rédini F, Bradner JE, Heymann D, Ory B.

I.2.1. Introduction à l'Article 2 :

Les résultats de l'étude précédente et les récentes données de la littérature soulèvent l'hypothèse que les protéines à BET Bromodomaines soient impliquées dans la transcription de gènes dont l'expression est déterminante selon le contexte cellulaire. Par ailleurs, il est clairement admis que les **promoteurs forts** ou les régions dites « **super-enhancer** », caractérisées par leurs fortes densités en histones H3K27ac et en BRD4, contrôlent souvent l'expression d'**oncogènes**²¹⁸. De plus, il a été démontré que la transcription des gènes en aval de ces régions était particulièrement sensible à une inhibition des protéines à BET Bromodomaines²¹⁸. Ainsi, du fait de la **caractérisation** du **Sarcome d'Ewing** sur le plan moléculaire, par l'expression de l'oncogène chimérique **EWS-Fli1** et au regard de la dépendance de ce cancer vis-à-vis de son expression, l'appréhension des effets de JQ1 dans ce type de Sarcome Osseux semble tout à fait légitime.

Par ailleurs, l'étude précédente a démontré que l'inhibition des protéines à BET Bromodomaines entravait le **cercle vicieux** établi entre les cellules tumorales d'Ostéosarcome et celles de leur microenvironnement. Ce dernier initiant et entretenant le développement tumoral des cellules de Sarcomes Osseux, JQ1 pourrait donc ainsi également s'opposer à la progression du Sarcome d'Ewing et constituer une nouvelle **approche thérapeutique** originale dans ce contexte.

Ainsi, l'étude de l'inhibition des protéines à BET Bromodomaines dans le Sarcome d'Ewing s'inscrit dans une **démarche de Recherche Fondamentale**, en permettant de mieux comprendre le rôle de ces protéines dans la carcinogénèse de ce type de cancer. Par ailleurs, les **perspectives cliniques** suggérées par ce travail pourront peut être permettre de considérer ces protéines comme de nouvelles **cibles thérapeutiques** dans cette pathologie.

Le **Sarcome d'Ewing** est le second type de tumeur osseuse primitive maligne le plus fréquent après l'Ostéosarcome et compte parmi les tumeurs osseuses les plus agressives. Avec une incidence annuelle de deux à trois nouveaux cas par million d'enfants de moins de 15 ans en France, il affecte surtout les **adolescents** et se caractérise par une formation d'os tumoral ectopique, principalement au niveau des diaphyses des os longs. La translocation **t(11;22)(q24;q12)** entre les gènes *EWSR1* et *Fli1* constitue la signature moléculaire de cette

pathologie, le facteur de transcription chimérique en résultant, **EWS-Fli1**, étant impliqué dans sa progression.

Les traitements actuels améliorent sensiblement l'évolution de ce cancer mais les résistances thérapeutiques et l'apparition de métastases réduisent encore les taux de survie. Malgré les efforts d'optimisation des protocoles, il est important de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Dans cette démarche, trouver un moyen de **cibler directement** l'oncogène EWS-Fli1 en **empêchant sa transcription**, demeurerait une stratégie de choix pour éradiquer ce cancer. Par ailleurs, compte tenu des effets **anti-tumoraux** de JQ1 précédemment démontrés dans ce manuscrit dans le cadre de l'Ostéosarcome (<u>Article 1</u>), cet inhibiteur de protéines à BET Bromodomaines pourrait également s'avérer prometteur dans le Sarcome d'Ewing.

Cette étude a ainsi pu démontrer l'implication de BRD4 dans la régulation de l'expression d'*EWS-Fli1*, l'oncogène principal du Sarcome d'Ewing (**Fig. 3a à 3h**), ainsi que de certains effecteurs de son programme transcriptionnel comme *Gli1*, *NROB1*, *FOXM1*, *CCND1*, *VEGFA* ou encore *p21* (**Fig. 4a à 4f et Supp Fig. 4a à 4f**). Nos expériences de ChIP ont ainsi pu mettre en évidence la fixation directe de BRD4 au niveau des histones H3K27ac présentes au niveau du **promoteur** d'*EWS-Fli1* (**Fig. 3e**). L'inhibition des protéines à BET Bromodomaines par JQ1 empêchant la fixation de BRD4 sur ce site, nous avons pu démontrer que l'expression d'EWS-Fli1 et de certains de ses gènes-cibles diminuait en conséquence, tant au niveau transcriptionnel que protéique. Par ailleurs, en réduisant la **phosphorylation de ERK 1/2** (**Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2**), JQ1 impacte aussi la voie des **MAPKs** (**Mitogen-Activated Protein Kinases**), une des voies de signalisation activées par **EWS-Fli1**, justement connue pour contribuer à la carcinogénèse du Sarcome d'Ewing (**Fig. 4g et 4h et Supp Fig. 4g et 4h**).

Fonctionnellement, l'inhibition des protéines à BET Bromodomaines réduit non seulement la **prolifération**, mais aussi les **capacités clonogéniques** et **migratoires** des cellules de Sarcome d'Ewing *in vitro*, de même qu'elle induit un **blocage du cycle cellulaire** en phase **G1 (Fig. 1d, 2a, 2b, 2c à 4f et Supp Fig. 2a, 2b et 2c**). Au niveau protéique, ce blocage est associé à une diminution du niveau d'expression des **cyclines D1** et **E1**, ainsi qu'à une réduction du niveau de **phosphorylation** de **Rb** (*Retinoblastoma*) (**Fig. 2d et Supp Fig. 2d**). JQ1 induit également une augmentation de la **mort cellulaire** par apoptose dans ce modèle, celle-ci dépendant non seulement de la **dose** de JQ1 employée, mais aussi du **temps** de traitement par cet agent. Nous avons également pu mettre en évidence que cette induction d'apoptose était caractérisée par une **activité des caspases-3/7** ainsi qu'un **clivage des PARPs** accrus (**Fig. 2e à 2h et Supp Fig. 2e à 2h**).

In vivo, l'inhibition des protéines à BET Bromodomaines **ralentit la croissance tumorale** et **améliore la survie globale** des animaux de notre modèle murin de xénogreffe de Sarcome d'Ewing (Fig. 5b et 5c). Ce modèle très agressif est généré par injection paratibiale de cellules de la lignée humaine TC71 et récapitule les caractéristiques cliniques de la pathologie humaine. Des analyses par immunohistochimie ont permis de montrer qu'au sein des tumeurs, JQ1 induisait une augmentation de la mort cellulaire par apoptose et qu'il diminuait la prolifération cellulaire (Fig. 5e et 5f). De plus, ce composé diminue la vascularisation globale des tumeurs ainsi que la taille des vaisseaux sanguins qui les irriguent (Fig. 5g). Enfin, l'expression d'*EWS-Fli1* et celle de certains de ses gènes-cibles est également diminuée dans les tumeurs, corroborant les résultats préalablement obtenus *in vitro* (Fig. 5d).

L'ensemble de ces résultats suggère ainsi que, de part la **réduction** de l'expression **d'EWS-Fli1** qu'elles induisent, les molécules inhibitrices de protéines à BET Bromodomaines telles que JQ1 pourraient constituer un traitement de chimiothérapie innovant, contribuant ainsi à améliorer la prise en charge thérapeutique et la guérison des enfants atteints de Sarcome d'Ewing.

I.2.2. Article 2 : « Targeting the epigenetic readers in Ewing Sarcoma inhibits the oncogenic transcription factor EWS-Fli1 » *Oncotarget. 2016 Mar 19.*

Jacques C, Lamoureux F, Baud'huin M, Calleja LR, Quillard T, Amiaud J, Tirode F, Rédini F, Bradner JE, Heymann D, Ory B.

Targeting the epigenetic readers in Ewing Sarcoma inhibits the oncogenic transcription factor EWS/Fli1

Camille Jacques^{1,2}, François Lamoureux^{1,2}, Marc Baud'huin^{1,2,3}, Lidia Rodriguez Calleja^{1,2}, Thibaut Quillard^{1,2}, Jérôme Amiaud^{1,2}, Franck Tirode⁴, Françoise Rédini^{1,2}, James E. Bradner^{5,6}, Dominique Heymann^{1,2,3}, Benjamin Ory^{1,2}

¹INSERM, UMR 957, Équipe Labellisée Ligue 2012, Nantes, France

²Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, EA3822, Nantes, France

³Nantes University Hospital, Nantes, France

⁴Institut Curie, INSERM U830, Paris, France

⁵Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

⁶Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Correspondence to: Benjamin Ory, e-mail: Benjamin.ory@univ-nantes.fr

Keywords: Ewing Sarcoma, JQ1, bromodomain, epigenetic, EWS/Fli1

Received: December 17, 2015 Accepted: March 02, 2016 Published: March 19, 2016

ABSTRACT

Ewing Sarcoma is a rare bone and soft tissue malignancy affecting children and young adults. Chromosomal translocations in this cancer produce fusion oncogenes as characteristic molecular signatures of the disease. The most common case is the translocation t (11; 22) (q24;q12) which yields the EWS-Fli1 chimeric transcription factor. Finding a way to directly target EWS-Fli1 remains a central therapeutic approach to eradicate this aggressive cancer. Here we demonstrate that treating Ewing Sarcoma cells with JQ1(+), a BET bromodomain inhibitor, represses directly EWS-Fli1 transcription as well as its transcriptional program. Moreover, the Chromatin Immuno Precipitation experiments demonstrate for the first time that these results are a consequence of the depletion of BRD4, one of the BET bromodomains protein from the EWS-Fli1 promoter. In vitro, JQ1(+) treatment reduces the cell viability, impairs the cell clonogenic and the migratory abilities, and induces a G1-phase blockage as well as a time- and a dose-dependent apoptosis. Furthermore, in our in vivo model, we observed a tumor burden delay, an inhibition of the global vascularization and an increase of the mice overall survival. Taken together, our data indicate that inhibiting the BET bromodomains interferes with EWS-FLi1 transcription and could be a promising strategy in the Ewing tumors context.

INTRODUCTION

Ewing Sarcoma is the second most common bone cancer after Osteosarcoma. It is nonetheless an infrequent tumor, mostly affecting children and young adults, with a peak of incidence around 15 years [1]. Described for the first time in 1921 by James Ewing [2], it mainly arises at the pelvic bones, the diaphysis of the lower extremities' long bones and the chest wall's bones. The standard of care for young patients suffering from Ewing Sarcoma is based on a multimodal therapy including surgical resection associated with local radiotherapy and chemotherapy combination [1, 3–5]. This strategy has markedly improved the patient outcome worldwide, since the 5-year survival rates after treatment are currently around 60–70% for the localized forms. Nonetheless, these rates dramatically fall around 20–40% in metastatic diseases, depending on the metastatic sites and burden [6]. The unsatisfactory prognosis of such patients and the fact that the toxicity thresholds have already been achieved underscore the necessity to find novel therapeutic strategy.

Since 1992, this cancer is well characterized by the reciprocal translocation t (11;22) (q24;q12), found in 85% of these tumors. This translocation leads to the gene

fusion between the 5' segment of the EWSR1 gene (Ewing sarcoma breakpoint region 1) on the chromosome 22 and the 3' portion of Fli1 (Friend leukemia virus integration site 1), located on the chromosome 11 [7]. It gives birth to the chimeric protein EWS-Fli1, which behaves as an aberrant transcription factor at the origin of the tumorigenic potential of Ewing Sarcoma cells [8]. EWS-Fli1 indeed acts as a pivotal transcriptional modulator, upregulating target genes such as c-myc [9–11], ID2 [11], Cyclin D1 (CCND1) [11, 12], Gli1 [13], MMP-3 [14], VEGFA [15, 16], NR0B1 [17, 18], FOXM1 [19] or EZH2 [20], implicated in cell cycle, invasion and proliferation pathways. EWS-Fli1 has also a transcriptional repressor role [21], as it is able to directly inhibit the expression of some tumor suppressor genes such as p21 [22], p57kip [10], TGF-βRII [11, 21, 23] and IGFBP3 [24], often associated with development, differentiation and cell communication. As Ewing Sarcoma development seems to depend on one specific oncogene, targeting its transcription appears as an attractive strategy. Moreover, RNA interference studies already demonstrated the relevance of this therapeutic strategy [25, 26]. Very little is known about the upstream epigenetic regulation of EWS-Fli1. A better understanding of this fusion-oncogene transcriptional regulation could represent an innovative road to improve patient's clinical outcome.

Over the past years, the bromodomain and extraterminal domain (BET) proteins have emerged as an important class of epigenetic readers. This protein subfamily encompasses BRD2, BRD3, BRD4 and BRDT and displays gene transcription modulation features by its ability to recognize and bind to the N-acetylatedlysine residues on histone tails [27]. BET bromodomains consequently induce an opened-chromatin structure and act as scaffold proteins to recruit transcriptional complexes and RNA polymerases [28]. The BET proteins are widely associated with cancer progression, as it was demonstrated that BRD4 has the ability to associate with positive transcription elongation factor b (P-TEF-b) to promote the G1-S transition of the cell cycle [29]. In addition, the wellknown *c-myc* oncogene, which is overexpressed in various cancers, is directly activated by BRD4 [30, 31]. Therefore, several studies report the benefits of targeting the BET bromodomains in cancer [32-34]. In Osteosarcoma, BET bromodomain inhibition impairs RUNX2 expression [31], a pivotal osteoblastic- and tumorigenic-related gene [35, 36]. From this perspective, the small cellpermeable thieno-triazolo-1, 4-diazepine, JQ1, which is a potent BET inhibitor, has recently been shown to exhibit anti-cancer effects in various cancer models such as NMC (NUT midline carcinoma) [37], hematopoietic malignancies [38] lung cancer [39], prostate cancer [40] and Osteosarcoma [31]. Moreover, strong promoters and super-enhancer regulatory regions are frequently found to control oncogenes expression [41, 42]. Thus, JQ1 was shown to reduce the transcription of such genes, whose expression is more sensitive to the BET bromodomains presence [41]. Regarding the crucial role of EWS-Fli1 in Ewing Sarcoma, we hypothesize that its expression may be controlled by such super-enhancers and consequently activated by the BET bromodomain activity.

In this study, we explore the role of BET bromodomains in the carcinogenesis of Ewing Sarcoma in order to evaluate the therapeutic potential of inhibiting its epigenetic reading activity both in vitro and in vivo. We further uncover that through targeting EWS-Fli1, the BET bromodomain inhibitor JQ1 consequently modulates the expression level of the downstream EWS-Fli1 network genes in Ewing sarcoma cell lines and in in vivo tumor models. The JQ1-mediated transcriptional silencing of EWS-Fli1 corresponds with the release of BRD4 from its loci, which further supports the direct transcriptional activation of this gene by BRD4. Taken together and considering the EWS-Fli1 oncogene addiction of the Ewing Sarcoma cells, our findings indicate that targeting the BET bromodomain signaling pathway in Ewing tumor can effectively disrupt the progression of this cancer through transcriptional repression of its main oncogenic driver [43]. In particular, these results provide a novel glimpse at the importance of epigenetic mechanisms in cancer biology as well as a strong clinical rationale for the use of BET bromodomain inhibitors such as JQ1, as a potent therapeutic approach for Ewing Sarcoma.

RESULTS

Ewing Sarcoma cell lines are sensitive to BET proteins inhibition therapy

To directly assess the relevance of targeting BET bromodomain proteins signaling in Ewing Sarcoma disease, we first evaluated the messenger RNA expression level of BRD2, BRD3 and BRD4 in ten human Ewing Sarcoma cell lines. All the cell lines tested expressed BRD2, BRD3 and BRD4 at least two times more than normal mesenchymal stem cells (MSCs), except the SK-N-MC cells, potentially because of their neuroblastoma origin (Figure 1A). These first data suggest that the majority of the Ewing Sarcoma cells express the required molecular targets for an efficient BET proteins' inhibition therapeutic strategy. Since the aim of this work is to elucidate the potential implication of the BET bromodomains proteins on the Ewing Sarcoma's carcinogenesis through their possible regulatory role in EWS-Fli1 expression, the EWS-Fli1 mRNA expression level was also assessed (Figure 1B). This screening validated the presence of the fusion oncogene in all the cell lines tested.

To evaluate the therapeutic potential of BET bromodomain inhibition in Ewing Sarcoma, we used the JQ1(+) active form of the soluble pharmacological inhibitor JQ1, a thienotriazolo-1, 4-diazepine that binds selectively to the acetyl-lysine-binding pocket of the BET bromodomain protein (Figure 1C) [44]. The so-called JQ1(-), the JQ1 inactive enantiomer does not harbor such acetyl-lysine-binding pocket selectivity, and will be further used as a negative control. A panel of eleven genetically defined human Ewing Sarcoma cell lines was treated with the BET inhibitor JQ1(+) to assess its effect on cell viability (Figure 1D). A dose-dependent inhibition of cell viability was observed in all the cell lines studied although with significant variability. The TC32, SKES-1, EW7 and RDES cells are the more sensitive ones as they exhibited a $\text{GI}_{\scriptscriptstyle 50}$ between 0.109 and 0.564 $\mu\text{M}.$ With GI₅₀ between 1.28 and 2.264 µM, the IOR/BRZ, TC71, ASP14, A673-1c, EW24 and SK-N-MC cells display an intermediate sensitivity. In contrast, the A673 cell line is about 5 times less sensitive compared to the first ones, with a GI_{50} of 4.911 μ M (Figure 1D). The JQ1(–) inactive enantiomer does not show any effect on the cell viability (Supplementary Figure S1), confirming the specificity of JQ1(+) towards the BET bromodomains. Following investigations were performed with the A673 and TC71 cell lines because of their differences in terms of BET bromodomains levels and JQ1(+) sensitivities reflecting the heterogeneity of our Ewing Sarcoma cell lines. Moreover, those two cell lines can be used for mouse in vivo model and represent two different classical anatomical Ewing sarcoma locations. The A673 cells come from a female donor of 15 years old presenting a tumor localized on muscle whereas the TC71 cells come from a 22 years old male patient, displaying a recurrent humerus sarcoma.

JQ1 inhibits the clonogenicity, the migratory potential and induces both a G1-phase cell cycle arrest and the apoptosis of human Ewing Sarcoma cell lines

In order to evaluate the functional effects of the BET proteins inhibition in vitro, we performed a colony formation assay in presence of DMSO alone, JQ1(+) or JQ1(-). A 2-days treatment with 4 μ M of JQ1(+) significantly reduces the clonogenic abilities by 48% in TC71 (Figure 2A) and 45% in A673 cells (Supplementary Figure S2A) compared to the same amount of DMSO alone or the same concentration of JQ1(–). Boyden Chambers assays also reveals that inhibiting the BET proteins significantly reduces the migratory potential of these cell lines (Figure 2B and Supplementary Figure S2B). To complete this functional study, we performed a cell cycle analysis through the propidium iodide staining method after a 2-days JQ1 treatment. A 1 µM JQ1(+) treatment blocks the proliferation of the TC71 cells, through a marked G1 arrest (Figure 2C), whereas this blockage was less important in the A673 ones, a significant G2 phase could be observed (Supplementary Figure S2C). Neither the DMSO alone, nor JQ1(-) have any effect on the cell cycle repartition. The differences obtained between the two cell lines could probably be due to the cell-relative sensitivity to JQ1(+), the A673 displaying a higher GI_{so} than the TC71. In order to better characterize the G1 arrest highlighted, Western blot analysis of the cellcycle-related proteins was assessed (Figure 2D). The timecourse experiment performed during 3, 6, 24 or 30 hours with 4 μ M of JQ1(+) shows that the phosphorylated form of the Rb protein (P-Rb), not inhibiting E2F, is shortly activated after 3 and 6 hours of JQ1(+) treatment and then reduced after 24 hours in the TC71, whereas the total Rb protein expression level remains stable for TC71. The same results were obtained in the A673 cells after 30 hours of JQ1(+) treatment (Supplementary Figure S2D). This dephosphorylation of Rb is explained by the proteins levels of both the Cyclin E1 (CCNE1) and the Cyclin D1 (CCND1) that decrease at 30 hours of JQ1(+) treatment, principally in the A673 cells (Figure 2D and Supplementary Figure S2D). A decrease in P-RB and the expression of these cell-cycle-related proteins was also demonstrated in a dose-response experiment in both cell lines with first effects observable with as little as 0.4 µM (Figure 2D and Supplementary Figure S2D).

Reduction of the cell viability and cell cycle arrest are well-known dying-cell features. Thus we finally wondered if the BET bromodomain inhibition mediated by JQ1(+) could result in a cell death induction. To assess the caspases-dependent cell death induced by JQ1(+), both the caspase 3/7 activity and the level of cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) were evaluated after a JQ1 treatment. Consistent with the results of the cell death manual counting and the study from Hensel et al., the caspase 3/7 activity and the PARP cleavage reveal a timedependent induction of apoptosis in the cell lines tested (Figure 2E, 2F and Supplementary Figure S2E, S2F) [45]. In addition, the same methods also confirm that JQ1(+)induces a dose-dependent apoptosis both in the TC71and the A673 cell lines (Figure 2G, 2H and Supplementary Figure S2G, 2H). On the contrary, neither time- nor dosedependent apoptosis is induced by a JQ1(-) treatment (Figure 2E, 2G, 2H and Supplementary Figure S2E, S2G, S2H, S2K). The BET bromodomains inhibition-induced apoptosis was thus confirmed both in A673 and in TC71 to be caspase-3/7-dependent. Finally, confirmation of cell death induction was obtained when TC71 and A673 cells were treated with 4 μ M JQ1(+) or JQ1(-) during 3, 6, 24, 30 or 48 hours and a time-dependent induction of cell death could be observed when the number of dead cells was evaluated by manual counting after Trypan blue exclusion (Supplementary Figure S2I, S2J).

Direct transcriptional regulation of EWS-Fli1 by BET proteins

EWS-Fli1 expression is considered as the molecular signature of the Ewing Sarcoma cells and it is now well established that inhibiting this chimeric factor source

of oncogene addiction impacts the aggressiveness and the cancerous features of these cells [46]. In order to determine if EWS-Fli1 could be the mediator at the origin of the functional effect of JQ1, we accordingly examined its expression after treatment. In all the Ewing Sarcoma cell lines tested, JQ1(+) treatment decreased the EWS-Fli1 mRNA expression in a dose-dependent manner (Figure 3A). Indeed, after twenty-four hours of 10 μ M JQ1(+), the mRNA expression was decreased by 57.1% in the A673 cell line and by 39.9% with 4 μ M JQ1(+) in the TC71 cell line. The different JQ1(+) treatment concentrations were picked according to the respective cell lines GI₅₀ (Figure 1D). The EWS-Fli1 protein expression level was also assessed by Western blotting in these cell lines (Figure 3B) and confirms the RT-qPCR results. Moreover, as illustrated by the relative quantification of the blots, a 0.4 µM JQ1(+) treatment during twenty-four hours reduces by 56.4% the TC71-EWS-Fli1 protein expression whereas a 4 µM JQ1(+) concentration is necessary to obtain the same effect in the A673 cells (Supplementary Figure S3). These results finally support the fact that the TC71 cell line is more sensitive than the A673 to JQ1(+) treatment and corroborate the recently published ones from Hensel et al., performed in the same cell lines [45]. In addition, we have also shown that the BET bromodomains inhibition not only induces a dose-dependent inhibition, but also a time-dependent inhibition of EWS-Fli1 expression. Interestingly, a quick transcriptional inhibition of EWS-Fli1 expression after only one hour of 4 μ M JQ1(+) treatment in the A673 and 5 hours in TC71 cells compared to the DMSO treated-cells is observed (Figure 3C). The time-dependent EWS-Fli1 expression impairment is also confirmed at a protein level, for both cell lines (Figure 3D). The rapid transcriptional effect of the BET inhibitor on EWS-Fli1 gene expression suggests the possibility that BET proteins may exert direct activation of the EWSR1 locus. To determine whether BET proteins bind directly to the EWS-Fli1 locus, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies by using an antibody targeting BRD4 in A673 cells. We detected specific enrichment of BRD4 within the EWSR1 promoter region at several locations including both upstream and downstream sites relative to the transcriptional start site of the *EWSR1* gene (Figure 3E). Furthermore, treatment of these cells with JQ1(+) induces the release of BRD4 from the promoter-binding sites. The increased enrichment for histone 3 lysine 27 acetylation (H3K27Ac) at the EWSR1 promoter region indicates active transcription, perhaps



Figure 1: Ewing Sarcoma cell lines overexpress BRD2, BRD3, BRD4 and EWS-Fli1 at mRNAs level and are sensitive to BET proteins inhibition. (A) Expression of BRD2, BRD3, BRD4 and (B) EWS-Fli1 at mRNA levels was evaluated by qRT–PCR in human Ewing Sarcoma cell lines compared with human mesenchymal stem cells (MSCs). GAPDH and B2M are used as housekeeping genes. Error bars show standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. (C) Chemical structure of the two JQ1 enantiomers. (D) Human Ewing Sarcoma cell lines (A673, A673-1c, ASP14, EW7, EW24, IOR/BRZ, RDES, SKES-1, SK-N-MC, TC32 and TC71) were cultured for 48 hours in the presence of JQ1(+) at the indicated concentrations and cell growth was determined by WST-1 assay and compared with control (left panel). GI₅₀ for JQ1(+) in tumor cell lines (right panel). These experiments were repeated at least twice. Error bars show standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments.



Figure 2: JQ1 inhibits the clonogenicity, the migratory potential and induces both a G1-phase cell cycle arrest and the apoptosis of human Ewing Sarcoma cell lines. (A) The TC71 Ewing Sarcoma cell line was plated at clonal density for colony numeration and treated with 4 µM JQ1(+) for 48 hours. Colony number was counted thanks to crystal violet staining performed after a 6-days incubation time and pictures of representative wells were taken. These experiments were repeated at least twice. Error bars shows standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. A two-tailed paired Student's t-test was used to compare the different conditions in the clonogenic assays. (B) The TC71 cells were cultured or not in presence of 4 μ M JQ1(+) during 24 hours and were then plated in Boyden Chambers, always in presence of JQ1(+) for additional 48 hours. Error bars show the standard deviation for n = 8 measurements from representative experiments and a two-tailed paired Student's *t*-test was used to compare the different conditions. (C) The TC71 Ewing Sarcoma cell line was treated with 1 µM JQ1(+) for 48 hours and the proportion of cells in G1, S, and G2 phase was determined by propidium iodide staining. (D) The TC71 Ewing Sarcoma cell line was treated with 4 µM JQ1(+) for 3, 6, 24 or 30 hours and the cell cycle-related proteins Rb, phosphorylated-Rb, CCNE1 and CCND1 expression levels were evaluated by Western blotting (left panel). The expression of the same proteins was assessed after treating or not the cells with JQ1(+) at 0.4, 4 or 8 μ M during twenty-four hours (right panel). (E) TC71 cells were treated with 4 μ M of JQ1(+) or JQ1(-) for 3, 6, 24, 30 or 48 hours, and the apoptosis was evaluated by dosage of the caspase 3/7 activities. (F) The TC71 cell line was treated with 4 μ M JQ1(+) for 6, 16, 24 or 48 hours and apoptosis was evaluated by cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) level by Western blotting. (G) The apoptosis was evaluated by dosage of the caspase 3/7 activity in the TC71 Ewing Sarcoma cell line after JQ1(+) or JQ1(-) treatment at 1 or 10 µM during 24 hours. (H) The same cell line was treated with 0.4, 4 or 8 µM JQ1(+) or JQ1(-) for 24 hours and apoptosis was evaluated by cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) level by Western blotting. For all the Western blotting experiments, the Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as a loading control. These experiments were repeated at least twice. For the caspase 3/7 activity assays, error bars shows standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. A two-tailed paired Student's t-test was used to compare the different conditions in these assays. For all the apoptosis assessment assays, a 6 hours Staurosporine (STS) treatment at 1 µM is used as a positive control.

associated with super-enhancer region as recently described [41, 47]. Thus, these findings demonstrate that BRD4 is present on the *EWSR1* promoter region and that JQ1(+) is able to deplete BRD4 from the promoter, thus inhibiting EWS-Fli1 transcription in Ewing Sarcoma cell lines.

In order to demonstrate that EWS-Fli1 is the key mediator of the JQ1(+) functional effects observed in Ewing Sarcoma cells, we performed experiments using the doxycycline-inducible shEWS-Fli1 ASP14 cell line. We first confirmed the clonogenic-promoting effect of EWS-Fli1 in our model, highlighting the fact that suppressing EWS-Fli1 expression mimics the BET bromodomains inhibition effects on the Ewing Sarcoma cells clonogenic capabilities (Figure 3F, 3G). In order to check the crucial implication of EWS-Fli1 in the JQ1(+) response, we then assessed the cellular viability of the same cells after a JQ1(+) treatment, expressing or not EWS-Fli1 (Figure 3H). Our results show that underexpressing EWS-Fli1 significantly reduces the sensitivity to a forty-eight hours JQ1(+) treatment at 6.5 µM. Taken together, those data emphasise and support the BET bromodomains implication in the EWS-Fli1 expression activation and supports the fact that JQ1 has an EWS-Fli1-dependent activity in our model.

Inhibition of the BET proteins modulates the expression of EWS-Fli1 transcriptional-targets in a dose- and time-dependent manner

To confirm the downstream functional impact of the EWS-Fli1 transcriptional inhibition mediated by JQ1(+), the expression of some majors EWS-Fli1 target genes was evaluated. Thus it is now well established that Gli1 [13, 48], NR0B1 [18] and p21 [22] are bona-fide direct-EWS-Fli1 transcriptional targets, whereas the expression of both FOXM1 [19] and VEGFA [15] is reported to be indirectly under EWS-Fli1's control, as no direct EWS-Fli1 binding at their promoters was currently brought to light. In agreement with what we observed for EWS-Fli1 expression (Figure 3A), a twenty-four hours treatment with JQ1(+)inhibits Gli1 and NR0B1 mRNA expression in the two cell lines tested (Figure 4A and Supplementary Figure S4A). Furthermore, p21, whose expression is normally inhibited by EWS-Fli1, is increased by about 2-fold in these conditions (Figure 4A and Supplementary Figure S4A). In addition, the expression of two of the EWS-Fli1's indirect targetgenes FOXM1 and VEGFA was also reduced consequently to a JQ1(+) treatment (Figure 4B and Supplementary Figure S4B). The same dose-dependent modulation of the EWS-Fli1-targets was confirmed at the protein level (Figure 4C and Supplementary Figure S4C). Furthermore, a time-course treatment with 4 μ M JQ1(+) during 1, 2, 5, 9 or 24 hours also highlighted a time-dependent modulation of Gli1, NR0B1, FOXM1 and CCND1 (Figure 4D, 4E and Supplementary Figure S4D, 4E), which is however faster and more pronounced for the EWS-

Fli1 direct-targets than the indirect-ones. We observed the same tendency in the JQ1(+)-ability to modulate the aforementioned genes in a time-dependent manner at protein level (Figure 4F and Supplementary Figure S4F).

In order to confirm the EWS-Fli1-dependent modulation of the expression of Gli1, p21, NR0B1, FOXM1 and VEGFA, we assessed the expression of all these genes in the ASP14 cell line, which bears a doxycycline-inducible shEWS-Fli1. EWS-Fli1 knock-down in these cells results in the inhibition of Gli1, NR0B1, FOXM1, VEGFA and CCND1 expression as well as the induction of p21 one (Supplementary Figure S4, S4I, S4J, S4K).

The BET proteins inhibition's effects on EWS-Fli1's regulated pathways were also assessed. The MAPK/ ERK signaling has recently been suggested as a pivotal pathway in Ewing tumor proliferation and malignant progression [49]. Particularly, it was previously reported that the ERK1/2 proteins are constitutively activated in NIH3T3 cells transformed by an artificial expression of EWS-Fli1 [50]. We first confirmed this observation in our model. Indeed, an EWS-Fli1 knockdown in the ASP14 cells consequently reduces the ERK1/2 phosphorylationmarks, witnesses of the MAPK/ERK pathway activation (Supplementary Figure S4L). In accordance with these results, a dose- as well as a time-dependent inhibition of the ERK1/2 signaling was observed in both the TC71 and the A673 cell lines consequently to a JQ1(+) treatment (Figure 4G, 4H and Supplementary Figure S4G, S4H).

To support the EWS-Fli1-related cell cycleregulation of the Ewing Sarcoma cells, the Rb phosphorylation level as well as the CCNE1 and CCND1 expression were evaluated in the shEWS-Fli1 inducible ASP14 model (Supplementary Figure S4M). A reduction in the Rb phosphorylation level and an inhibition of the CCNE1 and the CCND1 expression were observed, mimicking the BET bromodomain inhibition's effects mediated by JQ1(+) on the cell cycle (Figure 2C, 2D and Supplementary Figure S2C, S2D). The gene expression signature and the modulation of the EWS-Fli1's relatedpathways finally observed after EWS-Fli1 knock-down are in full agreement with the ones resulting from the BET bromodomain inhibition, reinforcing the assertion that JQ1(+) directly inhibits the Ewing Sarcoma malignant features through EWS-Fli1 signaling.

JQ1 delays Ewing Sarcoma growth and prolongs cancer-specific overall survival

To investigate the *in vivo* therapeutic potential of BET inhibition in Ewing Sarcoma, we used a human xenograft model known to recapitulate the features of the human pathology. 1.5 million TC71 tumor cells were implanted in paratibial in athymic mice, and mice were then intraperitoneally (IP) injected with JQ1(+) (50 mg/kg) or vehicle twice a day when the tumor volume reaches 100 mm³ (Figure 5A). JQ1(+) treatment

significantly reduced the average tumor growth in our model (Figure 5B). Moreover, the Kaplan-Meier analysis revealed that BET proteins inhibition significantly prolonged the overall survival of tumor-bearing mice (Figure 5C). Expression analysis for EWS-Fli1 was performed by qRT-PCR on the mice tumor biopsies.



Figure 3: JQ1(+) treatment in Ewing Sarcoma cells induces a dose- and a time-dependent EWS-Fli1 down-regulation. (A) qRT-PCR for EWS-Fli1 RNA levels in DMSO or JO1(+)-treated A673 and TC71 Ewing Sarcoma cell lines at different doses for 24 h. GAPDH and B2M expression are used as housekeeping genes. Error bars show standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. (B) The A673 (left panel) and TC71 (right panel) Ewing Sarcoma cell lines were treated with 0.4, 4 or 8 µM JQ1(+) for 24 hours and the EWS-Fli1 expression level was evaluated by Western blotting. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as a loading control. (C) qRT-PCR for EWS-Fli1 RNA levels in DMSO, JQ1(+)-treated A673 (left panel) and TC71 (right panel) Ewing Sarcoma cell lines at different time points, from one to nine hours (4 µM JQ1(+)). GAPDH and B2M are used as housekeeping genes. Error bars show standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. (D) Immunoblotting of the EWS-Fli1 expression in the same cell lines as represented in (C) treated by JQ1(+) for 6, 16, 24 or 48 hours at 1 μ M. Actin was used as a loading control. (E) ChIP with a BRD4 antibody at three sites within the EWS-Fli1promoter region in A673 cells treated with 4 μ M JQ1(+) for 5 h 30. Enrichment is shown as the percentage of total input DNA. Error bars show standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. The top track show the levels of enrichment of the H3K27Ac histone mark across the genome as determined by a ChIP-seq assay on seven cell lines from ENCODE. (F) The EWS-Fli1 expression was assessed at mRNA level in the ASP14 cell line treated or not with 1 µg/mL Doxycycline for 48 or 72 hours, to induce the shEWS-Fli1 transcription. The EWSFli1expression was assessed at mRNA level after qRT-PCR (upper panel) and at protein level after Immunoblotting (lower panel). GAPDH and B2M are used as housekeeping genes in the qRT-PCR assays. Error bars show standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as a loading control for the Western blotting. (G) ASP14 Ewing Sarcoma cells were treated or not with 1 µg/mL Doxycycline during 72 hours to induce the shEWS-Fli1 transcription and plated at clonal density for colony counts thanks to crystal violet staining performed after a 6-days incubation time. For all the clonogenic assays, error bars show the standard deviation for n = 6 measurements from representative experiments and a two-tailed paired Student's t-test was used to compare the different conditions. (H) ASP14 Ewing Sarcoma cells were treated or not with 1 µg/mL Doxycycline during 72 hours to induce the shEWS-Fli1 transcription and 2000 cells per well were seeded in 96-wells plates. The cells were then treated with 6.5 µM JQ1(+) or the same amount of DMSO. The cell viability was assessed after 48 hours by WST-1 assay. Error bars show the standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments and a two-tailed paired Student's *t*-test was used to compare the different conditions.



Figure 4: JQ1(+) treatment in Ewing Sarcoma cells induces a dose- and a time-dependent modulation of pathways under the control of EWS-Fli1. (A) qRT–PCR for EWS-Fli1 direct-target genes (Gli1, NR0B1 and p21) and (B) EWS-Fli1 indirect-target genes (FOXM1 and VEGFA) in DMSO or JQ1(+)-treated Ewing Sarcoma A673 cell line during 24 h, at 1 and 10 μ M JQ1(+). (C) FOXM1-, NR0B1- and p21-EWS-Fli1-target gene expression was evaluated at protein level by Immunoblotting in the A673 Ewing Sarcoma cell line after JQ1(+) treatment at 0.4, 4 or 8 μ M during 24 h. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as a loading control. (D) qRT–PCR for EWS-Fli1 direct target genes (Gli1and NR0B1) and (E) EWS-Fli1 indirect-target genes (FOXM1 and CCND1) in DMSO (Veh.) or JQ1- (+)-treated Ewing Sarcoma A673 cells at 4 μ M during 1, 2, 5, 9 and 24 hours. (F) FOXM1-, NR0B1- and p21-EWS-Fli1-target gene expression was evaluated at protein level by Immunoblotting in the A673 Ewing Sarcoma cell line after JQ1(+) treatment at 0.4, 4 or 8 μ M or after a 4 μ M JQ1(+) treatment during 3, 6, 24, or 30 hours. (G) ERK ½ phosphorylation level was evaluated by Immunoblotting in the A673 Ewing Sarcoma cell line after a 24 hours JQ1(+) treatment at 0.4, 4 or 8 μ M or after a 4 μ M JQ1(+) treatment during 3, 6, 24, or 30 hours (H). All the Western blots were performed at least twice and representative blots are presented. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as a loading control. For all the qRT-PCR, GAPDH and B2M are used as housekeeping genes and error bars show standard deviation for *n* = 3 measurements from representative experiments.

Accordingly to our *in vitro* results, we observed a significant repression of EWS-Fli1 expression in the mice cohort treated with JQ1(+) (Figure 5D). In order to functionally validate the JQ1(+)-mediated transcriptional repression of EWS-Fli1 in our *in vivo* model, we also examined the EWS-Fli1 direct- and indirect-target genes Gli1, p21, FOXM1, VEGFA and CCND1 expression (Figure 5D). As expected, Gli1, FOXM1, VEGFA and CCND1 expression were significantly decreased in the JQ1(+) treated group, whereas the one of p21 was increased. However no statistical change was observed concerning the NR0B1 expression in these conditions (Supplementary Figure S5A).

To better characterize the functional effect of the BET bromodomains inhibition within the tumoral-tissue, immunohistochemical staining for the proliferative marker Ki⁶⁷ was performed. Tumor biopsies from JQ1(+)-treated mice display a statistically significant decreased cell proliferation compared with their untreated counterparts (Figure 5E). In addition, a correlation between the Ki⁶⁷ staining and EWS-Fli1 expression is observed in the tumor samples, (Supplementary Figure S5B). Immunohistochemical staining for the caspase-3 activity was also assessed in these samples and the results show an higher induction of apoptosis in the JQ1(+)cohort (Figure 5F). Because of the in vitro decrease of the VEGFA expression observed after inhibition of BET proteins, we determined the JQ1(+) effect on the vascularization within the tumors by performing a CD146 immunohistochemical staining. Different vascularizationparameters were estimated, and JQ1(+) not only inhibits the global vascularization, but also contributes to reduce the average vessels size (Figure 5G). Collectively, these in vivo data suggest that the potent anti-tumor activity of JQ1(+) in Ewing Sarcoma is mediated through its inhibitory effects on the EWS-Fli1oncogene expression and its transcriptional targets.

DISCUSSION

Since EWS-Fli1 was identified as the crucial driveroncogene in Ewing Sarcomas, it is considered as the best therapeutic target for this pathology. Impairing its activity through a direct inhibition of its transcript is indeed a seducing strategy to reduce the malignant features of the Ewing Sarcoma cells. In this perspective, mithramycin, trabectedin and the so-called YK-4–279, an inhibitor of the EWS-Fli1/RNA helicase A interaction have recently been uncovered as potent EWS-Fli1 transcription factor activity inhibitors [51–53], however without inhibiting the transcription of this oncogene itself. Consequently, novel strategies implicating an early control of its expression, upstream its transcription could be of great interest in this context. In this study, we highlight the essential implication of BET bromodomain signaling in the control of EWS-Fli1 expression, as well as the potential application of BET bromodomain inhibitors as powerful antitumor agents in Ewing Sarcoma.

The recently identified "super-enhancers" regions are large DNA portions, characterized by both a high density of cell type-specific master transcription factors and a H3K27Ac enrichment [54]. Such enhancers finetune the expression of key cell-identity genes and are consequently implicated in the cell fate determination since they allow adaptations of the transcriptional program to the cell environment. Considering both the central role of EWS-Fli1 in Ewing Sarcoma and the cell's addiction to this oncogene, we hypothesized that super enhancers might govern its expression.

We herein demonstrated that treating Ewing Sarcoma cells with JQ1, a BET bromodomain inhibitor reduces their viability, their clonogenic features as well as their migratory capabilities. Moreover, it also leads to a G1-phase arrest, characterized by a P-Rb, a CCND1 and a CCNE1 reduced expression. This cell-cycle effect was reproduced in a shEWS-Fli1 induced model and is in agreement with previously published data reporting the same results down-regulating EWS-Fli1 with antisense oligonucleotides [12]. In addition, we have shown that this disturbance of the cell-cycle ultimately leads to an apoptotic cell-death, mediated by the caspase 3/7 pathway and resulting in the PARP cleavage.

The functional effects of the BET bromodomain inhibition observed in our Ewing Sarcoma models are indeed attributable to the strong reduction in the oncogenicdriver EWS-Fli1 expression, which are both dose- and time-dependent. We indeed demonstrated for the first time through chromatin immunoprecipitation that BRD4 actively binds to the EWS-Fli1 promoter, at H3K27Ac enriched sites. As a consequence, we also showed that a JQ1(+) treatment leads to the release of BRD4 from the EWS-Fli1 promoter. Interestingly, it was recently reported that the H3K27Ac were the histone marks the most strongly inhibited by EWS-Fli1 knockdown [43]. This information sheds light on the possibility that the reduced EWS-Fli1 expression mediated by BET bromodomain inhibitors such as JQ1(+) could also lead to a generalized transcriptional inhibition, as well as having a consequent downstream effect on the EWS-Fli1 controlled-target genes. Our work demonstrated that it reduces in a dose- and in a time-dependent manner the expression of Gli1, NR0B1, FOXM1 and VEGFA, some of the EWS-Fli1 target-genes considered as determining factors in the carcinogenesis of Ewing Sarcoma [19, 55-57]. In addition, we have also demonstrated that the JQ1(+)mediated BET bromodomain inhibition has a consequent downstream effect on the ERK1/2 signaling, one of the pathways that EWS-Fli1 normally activates and which

contributes to the preservation of the Ewing Sarcoma malignant features [49].

The antitumor effects of JQ1(+) on Ewing Sarcoma were also confirmed *in vivo*, as intra-peritoneal administrations of JQ1(+) significantly improve the overall survival of tumor-bearing nude mice through delaying the tumor growth. Our histological analyses point that the cells within the tumors of the treated-animals display a slowed proliferation and are more prone to apoptotic death. The results of our *in vivo* orthotopic model are in full agreement with those of Hensel et al. in their subcutaneous heterotopic Ewing Sarcoma model [45]. In addition, the BET inhibitory treatment leads to a significant reduction of both the global tumor-vascularization as well as the VEGFA expression within the tumor-cells. These results corroborate the decreased expression of this angiogenesis regulator, which is also one of the EWS-Fli1 target genes, observed *in vitro*. Interestingly, VEGF was reported to



Figure 5: JQ1(+) significantly delays tumor growth in TC71 xenograft model and prolongs cancer-specific survival. (A) Experimental design: 1.5 million TC71 Ewing Sarcoma cells were injected paratibially in nude mice. Mice were IP injected with 50 mg/kg JQ1(+) or vehicle (10% HP- β -CD) twice a day for the indicated time when tumor volume reached 100 mm³. (B) The mean tumor volume of mice treated was compared with control group ± s.e.m (n = 8 mice in each group). Two-way ANOVA statistical test was used. (C) In Kaplan–Meier curves, cancer-specific survival were compared between mice treated with JQ1(+) and control. The log-rank (Mantel-Cox) test was used to compare the overall survival between groups. (D) EWS-Fli1, Gli1, p21, FOXM1, VEGFA and CCND1 expressions were evaluated in tumor tissues, after RNA extraction, by qRT–PCR. For all the qRT-PCR, GAPDH and B2M are used as housekeeping genes. Unpaired two-tailed *t*-test was used to compare the gene expression between groups. (E) Tumors were collected at the time of euthanasia and Ki67 was evaluated by immunohistochemical analysis (original magnification, 200; scale bar, 100 µm). (F) Tumors were collected at the time of euthanasia and CD146 staining was performed by immunohistochemical analysis (left panel). The size of vessels (right panel) was also calculated thanks to the Image J software. For each mouse, ten pictures were taken and were scored and estimated in % of positive cells ± s.d. for DAB activity, in the delimited region of interest (ROI) within the tumor. Error bars show s.d. for n = 80 pictures.

play an important prognostic role in soft tissue sarcomas and in Ewing tumors, as its expression correlates with a poor patient survival [15, 58].

In conclusion, our results shed light on the BET bromodomains' role, especially BRD4's one, as essential regulators of Ewing Sarcoma carcinogenesis. Indeed, we herein bring novel glimpse at their requirement in the control of EWS-Fli1's expression, the master Ewing Sarcoma-specific oncogene. BET bromodomain protein inhibition consequently impacts EWS-Fli1's downstream signaling, which is functionally decisive for the interference in the tumorigenic program of these cancercells. The work presented in this study provides support for evaluating the BET bromodomain-related protein family as a promising therapeutic target.

MATERIALS AND METHODS

Tumor cell lines

Ten human Ewing Sarcoma cell lines were used: the A673 (young 15 years old female Ewing Sarcoma from muscle origin), TC32 (young 31 month female from solid primitive neuroectodermal origin), SKES-1 (young 18 years old Caucasian male Ewing Sarcoma from bone origin), SK-N-MC (young 14 years old Caucasian female from neurogenic origin) and RDES (young 19 years old Caucasian male Ewing Sarcoma from bone origin) cell lines were kindly provided by Dr. S. Burchill (Children's Hospital, Leeds, United Kingdom) and the EW24 and TC71 cell lines by Dr. O. Delattre (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U830, Paris, France). The A673-1c and the ASP14 (A673/TR/shEF) cells were kind gifts from Dr. F. Tirode (Institut Curie, Paris, France) and F. R. Alonso Garcia de la Rosa (Instituto de Investigacion en Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain) respectively. The ASP14 cells were cultured in presence of zeocin 50 µg/mL and blasticidin 2 µg/mL, and the shEWS-Fli1 system was induced by adding 1 µg/mL doxycycline. The cell lines A673, A673-1c, ASP14, TC32, SKES-1 and RDES were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen-Life Technologies Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone) and 2 mmol/L L-glutamine. The SK-N-MC, STAET-1, EW7, EW24, and TC71 cells were cultured in RPMI (Invitrogen-Life Technologies Inc.) with 10% FBS. The IOR/BRZ cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM Invitrogen-Life Technologies Inc.) with 10% FBS and 2 mmol/L L-glutamine. All cell lines were cultured in the presence of 1% penicillin/streptomycin and type I collagen (Sigma-Aldrich) was required to allow the STAET-1, TC71and EW7 cells to grow. All cell lines were cultured in a humidified 5% CO₂/air atmosphere at 37°C and were passaged for less than 3 months.

Therapeutic agents

BRD4 inhibitor, JQ1, was kindly provided by James Bradner (Dana-Farber Cancer Institute). This synthetic compound targets selectively the acetyl-lysinebinding pocket of the BET bromodomain proteins. For *in vitro* studies, JQ1 was dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) at 10mM stock solutions and stored at -20° C. For the *in vivo* studies, JQ1 was dissolved in DMSO at 50 mg/ml and then diluted in 10% hydroxypropyl beta cyclodextrin (HP- β -CD, Sigma-Aldrich) to get the final dose, 50 mg/kg and stored at 4°C. The 10% HP- β -CD is prepared in sterile water, which was filtered with 0.22 µm filter. During this study, the active enantiomer of JQ1 was called JQ1(+), whereas the inactive one was called JQ1(-).

Cell proliferation assay and GI₅₀ calculation

Ewing Sarcoma cell lines were plated in 96-wells plates in the appropriate medium with 10% FBS and treated with JQ1 at indicated concentration and time and cell growth was measured using the WST-1 assay (Roche, Mannheim, Germany). At the end of the incubation time, culture medium is removed and replaced by the WST-1 reagent diluted in fresh medium in a 1:10 proportion. After a 7 hours incubation time, the absorbance at 470 nm of each well was measured on a 96-multiwellmicroplate reader (Victor² 1420; PerkinElmer Inc.) and normalized to the average reading of wells containing medium only. Each assay was performed in triplicate. The GI₅₀ were calculated thanks to the GraphPad Prism 6 software.

Quantitative reverse transcription-PCR

Total RNA was extracted from cultured cells or from crushed-xenograft samples using QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) and the miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was reversed transcribed using the Thermo Script RT-PCR System (Life Technologies). Real-time monitoring of PCR amplification of complementary DNA was performed using DNA primers on CFX96 real-time PCR detector system (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) with SYBR PCR Master Mix buffer (Bio-Rad). Target gene expression was normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and β -2 microglobulin levels in respective samples as an internal standard, and the comparative cycle threshold (Ct) method was used to calculate relative quantification of target messenger RNAs. Each assay was performed in triplicate. The primers sequences are the following: B2M FW: 5'-TTCTGGCCTGGAGGCTATC-3', RV: 5'-TCAGGAA ATTTGA-3'; BRD2 FW: 5'-GCTTTAGGCCCTTCTG GCTT-3', RV: 5'-ATCATAACCTGTAGGCAGGGC-3'; BRD3 FW: 5'- CTGAAACCCACCACTTTGCG-3', RV: 5'- GCTCCTCTTTCGACTTGGCT-3'; BRD4 FW: 5'- G CTCAGGAATGTATCCAGGACT-3', RV: 5'- CCAGAG

CTTCTGCCATTAAGA-3'; BRDT FW: 5'-TGACATCT CTCTCTCGCCCT-3', RV: 5'-CTCGCCTCTTCACACC CTTT-3'; CCND1 FW: 5'-GCCGAGAAGCTGTGCA TC-3', RV: 5'-CCACTTGAGCTTGTTCACCA-3'; EWS-Fli1 FW: 5'-GCCAAGCTCCAAGTCAATATAGC-3', RV: 5'- GGGCCGATTCATGTTATTGC-3'; FOXM1 FW: 5'-GCAGGCTGCACTATCAACAA-3', RV: 5'-TCGAAG GCTCCTCAACCTTA-3'; GAPDH FW: 5'-TGGGTGTG AACCATGAGAAGTATG-3', RV: 5'-GGTGCAGGAGG CATTGCT-3'; Gli1 FW: 5'-ACCCGGGGTCTCAAAC TG-3', RV: 5'-GGCTGACAGTATAGGCAGAGC-3'; NR 0B1 FW: 5'-TGCTCTTTAACCCGGACGTG-3', RV: 5'-GCGTCATCCTGGTGTGTGTTCA-3'; p21 FW: 5'-CGA AGTCAGTTCCTTGTGGAG-3', RV: 5'-CATGGGTTC TGACGGACAT-3'; VEGFA FW: 5'-CCTTGCTGCTCTA CCTCCAC-3', RV: 5'-CCACTTCGTGATGATTCTGC-3'.

2D Clonogenic assay

Ewing Sarcoma cells were seeded at a density of 1000 cells per well in 6-well plate and treated with 4 μ M of JQ1(+), JQ1(-) or the corresponding amount of DMSO for 48 hours. Culture medium was then replaced by fresh one and the cells were cultured for additional 6 days. The colonies were then washed in PBS, fixed for 10 min with glutaraldehyde 10% and stained with crystal violet (1% in water) for 10 min at room temperature. Pictures of the stained wells were taken and the stained surfaces/ total areas of each well were calculated thanks to the ImageJ software. Each assay was performed in triplicate and two areas per well were randomly chosen to take pictures.

Boyden chamber assay

Ewing Sarcoma cells were cultured or not in presence of JQ1(+) during 24 hours and 20 000 cells were then plated in 8 µm-pored Boyden Chambers (Falcon), always in presence of JQ1(+), in 1% FBS growth medium for additional 48 hours. A 1%/10% FBS-gradient was generated between the upper and the lower Chamber of the system, to promote the cell migration. At the end of the incubation time, the cells on the upper side of the Chamber were mechanically removed and those on the lower side of the Chamber were fixed with 10% Glutaraldehyde and stained with 0.1% Crystal Violet. Pictures of the Chambers were taken and four different areas were arbitrary chosen to perform quantitative analyses. The ratio « colored surface/ total surface » was determined thanks to the ImageJ software. Representative pictures of the Boyden were chosen here. For all the Boyden Chambers experiments, error bars show the standard deviation for n = 8 measurements from representative experiments and a two-tailed paired Student's t-test was used to compare the different conditions.

Cell cycle analysis

Ewing Sarcoma cell lines were incubated in the presence of 1 μ M JQ1 for 48 h, trypsinized, washed and fixed in 70% ethanol for 30 minutes at 4°C. The cells are then washed, centrifugated and the pellet is resuspended in a phospho-citrate solution (Na₂HPO₄ 0.2 M; citric acid 0.1 M, pH 7.5). Cells were centrifugated and resuspended in a PBS solution containing 4 mg/ml Ribonuclease A for 30 min at 37°C. 50 mg/ml propidium iodide was then added to each sample for 20 min at 4°C and the cell cycle distribution was then analysed by flow cytometry (Cytomics FC500; Beckman Coulter, Roissy, France) based on 2 N and 4 N DNA content. Multi Cycle AV DNA Analysis software was used to process the data.

Western blotting analysis

Samples containing equal amounts of protein (depending on the antibody, 15-75 mg) from lysates of cultured Ewing Sarcoma cell lines underwent electrophoresis on SDS-PAGE and were transferred to polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes. The membranes were blocked in 3% BSA-PBS-0.05% Tween at room temperature for 1 h and blots were probed overnight at 4°C with the following primary antibodies: rabbit anti-Fli1 c-19 sc-356, 1:500; rabbit anti-p21 (c-19) sc-397#DO312, 1:200; rabbit anti-FOXM1 c20 sc-502, 1:100; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA; rabbit anti-NR0B1 (DAX1) #13538, 1:1000; rabbit anti-P-44/42 MAPK (T202/Y204) #4370S, 1:2000; rabbit anti-p44/42 #9102S, 1:1000; mouse anti-Rb, 4H1 #9309S, 1:1000; rabbit anti-P-Rb (ser807-811) #9308S, 1:1000; rabbit anti-CCND1#2922S 1:1000; mouse anti-CCNE1 (HE12) #4129S 1:1000; rabbit anti-PARP #9542S, 1:1000; rabbit anti-GAPDH 14c10, 1:2000; Cell Signaling Technologies, Beverly, CA; rabbit antiactinA5060 (20-33) 1:10 000; Sigma-Aldrich; to detect proteins of interests. After incubation, the membranes were washed three times with washing buffer (PBS containing 0.05% Tween) for 5 min. Membranes were then saturated 1 h with 5% milk-PBS-0.05% Tween (Régilait). Membranes were finally incubated for 1 h with secondary antibodies (goat-anti-rabbit sc-2004 #J1512, 1:10000; donkey-anti-mousesc-2314 #C2012 1:5000; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) at room temperature. Specific proteins were detected using SuperSignal® WestDura Extended Duration Substrate (ThermoScientific, Rockford, USA) and a G-Box (Syngene, Cambridge, UK) after washing. Pictures were analysed thanks to ImageJ software. Actin and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were used as an internal loading control. The relative quantization of EWS-Fli1 expression (Supplementary Figure S3) was performed thanks to ImageJ software and normalized on the Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression.

Cell death assessment

Cellular viability was determined using the Trypan Blue dye exclusion method (Trypan Blue, Eurobio, les Ulis, France; final dye concentration: 0.1% w/v) and a hemocytometer. The caspase 3/7 activity was assessed thanks to the apo-ONE[®] Homogeneous caspase-3/7 Assay kit (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. Each assay was performed in triplicate.

Quantitative ChIP assay

A ChIP assay was performed by the Magnify ChIP system (Invitrogen-Life Technologies Inc.) using 5 mg of BRD4 antibody (BethylLab) or control rabbit IgG (R & D Systems). Real-time PCR (Bio-Rad) was performed on fragmented DNA using specific primers for the EWSR1 loci. Primers were designed to amplify sites within each gene locus based on the H3K27 acetylation level. The levels of enrichment of the H3K27Ac histone mark across the genome has been determined by a ChIP-seq assay on seven cell lines from ENCODE web resources. We used the following primers: EWSR1-1 sense 5'-CCGTAAACCTCCTCCTGCAT-3' and anti-sense 5'-AAGCCCTTCACCCTTGCTAA-3'; EWSR1-2 sense 5'- GCAGTTGTTCTAGTCCGGGT-3' and anti-sense 5'- CCGCAACTCTTGTCCCAGTC-3' ; EWSR1-3 sense 5'- AAGACTGAGTGGAGTTGCCG-3' and antisense 5'- GAAGATTCCAGAACCGGCCC-3'. For the ChIP-qPCR, error bars show standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. Each assay was performed in triplicate.

Animal treatment

All procedures involving mice (their housing in the Experimental Therapeutic Unit at the Faculty of Medicine of Nantes (France) and care, the method by which they were anaesthetized and killed, and all experimental protocols) were conducted in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA.PdL.06). Mice were anaesthetized by inhalation of a combination of isoflurane/air (1.5%, 1 l/min) and buprenorphine (0.05 mg/kg; Temge'sic, Schering-Plough). Tumor volume was measured three times weekly and tumor volume was calculated by using the formula: length*width*depth*0.5. Data points were expressed as average tumor-volume \pm s.e.m. Xenograft models were induced by a paratibial injection of 1.5.106 TC71 cells of 5-week-old female athymic nude mice (Harlan Sprague-Dawley Inc.), leading to a rapidly growing tumor in soft tissue with secondary contiguous bone invasion. Once palpable tumors, mice were randomly assigned to vehicle or JQ1(+). When tumors reached 100 mm³, JQ1(+) (50 mg/kg; formulation in 10% HP- β -CD in sterile water) is IP injected twice a day, every day. Each experimental group consisted of eight mice. When tumor volume reached 10% of body weight, mice were killed and tumor biopsy samples were collected for evaluation of mRNA expression by RT-qPCR analyses. Tumors were also harvested for immunohistochemistry analyses.

Immunohistochemistry

Immunostaining for Ki67 was conducted using a primary antibody mouse anti-human Ki⁶⁷ (M7249, 1:100; Dako) on tumor section. Immunostaining for CD146 was conducted using a primary antibody rabbit anti-human CD146 (ab75769, 1:800; Abcam) on tumor section. Immunostaining for Cleaved caspase-3 was conducted using a primary antibody rabbit anti-human Cleaved Caspase-3 (9664, 1:400; Cell Signaling) on tumor section. All analyses were assessed by light microscopy using a DMRXA microscope (Leica). The comparisons of Ki67 and CD146 staining intensities were made at ×200 magnifications whereas ones of Cleaved caspase-3 were made at ×50 magnifications. Pictures were taken thanks to the NDP.view 2 Hamamatsu software, and the quantization of the staining intensities was performed with ImageJ. For each histological-slide from the tumor-sample of one mouse, 10 areas were arbitrary chosen to represent the whole tumor section. The ImageJ ImmunoRatio version 1.0c 14.2.2011 plugin was used to carry out the Ki67 analysis on these 10 areas. All the histograms presented in the Figures result from the average of the DAB-positive surface counting performed on the 10 areas selected for the eight mice per group. The vessels size assessment is based on a pixel scale and according to the results table of the ImageJ software, it corresponds to the average vessel perimeter.

Statistical analysis

For each experimental data point, the standard deviation from replicate experiments was calculated as noted in the legends and is shown as error bars. All error bars show standard deviation for at least triplicate measurement from representative experiments. The mean \pm s.d was calculated for all groups and compared by two-tailed paired Student's *t*-test or by ANOVA analysis of variance. Error bars from the *in vivo* tumor growth monitoring represent the s.e.m from the mean tumor volume of the mice (n = 8 mice in each group). P < 0.05 was used as the criteria for statistical significance. For the Supplementary Figure S5B, the Pearson productmoment correlation coefficient (R^2) was calculated. GraphPad Prism 6 software was used for all statistical analysis.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

This paper was written as a part of research project which received funding from the Seventh Framework Program ([FP7/2007–2013]) under grant agreement n°264817 – BONE-NET.

Camille Jacques is funded by INSERM and Région Pays de la Loire.

CONFLICTS OF INTEREST

Dr. Bradner is the scientific founder of Tensha Therapeutics which has licensed drug like inhibitors of BET bromodomains from the Dana-Farber Cancer Institute for clinical translation as cancer therapeutics.

REFERENCES

- Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. Oncologist. 2006; 11:503–519.
- Ewing J. Classics in oncology. Diffuse endothelioma of bone. James Ewing. Proceedings of the New York Pathological Society, 1921. CA Cancer J Clin. 1972; 22: 95–98.
- Schuck A, Ahrens S, Paulussen M, Kuhlen M, Konemann S, Rube C, Winkelmann W, Kotz R, Dunst J, Willich N, Jurgens H. Local therapy in localized Ewing tumors: results of 1058 patients treated in the CESS 81, CESS 86, and EICESS 92 trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003; 55:168–177.
- 4. Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard DJ, Gebhardt MC, Dickman PS, Perlman EJ, Meyers PA, Donaldson SS, Moore S, Rausen AR, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. N Engl J Med. 2003; 348:694–701.
- Paulussen M, Craft AW, Lewis I, Hackshaw A, Douglas C, Dunst J, Schuck A, Winkelmann W, Kohler G, Poremba C, Zoubek A, Ladenstein R, van den Berg H, et al. Results of the EICESS-92 Study: two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment—cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in highrisk patients. J Clin Oncol. 2008; 26:4385–4393.
- Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2014; 25:iii113–123.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. Nature. 1992; 359:162–165.

- May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R, Denny CT. The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. Mol Cell Biol. 1993; 13:7393–7398.
- Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, Cormier F, Delattre O, Roussel M, Thomas G, Ghysdael J. DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t (11; 22) translocation in Ewing sarcoma. Mol Cell Biol. 1994; 14:3230–3241.
- Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, Sevenet N, Thomas V, Weissman BE, Delattre O. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2and c-Myc expression. Oncogene. 2001; 20: 3258–3265.
- Fukuma M, Okita H, Hata J, Umezawa A. Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. Oncogene. 2003; 22:1–9.
- 12. Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Matsuda S, Iwamoto Y. Downregulation and forced expression of EWS-Fli1 fusion gene results in changes in the expression of G (1) regulatory genes. Br J Cancer. 2001; 84:768–775.
- Beauchamp E, Bulut G, Abaan O, Chen K, Merchant A, Matsui W, Endo Y, Rubin JS, Toretsky J, Uren A. GLI1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 oncoprotein. J Biol Chem. 2009; 284:9074–9082.
- Braun BS, Frieden R, Lessnick SL, May WA, Denny CT. Identification of target genes for the Ewing's sarcoma EWS/ FLI fusion protein by representational difference analysis. Mol Cell Biol. 1995; 15:4623–4630.
- 15. Fuchs B, Inwards CY, Janknecht R. Vascular endothelial growth factor expression is up-regulated by EWS-ETS oncoproteins and Sp1 and may represent an independent predictor of survival in Ewing's sarcoma. Clin Cancer Res. 2004; 10:1344–1353.
- Nagano A, Ohno T, Shimizu K, Hara A, Yamamoto T, Kawai G, Saitou M, Takigami I, Matsuhashi A, Yamada K, Takei Y. EWS/Fli-1 chimeric fusion gene upregulates vascular endothelial growth factor-A. Int J Cancer. 2010; 126:2790–2798.
- Mendiola M, Carrillo J, Garcia E, Lalli E, Hernandez T, de Alava E, Tirode F, Delattre O, Garcia-Miguel P, Lopez-Barea F, Pestana A, Alonso J. The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FL11 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors. Int J Cancer. 2006; 118:1381–1389.
- Garcia-Aragoncillo E, Carrillo J, Lalli E, Agra N, Gomez-Lopez G, Pestana A, Alonso J. DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cellcycle progression in Ewing's tumor cells. Oncogene. 2008; 27:6034–6043.

- Christensen L, Joo J, Lee S, Wai D, Triche TJ, May WA. FOXM1 is an oncogenic mediator in Ewing Sarcoma. PLoS ONE. 2013; 8:e54556.
- 20. Richter GH, Plehm S, Fasan A, Rossler S, Unland R, Bennani-Baiti IM, Hotfilder M, Lowel D, von Luettichau I, Mossbrugger I, Quintanilla-Martinez L, Kovar H, Staege MS, et al. EZH2 is a mediator of EWS/FL11 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuroectodermal differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106:5324–5329.
- Hahm KB, Cho K, Lee C, Im YH, Chang J, Choi SG, Sorensen PH, Thiele CJ, Kim SJ. Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. Nat Genet. 1999; 23:222–227.
- 22. Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, Hanada M, Okada T, Iwamoto Y. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. J Biol Chem. 2003; 278:15105–15115.
- 23. Im YH, Kim HT, Lee C, Poulin D, Welford S, Sorensen PH, Denny CT, Kim SJ. EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. Cancer Res. 2000; 60:1536–1540.
- 24. Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. Mol Cell Biol. 2004; 24:7275–7283.
- 25. Kovar H. Downstream EWS/FLI1 upstream Ewing's sarcoma. Genome Med. 2010; 2:8.
- Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y. EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. J Clin Invest. 1997; 99: 239–247.
- 27. Hewings DS, Rooney TP, Jennings LE, Hay DA, Schofield CJ, Brennan PE, Knapp S, Conway SJ. Progress in the development and application of small molecule inhibitors of bromodomain-acetyl-lysine interactions. J Med Chem. 2012; 55:9393–9413.
- 28. Prinjha RK, Witherington J, Lee K. Place your BETs: the therapeutic potential of bromodomains. Trends Pharmacol Sci. 2012; 33:146–153.
- 29. Yang Z, He N, Zhou Q. Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. Mol Cell Biol. 2008; 28: 967–976.
- Bandopadhayay P, Bergthold G, Nguyen B, Schubert S, Gholamin S, Tang Y, Bolin S, Schumacher SE, Zeid R, Masoud S, Yu F, Vue N, Gibson WJ, et al. BET bromodomain inhibition of MYC-amplified medulloblastoma. Clin Cancer Res. 2014; 20:912–925.

- Lamoureux F, Baud'huin M, Rodriguez Calleja L, Jacques C, Berreur M, Redini F, Lecanda F, Bradner JE, Heymann D, Ory B. Selective inhibition of BET bromodomain epigenetic signalling interferes with the boneassociated tumour vicious cycle. Nature communications. 2014; 5:3511.
- 32. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, Kastritis E, Gilpatrick T, Paranal RM, Qi J, Chesi M, Schinzel AC, McKeown MR, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. Cell. 2011; 146:904–917.
- Dawson MA, Prinjha RK, Dittmann A, Giotopoulos G, Bantscheff M, Chan WI, Robson SC, Chung CW, Hopf C, Savitski MM, Huthmacher C, Gudgin E, Lugo D, et al. Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. Nature. 2011; 478:529–533.
- 34. Zuber J, Shi J, Wang E, Rappaport AR, Herrmann H, Sison EA, Magoon D, Qi J, Blatt K, Wunderlich M, Taylor MJ, Johns C, Chicas A, et al. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. Nature. 2011; 478: 524–528.
- 35. Komori T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. J Cell Biochem. 2002; 87:1–8.
- 36. Pande S, Browne G, Padmanabhan S, Zaidi SK, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. Oncogenic cooperation between PI3K/Akt signaling and transcription factor Runx2 promotes the invasive properties of metastatic breast cancer cells. J Cell Physiol. 2013; 228:1784–1792.
- Beesley AH, Stirnweiss A, Ferrari E, Endersby R, Howlett M, Failes TW, Arndt GM, Charles AK, Cole CH, Kees UR. Comparative drug screening in NUT midline carcinoma. Br J Cancer. 2014; 110:1189–1198.
- 38. Fiskus W, Sharma S, Qi J, Shah B, Devaraj SG, Leveque C, Portier BP, Iyer S, Bradner JE, Bhalla KN. BET protein antagonist JQ1 is synergistically lethal with FLT3 tyrosine kinase inhibitor (TKI) and overcomes resistance to FLT3-TKI in AML cells expressing FLT-ITD. Mol Cancer Ther. 2014; 13:2315–2327.
- 39. Shimamura T, Chen Z, Soucheray M, Carretero J, Kikuchi E, Tchaicha JH, Gao Y, Cheng KA, Cohoon TJ, Qi J, Akbay E, Kimmelman AC, Kung AL, et al. Efficacy of BET bromodomain inhibition in Kras-mutant non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2013; 19:6183–6192.
- Lochrin SE, Price DK, Figg WD. BET bromodomain inhibitors—a novel epigenetic approach in castrationresistant prostate cancer. Cancer Biol Ther. 2014; 15:1583–1585.
- Loven J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, Bradner JE, Lee TI, Young RA. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. Cell. 2013; 153:320–334.

- Hnisz D, Schuijers J, Lin CY, Weintraub AS, Abraham BJ, Lee TI, Bradner JE, Young RA. Convergence of developmental and oncogenic signaling pathways at transcriptional super-enhancers. Mol Cell. 2015; 58:362–370.
- 43. Tomazou EM, Sheffield NC, Schmidl C, Schuster M, Schonegger A, Datlinger P, Kubicek S, Bock C, Kovar H. Epigenome Mapping Reveals Distinct Modes of Gene Regulation and Widespread Enhancer Reprogramming by the Oncogenic Fusion Protein EWS-FLI1. Cell Rep. 2015; 10:1082–1095.
- Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM, Keates T, Hickman TT, Felletar I, Philpott M, Munro S, McKeown MR, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. Nature. 2010; 468:1067– 1073.
- Hensel T, Giorgi C, Schmidt O, Calzada-Wack J, Neff F, Buch T, Niggli FK, Schafer BW, Burdach S, Richter GH. Targeting the EWS-ETS transcriptional program by BET bromodomain inhibition in Ewing sarcoma. Oncotarget. 2016; 7:1451–63. doi: 10.18632/oncotarget.6385.
- 46. Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. Cancer Res. 2005; 65:8984–8992.
- 47. Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, Rahl PB, Lee TI, Young RA. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. Cell. 2013; 153:307–319.
- Zwerner JP, Joo J, Warner KL, Christensen L, Hu-Lieskovan S, Triche TJ, May WA. The EWS/FLI1 oncogenic transcription factor deregulates GLI1. Oncogene. 2008; 27:3282–3291.
- Chandhanayingyong C, Kim Y, Staples JR, Hahn C, Lee FY. MAPK/ERK Signaling in Osteosarcomas, Ewing Sarcomas and Chondrosarcomas: Therapeutic Implications and Future Directions. Sarcoma. 2012; 2012:404810.
- Silvany RE, Eliazer S, Wolff NC, Ilaria RL, Jr. Interference with the constitutive activation of ERK1 and ERK2 impairs EWS/FLI-1-dependent transformation. Oncogene. 2000; 19:4523–4530.

- 51. Grohar PJ, Woldemichael GM, Griffin LB, Mendoza A, Chen QR, Yeung C, Currier DG, Davis S, Khanna C, Khan J, McMahon JB, Helman LJ. Identification of an inhibitor of the EWS-FL11 oncogenic transcription factor by high-throughput screening. J Natl Cancer Inst. 2011; 103:962–978.
- 52. Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, Abaan OD, Chou TH, Dakshanamurthy S, Brown ML, Uren A, Toretsky JA. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FL11 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nat Med. 2009; 15:750–756.
- 53. Grohar PJ, Griffin LB, Yeung C, Chen QR, Pommier Y, Khanna C, Khan J, Helman LJ. Ecteinascidin 743 interferes with the activity of EWS-FLI1 in Ewing sarcoma cells. Neoplasia. 2011; 13:145–153.
- 54. Pott S, Lieb JD. What are super-enhancers? Nat Genet. 2015; 47:8–12.
- 55. Beauchamp EM, Ringer L, Bulut G, Sajwan KP, Hall MD, Lee YC, Peaceman D, Ozdemirli M, Rodriguez O, Macdonald TJ, Albanese C, Toretsky JA, Uren A. Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway. J Clin Invest. 2011; 121:148–160.
- 56. Sengupta A, Rahman M, Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. The dual inhibitory effect of thiostrepton on FoxM1 and EWS/FLI1 provides a novel therapeutic option for Ewing's sarcoma. Int J Oncol. 2013; 43:803–812.
- 57. Kinsey M, Smith R, Lessnick SL. NR0B1 is required for the oncogenic phenotype mediated by EWS/FLI in Ewing's sarcoma. Mol Cancer Res. 2006; 4:851–859.
- Yudoh K, Kanamori M, Ohmori K, Yasuda T, Aoki M, Kimura T. Concentration of vascular endothelial growth factor in the tumour tissue as a prognostic factor of soft tissue sarcomas. Br J Cancer. 2001; 84:1610–1615.

I.2.3. Complément de discussion à l'Article 2 :

En dépit des récents efforts d'optimisation des protocoles thérapeutiques concernant les doses ainsi que les cycles d'administration des agents de chimiothérapie, les **taux de survie** du **Sarcome d'Ewing** demeurent inchangés depuis la fin des années 1990²¹⁹. Dans ce contexte, la découverte de nouveaux traitements reste donc toujours un enjeu majeur et l'émergence des thérapies ciblées constitue une option de choix dans ce cancer, compte tenu de sa dépendance vis-à-vis de l'oncogène chimérique **EWS-Fli1**. Dans ce contexte, le ciblage thérapeutique d'enzymes et de protéines dont la signalisation opère en aval de cet oncogène a déjà fait l'objet d'études. Ainsi, même si de tels inhibiteurs ont pu prouver leur efficacité dans des modèles précliniques de Sarcome d'Ewing, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, leurs effets anti-tumoraux se sont avérés décevants en clinique humaine. En conséquence, le **ciblage direct** d'**EWS-Fli1** semble toujours demeurer une des stratégies idéales dans cette pathologie et l'inhibition des protéines à BET Bromodomaines pourrait être un moyen d'y parvenir.

A ces fins, nous avons ainsi pu montrer que JQ1, un inhibiteur synthétique spécifique des protéines à BET Bromodomaines, présentait des effets fonctionnels dans le Sarcome d'Ewing, notamment en réduisant les capacités prolifératives, clonogéniques et migratoires de ces cellules in vitro et en ralentissant la croissance tumorale in vivo. Notre étude a mis en évidence que les effets antinéoplasiques de cet agent étaient en partie relayés par ses fonctions d'inhibiteur de la transcription d'EWS-Fli1, via sa capacité à déplacer BRD4 du promoteur de ce gène (Fig. 3e). Une étude antérieure à la nôtre avait par ailleurs déjà rapporté l'effet dose-dépendant de JQ1 sur l'inhibition de l'expression d'EWS-Fli1²²⁰. Cette étude précise d'ailleurs que ces effets seraient liés au déplacement de BRD4 ainsi que de BRD3, du promoteur d'EWS-Fli1. Ces résultats et les nôtres sont toutefois en contradiction avec ceux de Loganathan et al., qui n'ont pas pu noter de changement significatif dans l'expression d'EWS-Fli1, ni dans celle d'EWS suite à un traitement par JQ1²²¹. Curieusement, la dose de 2,5 µM de JQ1 utilisée par cette équipe sur la lignée TC71 nous était largement suffisante pour observer une inhibition de l'expression d'EWS-Fli1, pour un temps de traitement identique et dans la même lignée (à savoir, dans notre cas, environ 40% d'inhibition à seulement 0,4 µM de JQ1 (Fig. 3a)). Quoi qu'il en soit, ces auteurs ont néanmoins pu démontrer que JQ1 réduisait le pouvoir transformant d'EWS-Fli1 sur la lignée de fibroblastes muris NIH3T3, ceci illustrant l'effet de ce composé comme inhibiteur fonctionnel de cet oncogène²²¹.

Par ailleurs, nos analyses ont montré que l'expression de quelques-uns de ses gènescibles comme *Gli1, FOXM1, NROB1, CCND1* ou *VEGFA* étaient également réduite suite à un traitement par JQ1 (Fig. 2d, 4a à 4f et Supp Fig. 2d et 4a à 4f). Nos résultats ont tout récemment été confirmés par une autre étude, décrivant que les inhibiteurs de BET Bromodomaines JQ1 et I-BET762 réprimaient tous deux l'expression de gènes « signatures » d'EWS-Fli1, caractéristiques de son activation et impliqués dans la progression tumorale du Sarcome d'Ewing²²¹. Ces gènes incluent *CCND1, PPP1R1A, PRKCB, VRK1, Gli1, CER1, CYPF22, DCDC2, RNF182, IGF1* ainsi que les facteurs anti-apoptotiques *Bcl-2* et *BIRC3*. Cette étude précise également que JQ1 induit l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que *BIM*, tout comme nous avons pu mettre en évidence qu'il induisait celle de *p21* (Fig. 4a, 4c, 4f et Supp Fig. 4a, 4c, 4f). De plus, d'après cette étude, les effets de JQ1 sur ces gènes seraient non seulement dus à son ciblage de BRD4, mais aussi à celui de BRD3, le knock-down de ces deux gènes par shARNs reproduisant partiellement son effet sur l'expression des gènes-cibles précédemment cités. Par ailleurs, il a été montré que d'autres gènes typiques du programme d'activation transcriptionnel d'EWS-Fli1 tels que *DKK2, EZH2, GPR64, PAPPA, STEAP1* ou *STK32B* étaient également réprimés par JQ1²²⁰. De surcroît, il a aussi été précisé qu'en inhibant l'expression de FOSL1, JQ1 entraînait une diminution de l'activité du complexe AP-1/C-Jun (Activator Protein-1/C-Jun), notamment impliqué dans la promotion de la prolifération cellulaire²²².

De façon intéressante, alors que *C-Myc* est une cible indirecte de JQ1 dans de nombreux types de cancers, dont l'Ostéosarcome (<u>cf. Article 2</u>), nous n'avons noté aucun effet significatif de cet inhibiteur sur l'expression de ce gène dans les lignées TC-71 et A673 (**data non montrées**). Nos résultats sont en accord avec ceux des équipes de Hensel et al., et Bid et al., qui n'ont pas non plus démontré d'effet inhibiteur de JQ1 sur l'expression de *C-Myc* dans les lignées de Sarcome d'Ewing ES-2 et ES-8 notamment^{220,222}.

D'autre part, nous avons pu souligner qu'une des conséquences fonctionnelles de l'inhibition de l'expression *d'EWS-Fli1* et de ses gènes-cibles par JQ1, se traduisait par une diminution de la signalisation par les **MAPKs** et plus particulièrement de l'activité des **kinases ERK 1/2** (**Fig. 4g, 4h et Supp Fig. 4g, 4h**). Les connaissances actuelles concernant l'impact fonctionnel des protéines à BET Bromodomaines sur les voies métaboliques qui contribuent à la progression tumorale de ce cancer ont tout récemment été complétées, JQ1 inhibant également la voie **IGF1R/Akt (Insulin Growth Factor 1 Receptor/Akt)**²²¹. De plus, on peut encore souligner la dépendance des Sarcomes d'Ewing vis-à-vis des voies des kinases, les effets de JQ1 sur l'induction de l'apoptose étant potentialisés par un traitement conjoint avec du **BEZ235**, un **inhibiteur de la voie PI3K** dans la lignée SK-N-MC²²⁰.

Nos analyses *in vivo* ont permis de démontrer que l'inhibition des protéines à BET Bromodomaines réduisait la **croissance tumorale** des animaux traités par JQ1 dans notre modèle murin de xénogreffe de Sarcome d'Ewing (**Fig. 5b**). L'effet **dose-dépendant** de JQ1 sur la croissance tumorale avait par ailleurs déjà été démontré dans un modèle similaire, l'administration de JQ1 à 50 mg/kg une seule fois par jour n'étant pas suffisante pour obtenir un effet significatif, alors que celle de 75 mg/kg était toxique pour les animaux²²⁰. Ceci soutient donc que le protocole que nous avons employé, à raison de deux injections quotidiennes de **50 mg/kg** de **JQ1**, semble être le régime de traitement optimum pour que les effets pharmacologiques bénéfiques de l'inhibition des protéines à BET Bromodomaines soient observables dans le Sarcome d'Ewing, sans pour autant générer de trop nombreux effets secondaires.

Notre étude in vivo a également permis de démontrer que l'inhibition des protéines à BET Bromodomaines réduisait la vascularisation globale des tumeurs ainsi que l'expression du facteur angiogénique VEGFA (Fig. 5d et 5g). Une étude antérieure à la nôtre avait par ailleurs déjà rapporté les effets anti-angiogéniques de JQ1 in vivo dans le Sarcome d'Ewing, associés à son effet inhibiteur de l'expression du VEGF, de l'Angiopoïétine, du Facteur Tissulaire et du FGF-I (Fibroblast Growth Factor I), d'autres facteurs importants dans le processus d'angiogénèse²²². Cette étude précisait également que ces effets pouvaient s'expliquer in vitro par le rôle inhibiteur de JQ1 sur la différenciation, la prolifération ainsi que sur le pouvoir invasif de cellules endothéliales vasculaires issues de cordes ombilicales humaines (lignée HUVEC). De plus, les auteurs ont rapporté que JQ1 diminuait leurs capacités de sécrétion de facteurs angiogéniques tels que le TGF-B, TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase), Ang1 (Angiopoietin 1), l'Angiotensine ou l'Endothéline²²². Ceci suggère que JQ1 agisse donc également sur les cellules du microenvironnement tumoral vasculaire indépendamment des cellules de Sarcome d'Ewing, ceci contribuant alors à ralentir la progression tumorale de ce cancer. De plus, en mettant en lumière les effets inhibiteurs de JQ1 sur la sécrétion du TGF- β , ces résultats illustrent encore une fois tout l'intérêt de l'emploi de cet inhibiteur dans le contexte des Sarcomes Osseux, ce facteur de croissance étant un élément clé du cercle vicieux établi entre les cellules de Sarcome et les cellules du microenvironnement osseux.

Toujours dans le cadre d'analyses précliniques de l'effet de JQ1 dans des modèles murins de Sarcome d'Ewing, il est intéressant de noter que ce composé ralentisse également la croissance tumorale de modèles de xénogreffes de Sarcome d'Ewing en site non-osseux, JQ1 étant alors administré via une voie différente de celle que nous avons employée. Cet effet a ainsi pu être montré dans diverses lignées, **implantées dans le flanc** des animaux par injection **sous-cutanée**, l'administration de JQ1 ayant alors eu lieu par **gavage oral**, une seule fois par jour, à 50 mg/kg²²². Ces résultats sont très intéressants dans la mesure où les Sarcomes d'Ewing surviennent aussi dans les tissus mous : ils démontrent ainsi que l'action directe de JQ1 sur les cellules tumorales, indépendamment du microenvironnement osseux dans ce contexte (<u>cf. Article 1</u>), soit suffisante pour obtenir une réponse thérapeutique *in vivo*. Par ailleurs, le protocole de traitement suivi ici apparaît beaucoup moins contraignant que celui que nous avons utilisé (**Fig. 5a**), suggérant également une simplification de la voie d'administration, dans des perspectives d'utilisation thérapeutique futures chez l'Homme.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que les protéines à BET Bromodomaines sont des éléments prépondérants dans la progression tumorale du Sarcome d'Ewing, de part leur rôle majeur dans la transcription de l'oncogène EWS-Fli1. En mettant en lumière leur implication dans la mise en place des processus biologiques fondamentaux du développement tumoral des Sarcomes d'Ewing, ce travail suggère également que leur ciblage dans un contexte thérapeutique puisse s'avérer très prometteur dans ces pathologies.

PARTIE II : IMPLICATION DES microARNs DANS L'ECHAPPEMENT TUMORAL DES SARCOMES OSSEUX :

II.1. INTRODUCTION : IMPLICATION DES microARNs DANS LA DISSEMINATION METASTATIQUE ET LA CHIMIORESISTANCE DES TUMEURS ASSOCIEES A L'OS :

II.1. Introduction : Implication des miARNs dans la dissémination métastatique et la chimiorésistance des tumeurs associées à l'os :

II.1.1. Problématiques de l'échappement tumoral des cancers : la dissémination métastatique et la chimiorésistance :

Parmi tous les traitements anticancéreux actuellement disponibles, la chimiothérapie, seule ou en association avec la chirurgie ou la radiothérapie, est de loin la plus employée. Ces dernières années, de nombreuses molécules de chimiothérapie se sont développées et ont largement contribué à améliorer la survie des patients atteints de cancers. En permettant de **limiter la prolifération** des cellules tumorales et en agissant sur leurs **caractéristiques malignes** intrinsèques, telles que leur **propension à former des clones**, leur **seuil de déclenchement de la mort par apoptose**, leur capacité à se **diviser**, à **migrer** ou à **dégrader les matrices extracellulaires**, tous ces composés permettent de contenir, dans une certaine mesure, le développement tumoral et limitent la **dissémination métastatique**.

La dissémination métastatique est un processus complexe, multi-étapes, au cours duquel les cellules cancéreuses initialement restreintes à un organe primaire vont pouvoir quitter cette tumeur, entrer dans la circulation (sanguine et lymphatique), puis en ressortir, avant de coloniser des organes secondaires. Au sein de la tumeur primaire, toutes les cellules ne sont pas capables de métastaser : seules les plus « instables génétiquement », pourront accumuler les mutations nécessaires à l'exécution de la Transition-Epithélio-Mésenchymateuse (TEM), un mécanisme permettant la perte d'adhésion des cellules ainsi que leur colonisation de la matrice extracellulaire^{223,224}. La présence de métastase(s) est un des critères caractérisant les stades cancéreux avancés, leur étendue aux ganglions lymphatiques et aux autres organes définissant la classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) des cancers²²⁵. Par ailleurs, ces métastases peuvent être déjà présentes lors du diagnostic, avant même la mise en place de toute procédure thérapeutique ou bien se développer en dépit de celle-ci, faisant alors partie des mécanismes d'échappement tumoral résultant de la chimiorésistance.

Il existe une multitude de mécanismes de chimiorésistance : parmi ceux-ci, un des plus courants consiste en une **réduction de la concentration** de l'agent de chimiothérapie pénétrant le cytoplasme de la cellule, le composé étant alors évacué par des canaux appelés « **pompes à efflux** »²²⁶. Il existe toutefois bien d'autres mécanismes, parmi lesquels on peut citer l'altération du **seuil de déclenchement de l'apoptose**, l'augmentation du potentiel de **prolifération cellulaire**, la perte de **contrôle des phases du cycle cellulaire**, la facilitation de la **réparation des dommages à l'ADN** ou de la **TEM**.

Quoi qu'il en soit, ces mécanismes peuvent avoir deux origines différentes : on distingue ainsi les **résistances intrinsèques** (1), des **extrinsèques** (acquises) (2). Les premières sont dues aux mutations génétiques de certaines cellules cancéreuses

indépendamment de la présence de l'agent de chimiothérapie, alors que les **résistances acquises (2)** sont, quant à elles, dues à une ou des **adaptation(s)** de certaines cellules tumorales, au stress occasionné par le traitement²²⁷. Par sélection darwinienne, les cellules les mieux à même de survivre au traitement grâce aux **mutations acquises**, subsistent alors en majorité dans la tumeur et peuvent, le cas échéant, être à l'origine de **métastases**.

La **poly-chimiothérapie**, employant plusieurs composés en même temps, est souvent une stratégie permettant de s'affranchir de ces mécanismes de résistance, au moins dans un premier temps. L'intérêt de cette stratégie réside dans la multiplicité des mécanismes d'action du cocktail des drogues employées, « obligeant » les cellules cancéreuses **potentiellement résistantes** à développer des mutations agissant sur des **voies de signalisation cellulaire redondantes**.
II.1.2. Implication des miARNs dans la dissémination métastatique et la chimiorésistance :

<u>Article 3 : « Implication des miARNs dans la chimiorésistance et la dissémination</u> <u>métastatique des tumeurs associées à l'os» :</u>

Chapter 15: « MicroRNA implication in therapeutic resistance and metastatic dissemination of bone-associated tumors» p.163-176

Bone Cancer, Primary Bone Cancers and Bone Metastases, second edition, edited by Dominique Heymann, Academic Press, 2014.

Rodriguez Lidia, Jacques Camille, Ory Benjamin.

Les dernières avancées de la Recherche dans le domaine de l'épigénétique attestent du **rôle des miARNs** dans le développement des mécanismes de **chimiorésistance innés** comme **acquis**, ainsi que dans les différentes étapes du **processus métastatique**. En effet, les agents de chimiothérapie agissant sur des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la survie cellulaire, de la prolifération, du cycle cellulaire, de l'apoptose ou de la réparation de l'ADN (des voies justement modulées par les miARNs), leur **dérégulation** est un moyen très souvent employé par les cellules cancéreuses pour contrecarrer les effets de tels traitements. La **surexpression** de **miARNs oncogènes** ou bien la **sous-expression** de ceux aux effets **suppresseurs de tumeurs** peuvent ainsi initier de tels mécanismes.

Par ailleurs, les miARNs étant des molécules particulièrement **stables** dans les fluides corporels, peu enclins à être dégradés par les ribonucléases circulantes et supportant des conditions physico-chimiques sévères, leur utilisation comme **marqueurs prédictifs** de la **réponse à la chimiothérapie** et/ou **pronostics** de l'**évolution** de la maladie vers des **stades métastatiques**, a largement été envisagée.

Le rôle de ces petits médiateurs épigénétiques dans la mise en place des processus de **chimiorésistance** et de **développement métastatique** a ainsi été abondamment documenté dans de nombreux cancers, dont ceux du **sein** et de la **prostate**. Par ailleurs, la **dissémination métastatique** de ces cancers affectant en premier lieu l'os, il n'est pas exclu que les mécanismes par lesquels les miARNs régulent ces processus d'échappement soient transposables dans les Sarcomes Osseux²²⁸. Dans un tel contexte, l'<u>Article 3</u> est ici présenté comme introduction à la <u>PARTIE II</u> de cette thèse.

II.1.3. Article 3 : « Chapter 15 : « MicroRNA implication in therapeutic resistance and metastatic dissemination of bone-associated tumors » Bone Cancer, Primary Bone Cancers and Bone Metastases, second edition, edited by Dominique Heymann, Academic Press, 2014. (p.163-176)

Rodriguez Lidia, Jacques Camille, Ory Benjamin.

15

MicroRNA implication in therapeutic resistance and metastatic dissemination of bone-associated tumors

Lidia Rodrigue $\overline{z^{1,2}}$, Camille Jacques^{1,2}, Benjamin Ory^{1,2}

¹INSERM, UMR-S 957, Nantes, France

²Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Nantes, France

INTRODUCTION

Breast cancer and prostate cancer are the most frequently diagnosed cancers of women and men respectively living in developed countries with more than one million new cases per year worldwide¹.

Despite progress made in the development of new treatments, mortality of cancer patients is still highly linked to the occurrence of distant metastasis. More than 70% of breast and prostate cancer patients present bone metastasis in their advanced diseases. Lung, colon, bladder or kidney cancers, if less frequently, are also found to metastasize to bones².

In addition, around 2000 new cases of primary bone cancers are being diagnosed within Europe every year (osteosarcoma being the most frequent bone cancer type), lung and bones being the preferential metastasis location of these primary bone cancers.

All these data show that the skeleton is one of the most common organs affected by metastasis. The high density of fenestrated capillaries³ present in the bone marrow, as well as the high concentration of growth factors released as a consequence of the constant remodeling⁴ undergone, make bones an easy-to-reach location that provides a fertile soil for tumor cells⁵.

MicroRNAs AND METASTASIS

Two processes are involved in bone remodeling: bone formation (by osteoblasts) and bone resorption (by osteoclasts). In normal adult bones these events are carefully balanced to ensure no net gain or loss of bone mass (new bone formation occurring at the site of previous bone resorption). Any factor disturbing this equilibrium can induce a pathological bone structure⁶⁷.

Primary tumor cells need to undergo the metastatic process in order to be able to reach bones and to establish there as bone metastasis. This process depends on both the intrinsic properties of tumor cells and the responses from the host⁵.

Primary tumors are composed of a heterogeneous cell population with different abilities that proliferate at primary sites. When the tumor mass reaches a significant size, tumor cells start to secrete angiogenic factors in order to establish a capillary network that ensures the necessary nutrients for the tumor survival. Meanwhile, thanks to the heterogeneity of the primary tumor population, the most genetically unstable cells⁵ (also known as cancer stem cells⁸) will accumulate the required mutations to develop the capability to undergo epithelial–mesenchymal transition (EMT), thereby invading the host stroma and detaching from the primary tumor sites to enter the circulation⁹. All these events are highly inefficient due to the normal protective host surveillance mechanisms. For instance, a high number of circulating tumor cells will be eliminated during their transportation through the systemic circulation¹⁰. Among the surviving ones, only a few will finally become trapped in distant capillaries, and through adhesion to vascular endothelial cells, they will undergo extravasation towards the bone marrow¹¹. Those first established tumor cells can enter in a dormant state before receiving the appropriate signals from the bone microenvironment that allow them to proliferate and develop as actual metastasis^{12,13}.

Two types of metastasis can be formed at bony sites. They both act to disturb the normal osteoblast-osteoclast balance that prevails in healthy bones, but by different mechanisms, leading to two pathological situations: (1) osteoblastic metastasis stimulate the osteoblastic population over the osteoclastic one, so enhancing new bone formation and (2) osteolytic metastasis where the osteoclasts are predominant and elevated bone destruction is the clinical outcome^{7,11}.

Even though this is the most accepted classification, in most cases patients present mixed phenotypes in their bone metastasis. Usually breast and prostate cancers are known to develop osteoclastic and osteoblastic metastasis respectively. However, histological and biochemical studies revealed the presence of elevated bone resorption within apparently osteoblastic lesions, meaning that osteolysis is associated with all malignant bone lesions, regardless of their radiographic appearance⁴.

Osteolytic metastasis are caused by the establishment of a "vicious cycle" between tumor cells and bone cells. When breast cancer cells and others reach the bone microenvironment they overproduce parathyroid hormone-related peptide (PTHrP), which stimulates the number and activity of osteoclasts, leading to bone resorption. In response, resorbed bone releases some factors such as TGF- β and IGF-1, which enhance tumor cell proliferation, which in turn will release more PTHrP causing even more resorption, thus producing lytic lesions.

The molecular mechanism of the establishment of osteoblastic metastasis has not been fully elucidated. Some evidence indicates that a positive reciprocal relationship could be established between cancer prostate cells and osteoblasts through the production of common growth factors¹⁴. At the bone site, prostate tumor cells and others could release growth factors that support osteoblast proliferation and differentiation (e.g. BMPs, TGF- β , PDGF, VEGF), promoting new bone matrix deposition. In turn, osteoblasts express RANK ligand (an osteoclast activator) causing osteolytic lesions, but also factors that stimulate prostate cancer cell proliferation¹⁵.

Such skeletal lesions profoundly impair the patient's quality of life by causing bone pain, fractures, spinal cord compression, loss of mobility, and metabolic complications as hypercalcemia¹⁶.

All current existing treatments are mainly based on the improvement of the patient's quality of life through the prevention of skeletal complications. First of all, radiotherapy and radiopharmaceuticals are nowadays used for localized bone pain palliation. Moreover, bisphosphonates (BPs) are widely used to prevent skeletal morbidity in both primary bone tumors and secondary metastasis. However, the anti-tumoral effects of bisphosphonates and their efficacy on patients are still controversial¹⁷: some studies have shown that zoledronic acid, pamidronate, and other BPs reduced skeletal complications and improved bone pain in breast cancer patients with bone metastasis, whereas only transient pain relief was achieved in prostate cancer patients¹⁸. The combination of BPs with standard chemotherapeutic agents could induce a synergistic apoptotic effect on tumor cells, resulting in a new therapeutic frontline to explore in order to find more effective treatments suitable for patients suffering from bone primary tumors and bone metastasis¹⁷.

Despite all efforts, new diagnostic tools need to be developed for the detection of malignancies at their very early stages in order to both avoid further metastatic dissemination and to perform better predictions in the patients' outcome. First of all, complete understanding of the metastatic dissemination process is mandatory for the design of more effective and adapted therapeutic modalities. Recent evidence describes microRNAs as novel promising molecules which potentially will shed some light to those matters.

MicroRNAs (miRs or miRNAs) are small, 18- to 24-nucleotide non-coding RNAs that regulate gene expression by targeting the 3' untranslated region (UTR) of mRNAs, resulting in either mRNA cleavage or protein translation repression. MicroRNAs are transcribed in the nucleus as long hairpin chains (pri-microRNAs) that are cleaved by Drosha, giving rise to precursors (pre-microRNAs) that will be exported towards the cytoplasm for further maturation. The enzyme Dicer will then excise this single hairpin chain into a duplex, where one of the chains (the mature microRNA) will be incorporated into an effector complex called RNA-induced silencing complex (RISC), whereas the other will be eliminated¹⁹.

Since the discovery of the first miRNAs major players in *Caenorhabditis elegans* development²⁰, hundreds of miRNAs have been identified in many other species, including *Homo sapiens*²¹, as important players in cell regulation. They are not only responsible for regulating natural processes such as proliferation, differentiation, development, or apoptosis, but they have also been found to be of critical importance in tumorogenesis.^{22,23} Altered expression of miRNAs is often found in cancer. Those alterations modulate malignant diseases towards more or less aggressive phenotypes, giving rise to two groups²⁴: (1) oncogene miRNAs, which are usually overexpressed in tumor cells, and promote cancer development through downregulation of tumor suppressor genes; and (2) oncosuppressor miRNAs, which function inversely as oncogenes inhibitors while being underexpressed in tumor cells,

thereby also leading to cancer development²⁵. Hence, restoring miR expression levels towards the non-pathological tissue of origin level is an interesting approach to combat malignancies.

MicroRNAs have also been shown to play an important role in treatment resistance and relapse.⁸ The alteration of the expression of certain miRNAs in "cancer stem cells" located within the heterogeneous primary tumor bulk could be one of the reasons why they become resistant to treatment. Development of metastasis resistant to conventional therapies is the main cause of cancer deaths nowadays⁵. Fifty percent of breast cancer patients²⁶ and 33% of prostate cancer patients²⁷ develop multidrug resistance, becoming insensitive to standard treatments. Moreover, one-third of patients with localized osteosarcoma experience recurrent or progressive disease²⁸. Understanding and finding targets to eliminate resistant cells is a real challenge for researchers working in the cancer field.

Clinical variables such as cancer origin, stage of progression and many others influence the miRNA expression profile.²⁹ Identification of altered miRNA expression in tumor cells is a powerful tool to better understand malignant evolution. Furthermore, the identification of pathways that regulate those miRNAs as well as the downstream genes that they modulate will reveal some attractive targets for therapeutic intervention. The role of miRNAs as diagnostic, prognostic, and treatment predictive biomarkers is thus very promising³⁰. The determination beforehand of patient groups likely to experience resistance, metastasis and/or relapse with the concomitant design and adaption of accurate and effective treatments should lead to increased survival rates among cancer patients³¹.

MicroRNAs can be involved at any level of the metastatic dissemination process: from the early origin and development of primary tumors until set-up and proliferation at distant sites. Since a single miRNA can regulate numerous targets; they can be easily found regulating several signaling cascades at the same time. Here we show some examples of miRNAs involved in different steps of the metastatic dissemination (Figure 15.1).

MiR-21

MiR-21 is the oncogenic miRNA most commonly overexpressed among many solid tumors with different origins (breast, colon, lung, pancreas, prostate, stomach, and bone)^{32,33}. There is evidence to show that miR-21 has a role in cell transformation and tumor growth, but also in invasion and metastasis through direct targeting of different tumor suppressor genes operating at distinct steps of tumor progression³⁴.

Initial studies in breast cancer MCF-7 cells showed a decrease in cell proliferation when artificially expressing miR-21's antagonist (anti-miR 21) both *in vitro* and *in vivo*³⁵. To elucidate the molecular insights, miR-21 was firstly suggested to target the tumor suppressor tropomyosin 1 (TPM1), an actin-binding protein that inhibits anchorage-independent growth. The low TPM1 levels found in breast cancer could explain the origin of cell transformation³⁶. Furthermore, miR-21 was demonstrated to be a direct target of some other suppressor genes: programmed cell death 4 (PDCD4) and maspin (SERPINB5). Both proteins are able to interact with the urokinase-type plasminogen activator (uPA), stimulating the internalization of the uPA/uPAR complex for further reinforcement of focal adhesion contacts, and thereby reducing cell invasion and metastasis^{37,38}. Moreover, maspin expression was shown to decrease tumor growth, osteolysis, and angiogenesis in a bone metastatic model of prostate cancer³⁹, where miR-21 is usually overexpressed.

Other models were used to reveal some other direct miR-21 targets with major importance in the metastatic cascade: RECK, TIMP3, and PTEN. RECK and TIMP3 are two metalloproteinase (MMP) inhibitors that promote invasive phenotypes when downregulated by miR-21. For instance, RECK downregulation was found to be an important migration and invasion player in osteosarcoma models (where miR-21 is overexpressed)⁴⁰ and TIMP3 was also shown to induce apoptosis through caspase activation in a human glioma model⁴¹. Loss of the tumor suppressor PTEN, on the other hand, leads to increased activity of AKT and the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase pathways, both promoters of cell survival and proliferation. Activation of focal adhesion kinase 1 (FAK1) and its downstream effectors MMP-2 and MMP-9, was also observed in hepatocellular and breast cancers⁴².

MiR-17-92

MiR-17-92 is a cluster of miRNAs (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b-1, and miR-92-1) transcribed from the same locus that have a synergic effect in regulation of cell proliferation and apoptosis, acting at different levels of the cascade.

C-Myc is a proto-oncogene, commonly dysregulated in human malignancies, which regulates cell proliferation, growth and apoptosis. It encodes for a transcription factor that induces the expression of the miR-17-92 cluster. In turn, miR-17-92 inhibits E2F1, a transcription factor that positively regulates the expression of C-Myc. Thanks to this regulation loop, mir-17-92 tightly regulates c-Myc-mediated cellular proliferation, enhancing cell proliferation and



FIGURE 15.1 MicroRNAs implicated in the metastatic dissemination. Multiple miRNAs could regulate metastasis dissemination process at various levels including tumor cell proliferation, apoptosis, migration, invasion and adhesion. They can also interfere with some extracellular processes such as ECM modification, chemotaxis, angiogenesis and the epithelial to mesenchymal transition.

inhibiting apoptosis⁴³. MiR-17-92 cluster is up-regulated in osteosarcoma, suggesting that this mechanism could be responsible for the development of the pathology⁴⁴.

MiR-17-92 is able to maintain this phenotype through the repression of several key players of the pathway: (1) targeting p21 for further activation of CyclinD1/CDK4 complex and releasing of E2F inhibition, (2) inhibition of BCL2-like 11 (BIM) and PTEN that will increase the levels of anti-apoptotic BCL-2, balancing the pathway towards the proliferative phenotype⁴⁵.

Let-7

Let-7 is a tumor suppressor miRNA belonging to the let-7 miRNA family that is often downregulated in lung and breast cancers. It was proposed as one of the miRNAs with altered expression in cancer stem cells; the cells with pluripotent differentiation and self-renewal properties that coexist with others in the bulk tumor mass. High levels of let-7 correlated with higher differentiation through the targeting of HMGA2 and RAS, both well-known effectors in the MAPK pathway. Introduction of let-7 in cancer stem cells reduced their proliferation capacity, ability to form mammospheres and their metastatic potential in an *in vivo* breast cancer model. Low levels of let-7 are thus crucial to maintain undifferentiated cell status and to enhance clonal expansion and tumorogenicity⁴⁶.

The complete pathway might be regulated by the metastatic suppressor Raf kinase inhibitory protein (RKIP). While not affecting the primary tumor growth, this protein was shown to decrease both vascular invasion and lung metastasis development in an *in vivo* prostate cancer model⁴⁷.

Mechanistically, as an inhibitor of the MAPK pathway, RIPK decreases the transcription of LIN 28 by Myc. Suppression of LIN28 enables enhanced let-7 processing that in turn will repress HMGA2, suppressing bone metastasis *in vivo*. Through a miR-dependent signaling cascade MAPK/Myc/LIN28/let-7/Snail, RKIP inhibits invasion by metastatic breast cancer cells, thereby repressing breast tumor cell intravasation and bone metastasis apparition *in vivo*⁴⁸.

Neoangiogenesis is a crucial step that allows cells to reach and disseminate through the systemic circulation. MiR-NAs involved in angiogenesis are frequently found to undergo tissue-specific regulation that leads to overall endothelial recruitment and blood vessel formation as a result of the synergistic regulation of both endothelial and tumor cells.

MiR-221 and miR-222

MicroRNA profiling using an endothelial cell model showed that miR-221 and MiR-222 target the c-kit oncogene⁴⁹. Upon activation by stem cell factor (SCF), c-kit promotes the recruitment of endothelial progenitor cells. Loss of miR-221 and miR-222 in endothelial cells therefore enhances new blood vessel formation⁵⁰.

In contrast, miR-221 and miR-222 are overexpressed in many malignancies (colon, pancreas, and prostate cancers)³². Through direct targeting of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}, miR-221 and miR-222 are responsible for tumor cells enhancing their anchorage-independent growth as well as the proliferative and migratory potentials^{25,51}. This is demonstrated by results obtained from knocking-down miR-221 and miR-222 in PC3 prostate cancer cells: increased expression of p27^{Kip1} with a concomitant reduction colony formation in soft agar^{24,43}.

MiR-126

MiR-126 is usually downregulated in tumor cells promoting endothelial recruitment through the repression of several targets: insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2), phosphatidylinositol transfer protein (PITPNC1), and c-Mer tyrosine-kinase (MERTK). IGFBP2 and PITPNC1 are both involved in the binding of IGF1, facilitating their further binding to IGF1 receptor on endothelial cells and resulting in enhanced endothelial migration towards metastatic cells. MERTK is cleaved from metastatic cells promoting endothelial recruitment through competition with its ligand GAS6 for endothelial MERTK receptors.

MiR-126 is highly expressed in the endothelium of proliferating tissues, as occurs in tumors. MiR-126 directly targets some repressors of the VEGF pathway (Sprouty-related protein, SPRED1, and phosphoinositol-3 kinase regulatory subunit 2, PIK3R2), activating the PI3K-Akt and RAF-1-ERK metastatic pathways.

This tightly regulated network has been demonstrated by higher metastatic colonization at distant organs (lung, bone, brain, and liver) observed in miR-126 knockdown MDA-231 breast cancer *in vivo* model compared with control cells. The higher number of nodules was more pronounced in small nodule sizes, as a result of an increase on the initiation of metastasis rather than an increase in growth of established ones. Moreover, miR-126 knockdown metastasis of the lungs showed higher vessel densities⁵².

MiR-126 is not only implicated in angiogenesis, but it also acts, in synergy with miR-335, in extracellular matrix (ECM) remodeling and migration potential of tumor cells. MiR-335 has also been shown to be downregulated in several malignancies such as breast cancer or osteosarcoma⁵³. Mechanistically, both miRs target SOX4, a transcription factor that regulates migration, and tenascin C (TnC), a glycoprotein that reduces cell-ECM interactions. Hence, restoring the expression of miR-126 and miR-335 in human MDA-MB-231/LM2 cells was shown to suppress lung and bone metastasis formation *in vivo* and migration *in vitro*^{25,54}.

Epithelial–mesenchymal transition (EMT) is a reversible process where epithelial cells lose cell-cell contacts and acquire mesenchymal characteristics: spindled-shape morphology and enhanced migratory potential⁵⁵.

MiR-200 family

Through miRNA profiling of EMT undergoing cells, all five members of the miR-200 family (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 and miR-429) and miR-205 were identified as being significantly downregulated. These miRNAs cooperatively maintain the epithelial phenotype through direct targeting of ZEB1 and ZEB2, two important transcription factors that repress E-cadherin and other polarity factor genes^{56,57}. Furthermore, miR-141 is also able to maintain the epithelial phenotype by direct inhibition of the EMT inducer TGF β 2. Cell stimulation with TGF β provokes upregulation of ZEB proteins, leading to mesenchymal phenotype switch, which is sustained by the miR-mediated forward loop created by ZEB1 (repressing miR-141 and miR-200c)⁵⁸.

This process is reversible and could be of major importance for tumors undergoing EMT at early stages of tumorogenesis and escaping from primary sites, then requiring to convert back to an epithelial phenotype (MET) in order to form metastasis at distant organs⁹. This was demonstrated by a study performed in breast and colon cancer models: the ectopic expression of miR-200 family not only gave the expected inverse correlation of ZEB1 and ZEB2 expression, but also permitted the epithelial phenotype to be re-established⁵⁹.

MiR-155

MiR-155 is usually overexpressed in some solid tumors (lung, colon, breast, and ovary) as well as leukemias and lymphomas³². MiR-155 also plays an important role in TGF β -induced EMT through RhoA targeting, a member of the GTPase family which regulates cell adhesion, motility and polarity as well as cell junction formation and stability. MiR-155 acts as a downstream effector in the TGF β /Smads pathway, which interferes with cell tight junctions triggering migration and invasion through inhibition of RhoA. This is supported by the observation of the direct correlation found between miR-155 expression levels and the invasive degree of breast carcinomas⁶⁰.

MicroRNAs AND CHEMORESISTANCE

Among all the cancer treatments available, chemotherapy alone or in association with radiotherapy or surgical resection is currently one of the most commonly used. In the last decades, a wide panel of chemotherapeutic drugs has been developed to improve the survival rate of patients with cancer, and some new ones are still in development today. Cisplatin, ifosfamide and methotrexate are the three main agents used in the treatment of osteosarcoma⁶¹, whereas anthracyclins, taxanes (paclitaxel and docetaxel) and endocrine therapy molecules such as tamoxifen are rather administered in a breast and prostate cancer context. Both compounds act by limiting rapid tumor cell growth and allow control over disseminated disease. Used as adjuvant therapy, they are aimed at limiting residual cancerous lesions after surgery and, as a consequence, disease recurrence. In neo-adjuvant use, their goal is to reduce the tumor burden in order to facilitate surgical resection. However, despite recent advances in the field of therapeutic protocol optimization and personalization, chemoresistance is one of the major obstacles hampering a good clinical outcome. There are two main origins of drug treatment failure: intrinsic resistance, due to the inherent early genetic mutations of a subpopulation of heterogeneous cancer cells independently of the drug's presence, and acquired resistance, which is subsequent to treatment. The introduction of multi-agent chemotherapy is often sufficient to counter intrinsic resistance, but it is reported that acquired resistance is responsible for more than 90% of advanced cancer relapses⁶². Evidence of miRNAs-mediated drug-resistance in both intrinsic and acquired mechanisms is accumulating. Numerous studies have underlined the importance of miRNAs as essential regulators of various normal cellular processes, including proliferation⁶³, cell cycle control, apoptosis, or DNA repair in several cell types. As such pathways are specifically hampered by chemotherapeutic agents, deregulation of miRNAs may be used by cancer cells to bypass drug effects. Overexpression of oncogenic miRNAs or loss of function of tumor suppressor miRNAs is not without consequences and can result in chemoresistance, leading to poor clinical outcome and therapeutic failure (Figure 15.2, Table 15.1). The aim of this section is to provide an overview of recent findings that reveal the implication of miRNAs in the chemoresistance mechanisms related to osteosarcoma, breast, and prostate cancers. Here, we provide a systematic discussion of several mechanisms regulated by miRNAs that account for the drug-resistant phenotype of osteosarcoma, breast and prostate, cancer cells by classifying them as (1) alterations in the intracellular drug concentration mediated by efflux pumps, (2) reduced apoptosis, (3) alterations of the cell cycle and the proliferative potential, (4) a facilitated epithelial-to-mesenchymal transition process, or (5) increased repair of DNA damage. Furthermore, miRNAs are relatively stable in body fluids, poorly degraded by circulating ribonucleases, and able to survive severe physicochemical conditions. Therefore, in a clinical extent, we also present the use of miRNAs as relevant predictive biomarkers of the chemotherapeutic drugs response in the context of these pathologies.

MicroRNAs and efflux pumps

Reduced intracellular accumulation of chemotherapeutic drugs is characterized by the so-called multidrug resistance (MDR) phenotype, in which an energy-dependent mechanism allows non-selective efflux of drugs out of the cells through ATPases of the ATP-binding cassette (ABC) family. Bao and coworkers report that the loss of expression of miR-298 was responsible for doxorubicin resistance in the MDA-MB-231 breast cancer cell line⁶⁴. The targeting of the nuclear ABC transporter family P-glycoprotein (P-gp) was demonstrated, resulting in a cytoplasmic localization of the drug, unable to reach the nucleus and to mediate its alkylating functions. In the same way, another group also



FIGURE 15.2 MicroRNAs implicated in chemoresistance mechanisms. Multiple miRNAs could regulate the chemoresistance process through interfering with the major pathways responsible for variations in drug sensitivity, for example efflux pumps, DNA damage response, cell cycle control, apoptosis and EMT process.

found that a high level of P-gp in the MCF-7 cell line is associated with a low level of miR-451, contributing to the resistance to the same agent⁶⁵. It was also reported that miR-328 targets the 3'UTR of the transporter gene ABCG2 to reduce its protein expression⁶⁶. ABCG2 mRNA expression is indeed 30-fold higher in the resistant MCF-7/MX100 cell line than in the normal MCF-7 cell line, and miR-328 transfection in those cells dramatically reduces the mitox-antrone IC₅₀ value, increasing the sensitivity to this drug. In addition, To and colleagues reported shortening of the ABCG2 3'UTR of ABCG2-overexpressing mitoxantrone-resistant MCF-7 cells compared with the parental sensitive cell line⁶⁷. This shortened 3'UTR removes the miR-519c binding site on the ABCG2 mRNA, partly explaining the overexpression of this transporter responsible for the drug resistance of such cells. On the other hand, miR-519c and miR-520h were previously reported to target ABCG2 3'UTR, and it has also been shown that when both are inhibited by synthetic inhibitors, the mitoxantrone IC₅₀ of parental sensitive MCF-7 cells was increased.

MicroRNAs and apoptotic pathways

MicroRNAs can also regulate mediators directly implicated in the apoptotic process, leading to cancer drug resistance. For example, miR-125b confers paclitaxel resistance through the suppression of the pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) in breast cancer cell lines MDA-MB-431, MDA-MB-231 and BT474⁶⁸. In a similar way, miR-21 was identified as one of the most upregulated miRNAs in a docetaxel resistant prostate cancer cell line PC3R compared with PC3wt cells⁶⁹. Programmed cell death protein 4 (PDCD4) was identified as a direct target gene of miR-21 and is responsible for the chemoresistance mechanism of this cytotoxic antimicrotubules agent. In DU145 prostate cancer cell line, phosphatase and tensin homolog (PTEN) was also identified as a miR-21 target, conferring to this miRNA another target allowing cells to escape apoptosis⁷⁰. A similar approach has been taken by Bhatnagar and coworkers, who found that miR-205 was downregulated in the highly resistant WPE1-NB26 prostate cancer cell line compared with WPE1-NA22⁷¹. The downregulation of this miRNA induces chemoresistance to cisplatin and docetaxel because of the anti-apoptotic function of Bcl-w, its principal target. The CpG of the miR-205 promoter were found to be methylated in several advanced cancer cells and a 5-aza-2'-deoxycytidine treatment restores the cisplatin sensitivity. Kojima and colleagues found that the expression level of miR-34a was decreased in the PC3PR paclitaxel-resistant

	MiR	Regulation	Target	Model	Biological consequence	Reference
Efflux pumps	miR-298	Downreg	P-gp	Breast	Doxorubicin	64
	miR-451	Downreg	P-gp	Breast	Doxorubicin	65
	miR-328	Downreg	ABCG2	Breast	Mitoxantrone	66
	miR-519c	Downreg	ABCG2	Breast	Mitoxantrone	67
	miR-520h	Downreg	ABCG2	Breast	Mitoxantrone	67
Apoptotic pathway	miR-125b	Upreg	Bak1	Breast	Paclitaxel	68
	miR-21	Upreg	PDCD4	Prostate	Docetaxel	69
	miR-205	Downreg	Bcl-w	Prostate	Cisplatin, docetaxel	71
	miR-34a	Downreg	Bcl-2	Prostate	Paclitaxel, docetaxel, etopo- side, daunorubicin	72
	miR-34a	Downreg	SIRT1	Prostate	Paclitaxel, docetaxel, etopo- side, daunorubicin	72
	miR-34a	Downreg	_	Osteosarcoma	-	74
	miR-34 family	Downreg	-	Osteosarcoma	_	73
	miR-663	Upreg	HSPG2	Breast	Cyclophosphamide, doc- etaxel, doxorubicin	75
Cell cycle control/ proliferation	miR-31	Downreg	E2F6	Prostate	Cisplatin, docetaxel	71
	miR-140	Upreg	HDAC4	Osteosarcoma	Methotrexate, 5-fluorouracil	76
	miR-215	Upreg	DTL	Osteosarcoma	Methotrexate, tomudex	77
	miR-221	Upreg	$p27^{kip1}$	Breast	Tamoxifen	78
	miR-221	Upreg	PTEN	Osteosarcoma	Cisplatin	79
	miR-222	Upreg	$p27^{kip1}$	Breast	Tamoxifen	78
	miR-21	Upreg	PTEN	Prostate	/	70
	miR-148a	Downreg	MSK1	Prostate	Paclitaxel	80
Epithelial-to- mesenchymal transition	miR-30c	Downreg	TWF1	Breast	Paclitaxel, doxorubicin	82
	miR-375	Downreg	MTDH	Breast	Tamoxifen	83
	miR-200c	Downreg	TrkB	Breast	Doxorubicin	86
	miR-200c	Downreg	Bmi1	Breast	Doxorubicin	86
	/	Upreg	Bmi1	Osteosarcoma	Cisplatin	87
	/	Upreg	Bmi1	Prostate	Docetaxel	88
DNA repair systems	miR-21	Upreg	MSH2	Breast	Cisplatin, doxorubicin	89
	miR-138	Downreg	H2AX	Osteosarcoma	Cisplatin, camptothecin	90
	miR-16	Downreg	Wip1	Breast	Doxorubicin	91

 TABLE 15.1
 MicroRNAs implicated in chemoresistance mechanisms

prostate cancer cell line compared with normal hormone-refractory PC3 cell line⁷². In addition, such cells were also found to be resistant to docetaxel, daunorubicin, and etoposide and ectopic supply of this miRNA was found to sensitize cells to those drugs. This is due to the direct miRNA regulation of the anti-apoptotic factor Bcl-2 and the NAD⁺-dependent histone deacetylase Silent Information Regulator 1 (SIRT1), as well as an indirect regulation of those genes through the miRNA modulation of the HuR RNA-binding protein. Interestingly, it was also found that the expression level of the miR-34 family was decreased in human osteosarcoma tumor samples, in part through genetic and

epigenetic alterations⁷³. Yan and coworkers also support the tumor suppressor role of miR-34a in this same model, as its overexpression inhibits cell proliferation and metastasis both *in vitro* and *in vivo*⁷⁴. It has recently been shown that the induced multiple-drug-resistant cell line MDA-MB-231/adriamycin (ADM) harbors a 7.26-fold increase in miR-663 expression level compared with its MDA-MB-231 parental cell line, in accordance with the methylation status of the CpG islands of this miRNA promoter⁷⁵. The authors have shown that this high miRNA expression level is closely related to chemoresistance to both cyclophosphamide and docetaxel through the anti-apoptotic pathway. Indeed, as heparin sulfate proteoglycan 2 (HSPG2) was demonstrated to be a direct target of miR-663, overexpression of this miRNA followed by an adriamycin treatment downregulates several pro-apoptotic mediators including Bad, HTRA, IGFBP2, and p27. In addition, a high miR-663 level in breast cancer tissue samples is associated with chemoresistance and poor patient survival.

MicroRNAs, cell cycle control and proliferation

MiR-140 was found to be overexpressed in osteosarcoma tumor xenografts treated with cisplatin, doxorubicin, or ifosfamide, thereby suggesting its implication in the chemoresistance of an important panel of drugs⁷⁶. Indeed, an ectopic supply of this miRNA induces a limited proliferative potential leading to methotrexate and 5-fluorouracil resistance in cell lines containing wild type p53. The supply of miR-140 leads to the induction of p53 and p21 in U2OS p53wt osteosarcoma cells followed by cell cycle arrest in G1 and G2 phases, probably due to the histone deacetylase 4 (HDAC4) miRNA target. In addition, CD133^{+hi}CD44^{+hi} "cancer-stem-like" cells also harbor high miR-140 expression probably causing their slow proliferative rate and allowing them to avoid damage caused by chemotherapy. The same group also demonstrates that miR-215 induces decreased cell proliferation through a G2arrest due to its inhibition of denticleless protein homolog (DTL), a cell cycle G2/M checkpoint regulatory protein⁷⁷. Downregulation of DTL consequently induces both p53 and p21, conferring on those cells resistance to the cellcycle dependant drugs methotrexate and tomudex. Instead of limiting the proliferative potential of cancer cells, miRNAs can also improve it, balancing the apoptosis induced by the chemotherapeutic agents and contributing in chemoresistance. A microarray analysis revealed that two miRNAs were implicated in tamoxifen chemoresistance, another drug currently used in the adjuvant therapy of estrogen receptor-positive (ER) breast cancer. Among the eight most overexpressed miRNAs in a tamoxifen-resistant OHT^R cell line compared with the tamoxifen-sensitive MCF-7 cell line, miR-221 and miR-222 were also found to be overexpressed in HER2/neu-positive primary human breast cancer samples⁷⁸. Overexpression of both miRNAs in MCF-7 cells induces tamoxifen resistance through a reduced level of apoptotic cell death. The cell cycle inhibitor p27kip1 was identified as an important target of these microRNAs, thereby facilitating the proliferative potential of tamoxifen-resistant cells. MiR-221 has also been shown to be overexpressed in human osteosarcoma cell lines and human osteosarcoma samples compared to normal osteoblasts⁷⁹. An inverse correlation was found between this miRNA and PTEN, which was demonstrated to be one of its targets. Upregulation of miR-221 in human SOSP-9607 and MG-63 cell lines increases their proliferative potential and their cisplatin resistance through subsequent activation of the PI3K/Akt pathway. Other miRNAs, such as miR-148a, were recently reported to be downregulated and to act as tumor suppressors in hormone-refractory prostate cancer cells by directly targeting mitogen- and stress-activated protein kinase (MSK1)⁸⁰. The authors have shown that knockdown of MSK1 as well as miR-148a overexpression reduced paclitaxel-resistance of the resistantinduced PC3PR cell line. Bhatnagar and coworkers also found that miR-31 was downregulated in the resistant WPE1-NB26 prostate cancer cell line compared with the WPE1-NA22⁷¹. The transcriptionfactor E2F6, well-known to be a transcription-inducer of genes implicated in cellcycle entry, was found by these authors to be a major target of this miRNA, inducing chemoresistance to cisplatin and docetaxel.

MicroRNAs and EMT

In addition to promoting epithelial cancer cell invasion and consecutive metastatic dissemination, EMT has often been reported to promote chemoresistance and miRNAs can also regulate pivotal mediators implicated in this process. A Cox proportional hazard model reveals that high miR-30c expression significantly correlates with longer progression-free survival after tamoxifen treatment in (ER)-positive breast cancer patients⁸¹. Ectopic overexpression of this miRNA in chemoresistant MDA-MB-231 and BT-20 breast cancer cell lines sensitize them to paclitaxel and doxorubicin *in vitro* and to doxorubicin in an *in vivo* mice model⁸². The cytoskeleton gene twinfilin 1 (TWF1), involved in diverse morphological and motile processes, was confirmed to be one of this miR's targets. By modulating TWF1 expression, miR-30c also contributes to indirect repression of interleukin-11, a cytokine implicated in EMT, which is a poor prognosis marker in three independent breast tumor sets. In a breast cancer cell line MCF-7 resistant to tamoxifen

172 15. MICTORNA IMPLICATION IN THERAPEUTIC RESISTANCE AND METASTATIC DISSEMINATION OF BONE-ASSOCIATED TUMORS

developed by Ward and colleagues, phenotypical changes characterized by mesenchymal features and increased invasiveness have been observed⁸³. This is due to the downregulation of miR-375 in this resistant cell line compared with the parental wild type. This has been validated by re-expression experiments leading to sensitization to tamoxifen and partial reversion of the EMT. Metadherin (MTDH) was identified as a target of this miRNA responsible for the chemoresistance, as RNAi-mediated silencing of this protein phenocopies the effects observed upon re-expression of miR-375. This protein is indeed a downstream target gene of both H-ras and c-myc oncogenes and was identified as a poor prognosis marker in breast⁸⁴ and prostate cancers⁸⁵. Additionally, a high level of MTDH correlates with a poor disease-free survival in tamoxifen-treated patients⁸³. The role of miR-200c in doxorubicin chemoresistance was also demonstrated in MDA-MB-436 and BT474 breast cancer cell lines⁸⁶. This miRNA hampered the expression of receptor tyrosine kinase TrkB and B-cell specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 (Bmi1) at a protein level. The authors have shown that sequential doxorubicin treatment in BT474 cells leads to acquired drug resistance, accompanied by a significant downregulation of miR-200c and morphological changes characterized by the expression loss of the epithelial marker E-cadherin and the acquisition of mesenchymal features such as vimentin expression. In addition, the transcriptional repressor Bmi1 was previously shown to induce cisplatin and docetaxel resistance in osteosarcoma⁸⁷ and prostate cancer cells⁸⁸ respectively.

MicroRNAs and DNA damage

Another mode of chemoresistance is the ability of cancer cells to inhibit DNA damage repair. This inhibition gives rise to cells with a damage-tolerant phenotype contributing to the conservation of mutations disrupting genomic integrity and facilitating cancer aggressiveness. In this regard, it was found that TGF- β 1 induces miR-21 expression, thereby downregulating mutS homolog 2 (MSH2), a key component of the highly conserved DNA mismatch repair (MMR) system in MDA-MB-231, MCF-7 and HCC1954 breast cancer cells and patient samples⁸⁹. The consequent downregulation of MSH2 after TGF- β 1 treatment is at least partly responsible for the resistance toward the DNAdamaging agents cisplatin and doxorubicin in MDA-MB-231 cell line. In addition, inhibition of miR-21 in those cells further sensitizes them to cisplatin, illustrating the importance of the TGF- β /miR-21/MSH2 axis in regulating cancer cell chemoresistance. It was also demonstrated that miR-138 modulate DNA-damage response by repressing histone H2AX expression in an osteosarcoma model⁹⁰. U2OS osteosarcoma cells previously transfected with H2AX-siRNA or with miR-138 mimic were found to be more sensitive to both cisplatin and camptothecin due to a decrease in homologous recombination processes. Zhang and colleagues also reported that the protein inhibitor of the ATM/ATRp53 DNA-damage signaling pathway, Wip1 (Wild-type p53-induced phosphatase 1), is a miR-16 target⁹¹. Through its phosphatase activity on several genes implicated in the DNA-damage checkpoints, Wip1 releases cells from cell cycle arrest. Additionally, miR-16 overexpression as well as inhibition of Wip1 expression result in an increase in doxorubicin sensitivity of MCF-7 cells.

MicroRNAs as predictive treatment biomarkers

Because their small size and structure protect them from RNAse degradation, miRNAs are promising predictive treatment tools. They are also easily detectable in tumor biopsy samples or in body fluids, so in respect to translational applications, some groups have established the miRNA signatures in primary tumors in order to evaluate the treatment response. Thus, several miRNAs have recently been shown to correlate with the ifosfamide sensitivity of human and rat osteosarcoma samples. Indeed, five discriminating miRNAs were identified to distinguish good from bad responders: miR-92a, miR-99b, miR-193a-5p and miR-422a were found to be overexpressed whereas miR-132 was found to be downregulated in good responders⁹². The TGF- β , Wnt and MAP kinase pathways are regulated by these miRNAs, explaining why overexpression of miRNAs related to these patterns correlates with good responses. Additionally, it was also found that patients with androgen-dependent prostate cancer or hormonerefractory prostate cancer have a high sera miR-21 level correlated with PSA one and were resistant to docetaxelbased chemotherapy⁹³. A miRNA profile in formalin-fixed paraffin-embedded human osteosarcoma tissues also reveals that a range of miRNAs signature (5–10 microRNAs) correlates with chemotherapy response⁹⁴. Interestingly, this miRNA pattern is mainly clustered on the 14q32 chromosomal locus, previously reported to be linked to osteosarcoma. In the same way, Jones and coworkers reported that high miR-15b and miR-451 levels in pretreated osteosarcoma samples was a good predictive factor for chemotherapy response⁹⁵. Establishment of the serum or tumor miRNAs expression profile could be a valuable tool in a clinical setting, allowing the treatment adaptation to each patient and to improve the survival rates of those cancers.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

As discussed in previous sections, miRNA effects on chemotherapy outcomes can be positive or negative depending on the oncogene or tumor suppressor role of their main targets. Chemoresistant tumor cells display altered expression of miRNAs related to various survival connected pathways, which might explain why cross-resistance between several drugs is often exhibited by such cells⁷¹. As mentioned in this chapter, it is conceivable that restoring a correct expression of miRNAs can sensitize cells to conventional chemotherapy. Thus, as a long-term goal, all these miRNAs may be used as potential agents and/or targets for the development of novel therapeutic strategies in order to overcome drug resistance. Besides, it was reported that miRNAs are also able to discriminate different malignant tissues with a higher accuracy than mRNAs⁹⁶. In addition, thanks to their good stability in body fluids, their current use as predictive biomarkers for evaluating the treatment response is under study, and further investigations are ongoing to validate their potential to serve as *bona fide* decision-tools for clinicians.

Finally, in this chapter we discussed the implication of miRNAs in both metastatic dissemination and drug resistance processes in three cancer models known to affect bones at primary or secondary pathological sites. As it was demonstrated by Taichman and colleagues, the preferential bone localization for prostate cancers' metastasis can be explained by the SDF-1/CXCR4 pathway⁹⁷ and transposition of this model in breast cancers is not excluded. Metastatic nodule formation is a multistep mechanism in which it is now well established that miRNAs contribute, notably by interfering with the migratory and invasive features of cancer cells⁹⁸ and partly through the modulation of the EMT process⁹⁹. MiRNAs are also implicated in drug-resistance by deregulating numerous survival pathways, allowing tumor cells to bypass the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents. Due to its multiple targets, a unique miRNA is able to interfere with several cellular key pathways, including those related to both drug resistance and metastatic dissemination. This additional layer of miRNA regulation finally supports the fact that chemoresistance and metastatic dissemination are two processes potentially linked together. Indeed, as the metastasis formation process is obviously a consequence of primary tumor growth, it also often succeeds to chemotherapy escape, even several years after treatment rounds. This suggests that imbalanced microRNA levels could be at the origin of cancer complications and that reversing the effect of some malignant deregulated miRNAs could bring survival rate benefits. Before using miRNAs as novel therapeutic tools, achievement of *in vivo* models of synthetically modified miRNA delivery further needs to be established, in order to better understand the kinetic features of these molecules. In the future, we will also hopefully be able to use miRNAs as biomarkers to precisely select those patients who are more likely to benefit from particular drugs, giving them a chance to avoid metastatic dissemination.

References

- 1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA: a Cancer Journal for Clinicians 2011;61(2):69–90.
- 2. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. New Engl J Med 2004;350(16):1655-64.
- 3. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. Physiology (Bethesda) 2005;20:349–56.
- 4. Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. Cancer Treat Rev 2001;27(3):165–76.
- 5. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. Nature Rev Cancer 2003;3(6):453-8.
- 6. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. Science 2000;289(5484):1508–14.
- 7. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. Discovery Med 2004;4(22):144-8.
- 8. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. Ann Rev Med 2007;58:267–84.
- 9. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nature Rev Cancer 2002;2(6):442-54.
- 10. Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. Cancer Res 1978;38(9):2651-60.
- 11. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. Nature Rev Cancer 2002;2(8):584-93.
- 12. Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100(13):7737–42.
- 13. Demicheli R. Tumour dormancy: findings and hypotheses from clinical research on breast cancer. Semin Cancer Biol 2001;11(4):297–306.
- 14. Koeneman KS, Yeung F, Chung LW. Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment. Prostate 1999;39(4):246–61.
- 15. Logothetis CJ, Lin SH. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. Nature Rev Cancer 2005;5(1):21-8.
- 16. Coleman RE. Management of bone metastases. Oncologist 2000;5(6):463-70.
- 17. Heymann D, Ory B, Gouin F, et al. Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors. Trends Molec Med 2004;10(7):337–43.
- Conte PF, Latreille J, Mauriac L, et al. Delay in progression of bone metastases in breast cancer patients treated with intravenous pamidronate: results from a multinational randomized controlled trial. The Aredia Multinational Cooperative Group. J Clin Oncol 1996;14(9):2552–9.
- 19. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. Trends Molec Med 2006;12(12):580–7.

174 15. MICTORNA IMPLICATION IN THERAPEUTIC RESISTANCE AND METASTATIC DISSEMINATION OF BONE-ASSOCIATED TUMORS

- 20. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993;75(5):843–54.
- 21. Pasquinelli AE, Ruvkun G. Control of developmental timing by micrornas and their targets. Annual review of cell and developmental biology 2002;18:495–513.
- 22. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. J Clin Oncol 2009;27(34):5848–56.
- 23. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs microRNAs with a role in cancer. Nature Rev Cancer 2006;6(4):259–69.
- 24. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Viol 2007;302(1):1–12.
- 25. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA. MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. Nature Rev Cancer 2009;9(4):293–302.
- 26. O'Driscoll L, Clynes M. Biomarkers and multiple drug resistance in breast cancer. Current Cancer Drug Targets 2006;6(5):365–84.
- 27. Yap TA, Swanton C, de Bono JS. Personalization of prostate cancer prevention and therapy: are clinically qualified biomarkers in the horizon? EPMA J 2012;3(1):3.
- 28. Schwartz CL, Gorlick R, Teot L, et al. Multiple drug resistance in osteogenic sarcoma: INT0133 from the Children's Oncology Group. J Clin Oncol 2007;25(15):2057–62.
- 29. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. Ann Rev Pathol 2009;4:199-227.
- 30. Jung EJ, Santarpia L, Kim J, Esteva FJ, Moretti E, Buzdar AU, et al. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. Cancer 2012;118(10):2603–14.
- 31. Ma J, Dong C, Ji C. MicroRNA and drug resistance. Cancer gene therapy 2010;17(8):523–31.
- 32. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103(7):2257–61.
- 33. Kobayashi E, Hornicek FJ, Duan Z. MicroRNA Involvement in osteosarcoma. Sarcoma 2012;2012:359739.
- 34. Yan LX, Huang XF, Shao Q, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. RNA 2008;14(11):2348–60.
- 35. Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth. Oncogene 2007;26(19):2799–803.
- 36. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). J Biol Chem 2007;282(19):14328–36.
- 37. Zhu S, Wu H, Wu F, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. Cell Res 2008;18(3):350–9.
- 38. Yin S, Lockett J, Meng Y, et al. Maspin retards cell detachment via a novel interaction with the urokinase-type plasminogen activator / urokinase-type plasminogen activator receptor system. Cancer Res 2006;66(8):4173–81.
- 39. Cher ML, Biliran HR Jr, Bhagat S, et al. Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100(13):7847–52.
- 40. Ziyan W, Shuhua Y, Xiufang W, Xiaoyun L. MicroRNA-21 is involved in osteosarcoma cell invasion and migration. Med Oncol 2011;28(4):1469–74.
- 41. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. Mol Cell Biol 2008;28(17):5369–80.
- 42. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology 2007;133(2):647–58.
- 43. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature 2005;435(7043):839–43.
- 44. Drury R, Verghese ET, Hughes TA. The roles of microRNAs in sarcomas. J Pathol 2012;227(4):385–91.
- 45. Wang Y, Lee CG. MicroRNA and cancer focus on apoptosis. J Cell Molec Med 2009;13(1):12–23.
- 46. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. Genes Dev 2007;21(9):1025–30.
- Fu Z, Smith PC, Zhang L, et al. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. J Natl Cancer Inst 2003;95(12):878–89.
- 48. Dangi-Garimella S, Yun J, Eves EM, et al. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. EMBO J 2009;28(4):347–58.
- 49. Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102(50):18081–6.
- 50. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. Blood 2006;108(9):3068–71.
- 51. Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. J Biol Chem 2007;282(32):23716–24.
- 52. Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. Nature 2012;481(7380):190–4.
- 53. Hu H, Zhang Y, Cai XH, et al. Changes in microRNA expression in the MG-63 osteosarcoma cell line compared with osteoblasts. Oncol Lett 2012;4(5):1037–42.
- 54. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. Nature 2008;451(7175):147–52.
- 55. Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. Cell Cycle 2008;7(20):3112-7.
- 56. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. Oncogene 2005;24(14):2375–85.
- 57. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. Nature Cell Biol 2008;10(5):593–601.
- 58. Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. EMBO Rep 2008;9(6):582–9.
- 59. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. Genes Dev 2008;22(7):894–907.
- 60. Kong W, Yang H, He L, et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. Mol Cell Biol 2008;28(22):6773–84.

REFERENCES

- 61. Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. Oncologist 2004;9(4):422–41.
- Gong J, Jaiswal R, Mathys JM, et al. Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance. Cancer Treat Rev 2012;38(3):226–34.
 Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and
- enhances cell proliferation. Cancer Res 2005;65(21):9628–32.
 64. Bao L, Hazari S, Mehra S, et al. Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. Am J Pathol 2012;180(6):2490–503.
- 65. Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. Mol Cancer Ther 2008;7(7):2152–9.
- 66. Pan YZ, Morris ME, Yu AM. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells. Mol Pharmacol 2009;75(6):1374–9.
- 67. To KK, Robey RW, Knutsen T, et al. Escape from hsa-miR-519c enables drug-resistant cells to maintain high expression of ABCG2. Mol Cancer Ther 2009;8(10):2959–68.
- Zhou M, Liu Z, Zhao Y, et al. MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. J Biol Chem 2010;285(28):21496–507.
- 69. Shi GH, Ye DW, Yao XD, et al. Involvement of microRNA-21 in mediating chemo-resistance to docetaxel in androgen-independent prostate cancer PC3 cells. Acta Pharmacol Sin 2010;31(7):867–73.
- 70. Yang CH, Yue J, Fan M, Pfeffer LM. IFN induces miR-21 through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway as a suppressive negative feedback on IFN-induced apoptosis. Cancer Res 2010;70(20):8108–16.
- 71. Bhatnagar N, Li X, Padi SK, et al. Downregulation of miR-205 and miR-31 confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis in prostate cancer cells. Cell Death Disease 2010;1:e105.
- 72. Kojima K, Fujita Y, Nozawa Y, et al. MiR-34a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory prostate cancer PC3 cells through direct and indirect mechanisms. Prostate 2010;70(14):1501–12.
- 73. He C, Xiong J, Xu X, et al. Functional elucidation of MiR-34 in osteosarcoma cells and primary tumor samples. Biochem Biophys Res Commun 2009;388(1):35–40.
- 74. Yan K, Gao J, Yang T, et al. MicroRNA-34a inhibits the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells both in vitro and in vivo. PloS one 2012;7(3):e33778.
- 75. Hu H, Li S, Cui X, et al. The overexpression of hypomethylated miR-663 induces chemotherapy resistance in human breast cancer cells by targeting heparin sulfate proteoglycan 2 (HSPG2). J Biol Chem 2013;288(16):10973–85.
- 76. Song B, Wang Y, Xi Y, et al. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. Oncogene 2009;28(46):4065–74.
- 77. Song B, Wang Y, Titmus MA, et al. Molecular mechanism of chemoresistance by miR-215 in osteosarcoma and colon cancer cells. Molecular Cancer 2010;9:96.
- 78. Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, et al. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. J Biol Chem 2008;283(44):29897–903.
- 79. Zhao G, Cai C, Yang T, et al. Correction: MicroRNA-221 Induces cell survival and cisplatin resistance through PI3K/Akt pathway in human osteosarcoma. PloS one 2013;8(5).
- 80. Fujita Y, Kojima K, Ohhashi R, et al. MiR-148a attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression. J Biol Chem 2010;285(25):19076–84.
- Rodriguez-Gonzalez FG, Sieuwerts AM, Smid M, et al. MicroRNA-30c expression level is an independent predictor of clinical benefit of endocrine therapy in advanced estrogen receptor positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2011;127(1):43–51.
- 82. Bockhorn J, Dalton R, Nwachukwu C, et al. MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11. Nature Communications 2013;4:1393.
- 83. Ward A, Balwierz A, Zhang JD, et al. Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer. Oncogene 2013;32(9):1173–82.
- 84. Li J, Zhang N, Song LB, et al. Astrocyte elevated gene-1 is a novel prognostic marker for breast cancer progression and overall patient survival. Clin Cancer Res 2008;14(11):3319–26.
- 85. Kikuno N, Shiina H, Urakami S, et al. Knockdown of astrocyte-elevated gene-1 inhibits prostate cancer progression through upregulation of FOXO3a activity. Oncogene 2007;26(55):7647–55.
- Kopp F, Oak PS, Wagner E, Roidl A. miR-200c sensitizes breast cancer cells to doxorubicin treatment by decreasing TrkB and Bmi1 expression. PloS one 2012;7(11):e50469.
- 87. Wu Z, Min L, Chen D, et al. Overexpression of BMI-1 promotes cell growth and resistance to cisplatin treatment in osteosarcoma. PloS one 2011;6(2):e14648.
- Crea F, Duhagon Serrat MA, Hurt EM, et al. BMI1 silencing enhances docetaxel activity and impairs antioxidant response in prostate cancer. International journal of cancer Int J Cancer 2011;128(8):1946–54.
- 89. Yu Y, Wang Y, Ren X, et al. Context-dependent bidirectional regulation of the MutS homolog 2 by transforming growth factor beta contributes to chemoresistance in breast cancer cells. Mol Cancer Res 2010;8(12):1633–42.
- 90. Wang Y, Huang JW, Li M, et al. MicroRNA-138 modulates DNA damage response by repressing histone H2AX expression. Mol Cancer Res 2011;9(8):1100–11.
- 91. Zhang X, Wan G, Mlotshwa S, Vance V, et al. Oncogenic Wip1 phosphatase is inhibited by miR-16 in the DNA damage signaling pathway. Cancer Res 2010;70(18):7176–86.
- 92. Gougelet A, Pissaloux D, Besse A, et al. Micro-RNA profiles in osteosarcoma as a predictive tool for ifosfamide response. Int J Cancer 2011;129(3):680–90.
- **93**. Zhang HL, Yang LF, Zhu Y, et al. Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. Prostate 2011;71(3):326–31.
- 94. Kelly AD, Haibe-Kains B, Janeway KA, et al. MicroRNA paraffin-based studies in osteosarcoma reveal reproducible independent prognostic profiles at 14q32. Genome Med 2013;5(1):2.

176 15. MICTORNA IMPLICATION IN THERAPEUTIC RESISTANCE AND METASTATIC DISSEMINATION OF BONE-ASSOCIATED TUMORS

- 95. Jones KB, Salah Z, Del Mare S, et al. miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. Cancer Res 2012;72(7):1865–77.
- 96. Lu J, Getz G, Miska E, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005;435(7043):834–8.
- 97. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, et al. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. Cancer Res 2002;62(6):1832–7.
- 98. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, et al. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. Nature Cell Biol 2008;10(2):202–10.
- 99. Korpal M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. J Biol Chem 2008;283(22):14910–4.

II.2. LES microARNs DANS LA DISSEMINATION METASTATIQUE DE L'OSTEOSARCOME :

II.2. Les microARNs dans la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome :

<u>II.2.1. Implication des miARNs -527 et -665, régulés par les membres de la famille de</u> <u>TP53, ΔNp63α et TAp73β, dans la dissémination métastatique des Carcinomes et de</u> <u>l'Ostéosarcome :</u>

<u>Article 4 : « L'isoforme ΔNp63α réprime l'expression de miARNs, initiant l'activation d'un</u> programme de cicatrisation et promouvant la dissémination métastatique dépendante du <u>TGF-β» :</u>

Cancer Research, 2016.

Rodriguez Calleja L, Jacques C, Lamoureux F, Baud'huin M, Tellez Gabriel M, Quillard T, Sahay D, Perrot P, Amiaud J, Charrier C, Brion R, Lecanda F, Verrecchia F, Heymann D, Ellisen LW, Ory B.

II.2.1.a. Introduction à l'Article 4 :

Comme évoqué dans la partie introductive de ce chapitre (<u>cf. Article 3</u>), la dissémination métastatique est un processus d'échappement tumoral complexe, généralement associé à un mauvais pronostic pour les patients. Il met en jeu de nombreux facteurs, dont toutes les implications n'ont pas encore été totalement élucidées à l'heure actuelle. Dans ce contexte, l'identification de ces médiateurs, couplée à une meilleure compréhension de leurs modes d'action, demeurent toujours des enjeux majeurs de la Recherche en Cancérologie.

Appartenant à la famille de protéines de **P53**, l'isoforme $\Delta Np63\alpha$ est surexprimée dans de nombreux modèles cancéreux, comme c'est le cas des carcinomes par exemple, dans lesquels ses fonctions d'oncogène ont été particulièrement bien détaillées²⁰¹. Alors que ses rôles dans la médiation de la **prolifération cellulaire** *in vitro* ainsi que la **croissance tumorale** *in vivo* sont abondamment décrits, son implication dans la dissémination métastatique reste encore trop peu documentée²⁰². Ainsi, seulement quelques études attestent de son pouvoir de promotion de la **migration cellulaire** en faveur du **développement métastatique**, comme cela a été rapporté dans un modèle de **cancer** de la **vessie**²²⁹. D'après cette étude, les fonctions de cette isoforme dans ce contexte seraient liées à son potentiel de régulation de l'expression de la **claudine-1**, une protéine impliquée dans la formation des jonctions serrées. Par ailleurs, le rôle pro-métastatique de $\Delta Np63\alpha$ a également été suggéré dans un modèle de **carcinome** de la **tête et du cou**, dans lequel sa surexpression induit une augmentation de l'expression du facteur **CD44**, ainsi qu'un épissage particulier de ce gène, justement impliqué dans les processus de migration cellulaire²³⁰.

Quoi qu'il en soit, les mécanismes moléculaires par lesquels $\Delta Np63\alpha$ contribue à la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome sont très mal connus et apparaissent par

ailleurs d'autant plus complexes, que ce facteur de transcription pourrait possiblement réguler de nombreuses voies de signalisation y contribuant. Parmi ces voies, celle du **TGF-** β (**Transforming Growth Factor-** β) semblerait être une bonne candidate, non seulement au regard de la dépendance des cellules d'Ostéosarcome vis-à-vis de leur microenvironnement osseux (justement enrichi de ce facteur de croissance, <u>*cf.*</u> **Article 1**), mais aussi, car de nombreuses études attestent du rôle pro-métastatique de l'activation de cette voie dans ce cancer^{231,232}.

Par ailleurs, bien que les capacités transcriptionnelles des facteurs tels que $\Delta Np63\alpha$ leur permettent de moduler de façon directe l'expression de leurs gènes-cibles, ils peuvent également opérer de façon indirecte, via des mécanismes de régulation épigénétique impliquant les miARNs. Cette étude ambitionne donc de mieux comprendre comment $\Delta Np63\alpha$, en inhibant l'expression de miARNs répresseurs de la signalisation par le TGF- β , active finalement cette voie métabolique et contribue au phénomène de dissémination métastatique des Carcinomes et de l'Ostéosarcome. De plus, ce travail vise également à mieux appréhender dans quelle mesure le soutien de l'activation de la voie du TGF- β par $\Delta Np63\alpha$ puisse finalement être lié aux processus physiologiques migratoires participant à la cicatrisation cellulaire dépendante du gène *KHRSP*.

• <u>Préambule :</u>

Cette étude constitue l'objet principal du travail de thèse du Dr. Lidia Rodriguez Calleja, qui m'a généreusement transmis tout son savoir technique et dont la bonne humeur et l'accent espagnol n'empêchent pas de démêler de problématiques aussi sérieuses que la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome. La présentation de cet article ici répond donc à une logique d'introduction des deux études suivantes (<u>cf. Articles 5 et 6</u>), dans la mesure où elles relèvent des mêmes considérations en termes de physiologie tumorale et d'épigénétique.

Ayant intégré le Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse UMR957 lors de mon stage de **Master 1**, j'ai pu contribuer à la progression du projet de Lidia alors que son avancée n'était encore qu'à un stade assez précoce. Cette toute première approche de la Recherche sur les Sarcomes Osseux m'a ainsi permis de prendre pleinement conscience de l'**investissement** nécessaire à la réalisation de projets de cette envergure, aussi bien en termes de **temps**, que d'**énergie** et de **moyens** déployés.

J'ai donc dans un premier temps, épaulé Lidia dans toutes les expérimentations relatives à la **culture cellulaire** et notamment dans la génération des nombreux **échantillons biologiques** de cette étude. La production de ces derniers a par ailleurs nécessité de longues étapes d'optimisation, impliquant de multiplier les conditions de traitements (temps, concentrations...) ou de transfection par exemple. Durant mon stage de **Master 2**, ma participation à ce travail a toutefois été plus **anecdotique**, ayant alors moi-même mon propre projet d'étude à investiguer (Implication du miR-193a-5p et de TAp736 dans la chimiorésistance des Sarcomes Osseux au Cisplatine ; <u>cf. Article 6</u>).

Toutefois, cette étude n'ayant pas encore été publiée à l'issue de la thèse de Lidia, je me suis attachée à la compléter selon les modalités demandées par les **éditeurs**, me consacrant alors pleinement à la réalisation des expérimentations complémentaires des étapes de révision. J'ai ainsi réalisé les **expérimentations in vivo** dans leur intégralité ; de la gestion de commande et d'arrivée des animaux à l'animalerie, à la génération du modèle murin d'Ostéosarcome, en passant par le suivi de la croissance tumorale et le traitement des souris par injection des pré-miARNs synthétiques. J'ai aussi procédé à leur euthanasie, à la dissection des poumons et à toutes les analyses de quantification de bioluminescence relatives à la dissémination métastatique. J'ai également complété cette étude avec des expérimentations fonctionnelles de **migration** in vitro en Chambre de Boyden et des analyses d'expression par **RT-qPCR** et **Western Blot**.

Dans des considérations scientifiques, ce travail a pu permettre de lever en partie le voile sur le rôle tenu par les miR-527 et -665 dans la **dissémination métastatique** des Carcinomes et des Sarcomes Osseux. Ainsi, ces analyses démontrent toute l'importance d'une

meilleure connaissance de l'implication de ces petits ARNs dans la dissémination métastatique de l'**Ostéosarcome**, introduisant alors parfaitement l'étude suivante, portant sur l'implication des miR-198 et -206 dans la régulation de ce processus dans ce type de cancer (<u>cf. Article 5</u>).

Par ailleurs, en mettant en lumière le rôle des membres de la famille de TP53, ΔNp63α et TAp736 dans la dissémination métastatique, ce travail évoque aussi leur implication dans d'autres mécanismes d'échappement tumoral, tels que la chimiorésistance. Dans cette logique, cet <u>Article 4</u> permet également d'introduire l'étude qui fera l'objet de la sous-partie suivante de cette thèse, visant à investiguer l'implication de TAp736 et du miR-193a-5p dans la chimiorésistance des Sarcomes Osseux au Cisplatine (<u>cf.</u> <u>Article 6</u>).

II.2.1.b. Présentation de l'Article 4 :

Afin de mieux comprendre comment $\Delta Np63\alpha$ régule la voie du TGF- β et contribue par cet intermédiaire, à promouvoir la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome, nous nous sommes intéressés aux miARNs inhibés par ce facteur de transcription. Notre hypothèse de travail étant d'identifier, parmi ces miARNs, ceux qui cibleraient potentiellement des **acteurs** de la voie du TGF- β et dont la répression par $\Delta Np63\alpha$ permette finalement l'activation de cette voie de signalisation.

A ces fins, l'extinction de cette isoforme de p63 a été réalisée par l'emploi de siARNs, dans la lignée de carcinome de la tête et du cou JHU-029, justement connue pour surexprimer ΔNp63α. Le profil d'expression des miARNs obtenu dans ces conditions a été analysé par puces à miARNs (Exigon Locked Nucleic Acid Platform) et des analyses in silico ont révélé que, parmi les miARNs les plus surexprimés suite à l'extinction de p63, les miR-371-5p, -527, -583 et -665 ciblaient potentiellement certains gènes impliqués dans la voie du TGF-β, à savoir le TGFβ-RII (TGF-β Receptor II) et Smad4 (Fig. 1A, 1B, 1C et Supp Fig. 1A). Compte tenu du nombre important d'isoformes différentes de p63 et du fait que $\Delta Np63\alpha$ réprime l'activité transcriptionnelle de TAp73ß, un de ses gènes apparentés, l'effet de la modulation des isoformes TAp63 α et TAp73 β sur l'expression de ce panel de miARNs a également été vérifié. Alors que les capacités d'inhibition spécifique de l'expression de ces miARNs par ΔNp63α ont pu être validées par RT-qPCR (Fig. 1D), la surexpression de TAp63α a en revanche montré que cette isoforme ne possédait pas de telles propriétés inhibitrices (Supp Fig. 1B). Par ailleurs et comme attendu, l'augmentation artificielle de l'expression de TAp73β a montré que cette isoforme permettait, au contraire, d'activer la transcription de ces quatre miARNs, confirmant bien l'effet répresseur de $\Delta Np63\alpha$ sur TAp73 β (Fig. 1E et Supp Fig. 1C).

La seconde étape de ce travail a ensuite consisté à valider l'authenticité du pouvoir inhibiteur de ces miARNs sur l'activation de la voie du TGF- β , jusqu'alors seulement supposé par analyses bioinformatiques. A ces fins, des techniques de gène-rapporteur ont été employées, consistant à transfecter de façon simultanée chacun de ces quatre miARNs avec un vecteur portant la séquence codante du gène de la luciférase, en aval du promoteur spécifique de Smad3/4, deux effecteurs de la voie du TGF- β . Les résultats de ces expérimentations ont révélés que seul le miR-583 ne permettait pas d'inhiber la voie du TGF- β , l'excluant donc des analyses ultérieures (Fig. 1F).

Le pouvoir **inhibiteur** de $\Delta Np63\alpha$ sur l'**expression** de ces miARNs a ensuite été validé de façon fonctionnelle, par l'emploi de la même technique de gène-rapporteur. Dans ce cas, il a pu être noté que l'expression ectopique conjointe de cette isoforme avec celle du vecteur de la luciférase, conduisait à une **activation** de la voie du **TGF-** β (**Fig. 1G et Supp Fig. 1D**). Ce schéma de régulation est soutenu par le fait que la mutation ponctuelle **R304W**,

localisée au niveau du site de fixation à l'ADN de Δ Np63 α , abroge l'activation de cette voie, le même effet étant également obtenu suite à la co-transfection de TAp73 β et du même vecteur de la luciférase « TGF- β -rapporteur ».

De plus, des techniques de gène-rapporteur utilisant cette fois-ci des vecteurs codant pour le gène de la luciférase fusionné aux parties 3'UTR du TGFβ-RII ou de Smad4, nous ont permis de valider que les miR-665 et -527 étaient bien des régulateurs respectifs directs de ces gènes (Fig. 2A et Supp Fig. 2A, 2B et 2C). Par ailleurs, en modulant artificiellement le niveau d'expression de ces deux miARNs par transfections transitoires de miARNs synthétiques (pré-miARNs) ou bien de leurs inhibiteurs (anti-miARNs), nous avons pu valider que le niveau d'expression transcriptionnel et protéique de leurs cibles respectives, le TGFβ-RII et Smad4 était également bien modulé de manière opposée (Fig. 2B, 2C et Supp Fig. 2E). De plus, nos analyses par Western Blot ont permis de confirmer qu'un traitement au TGF-B conduisait bien à une activation de la voie des Smads, caractérisée par une augmentation de la phosphorylation de Smad3 (Fig. 2D et Supp Fig. 2F). Ceci étant, nous avons pu noter par la suite, que seules les modulations artificielles du niveau d'expression du miR-665 impactaient la phosphorylation de Smad3 (Fig. 2D). Ces résultats sont conformes à ceux attendus dans la mesure où la cible de ce miARN, à savoir, le **TGF** β -**RII**, est situé en amont de Smad3 dans la cascade d'activation du TGF- β , contrairement à Smad4, la cible du miR-527, qui intervient en aval de Smad3 dans cette voie de signalisation (Fig. 1C).

Nous avons ensuite confirmé notre hypothèse de régulation de l'expression des miARNs par Δ Np63 α et TAp73 β de façon fonctionnelle, en analysant la capacité de ces facteurs de transcription à moduler l'expression du TGF β -RII et de Smad4 en réponse à un traitement par le TGF- β . Nous avons pu noter que l'expression de ces gènes, ainsi que celle de *PAI-1* et *CTGF*, deux cibles terminales de la voie du TGF- β était diminuée suite à la surexpression de TAp73 β ou à la sous-expression de p63 (Fig. 3A et Supp Fig. 3A et 3B). Une telle modulation a également été observée au niveau protéique concernant le TGF β -RII et Smad4 (Fig. 3C) et est également corroborée par la diminution du niveau de phosphorylation de Smad3 observée dans ces conditions (Fig. 3C). A l'inverse, nous avons pu démontrer que la surexpression de Δ Np63 α dans la lignée d'Ostéosarcome MNNG-HOS (qui n'exprime pas Δ Np63 α de façon endogène), permettait l'activation de la voie du TGF- β , caractérisée par une augmentation du niveau de phosphorylation de Smad3 (Supp Fig. 3C).

L'effet des miARNs régulés par Δ Np63 α et TAp73 β sur les **capacités migratoires** dépendantes du TGF- β ont ensuite été évaluées *in vitro* par des tests de migration en **Chambres de Boyden**, dans des cellules de la lignée de carcinome de la tête et du cou JHU-029. Les transfections des deux **miARNs** d'intérêt, tout comme celle de **TAp73\beta** ont conduit à une **réduction** des capacités migratoires induites par le TGF- β , les miARNs n'affectant toutefois pas la viabilité cellulaire (**Fig. 4A et Supp Fig. 4A**). La présence de Δ Np63 α en revanche, a permis d'induire la migration de ces cellules (**Fig. 4B**). De plus, l'effet **anti-** **migratoire** de **TAp73** β et des **miR-527** et -665 d'une part, ainsi que l'effet **pro-migratoire** de **ΔNp63** α d'autre part, ont pu être confirmés par tests « scratch » dans un contexte cellulaire riche en TGF- β (**Fig. 4C, 4D et 4E**). Le **potentiel pro-invasif** de **ΔNp63** α en réponse au TGF- β a quant à lui, été confirmé par des tests d'invasion en Chambres de Boyden recouvertes de Matrigel, dans la lignée d'Ostéosarcome MNNG-HOS (**Fig. 5A et 5B**). Enfin, les propriétés pro-invasives de ΔNp63 α sont également soutenues par le fait que l'expression ectopique de ce gène induise l'activation de la MMP-9 dans cette même lignée (**Supp Fig. 5B**).

Le microenvironnement des tumeurs osseuses étant caractérisé par sa richesse en TGF- β et les propriétés pro-migratoires de $\Delta Np63\alpha$ précédemment démontrées in vitro étant dépendantes d'un tel enrichissement cytokinique, l'évaluation du pouvoir métastatique de $\Delta Np63\alpha$ in vivo, semble donc être tout à fait à propos dans un modèle de xénogreffe d'Ostéosarcome. Ce dernier a été généré par injection paratibiale de lignées humaines MNNG-HOS modifiées, surexprimant stablement ou non ΔNp63α, dans des souris athymiques (Fig. 5A). Alors que la surexpression de $\Delta Np63\alpha$ n'affecte pas la croissance tumorale de notre modèle, elle influence toutefois le nombre et la taille des métastases pulmonaires retrouvées chez les animaux, les nodules métastatiques étant alors plus nombreux et plus volumineux (Fig. 5C, 5D). Par ailleurs, l'expression de ΔNp63α est soixante fois plus élevée dans les nodules métastatiques des souris ayant développé des Ostéosarcomes à partir des cellules surexprimant $\Delta Np63\alpha$ que dans ceux des souris du groupe Contrôle (**Fig. 5E**). En adéquation avec celui de $\Delta Np63\alpha$, les niveaux d'expression de TGFβ-RII, Smad4 et P-Smad3 sont aussi augmentés dans les tumeurs primaires des animaux de ce groupe (Fig. 5G et Supp Fig. 5C). A l'inverse, nous avons pu observer que le niveau d'expression des miR-527 et -665 était moins important dans les métastases que dans les tumeurs primaires des animaux, illustrant ici leur rôle anti-métastatique (Fig. 5F). De plus, une réduction du niveau d'expression des miARNs, accompagnée d'une augmentation de celui du TGFβ-RII et de Smad4 ont été retrouvées dans des nodules métastatiques de patients atteints d'Ostéosarcome, comparé à ceux de leurs tumeurs primaires, confirmant nos résultats chez l'animal (Supp Fig. 5D).

Afin d'attester de la capacité de régulation directe des **miR-527** et -**665** sur la **dissémination métastatique**, indépendamment de leur contrôle par ΔNp63α, un modèle de xénogreffe d'Ostéosarcome a été généré, par injection de cellules de la lignée MNNG-HOS dans des souris immunodéprimées. Lorsque la croissance tumorale a atteint 200 mm³ environ, les animaux ont été traités **trois fois par semaine** par injection **intra-tumorale** des **pré-miARNs** d'intérêt (miARNs de synthèse) ou d'un pré-miARN Contrôle (**Fig. 6A**). Alors que l'injection des deux miARNs testés n'a pas affecté la croissance tumorale, une nette réduction du nombre de **métastases pulmonaires** développées par les animaux a pu être mise en évidence (**Fig. 6B, 6C et 6D**). L'efficacité de la voie d'administration du traitement a pu être validée par RT-qPCR, une augmentation du niveau d'expression des miARNs injectés (d'environ sept et deux fois pour les miR-527 et -665 respectivement) étant observée dans

les cellules des tumeurs primaires des animaux traités (**Fig. 6E et 6F**). Le niveau d'expression des miARNs est par ailleurs **moins élevé** dans les **nodules métastatiques** que dans les tumeurs primaires, alors même que ceux de **TGFβ-RII**, **Smad4** et **P-Smad3** sont augmentés dans ces échantillons (**Fig. 6E et 6F**).

Cette étude a enfin pu mettre en évidence que p63 et les miARNs d'intérêt étaient impliqués dans la régulation d'un programme de cicatrisation cellulaire dépendant de l'expression du gène KSRP et du miR-198. Des travaux récents ont en effet décrit que la voie du TGF-β, en inhibant l'expression de KSRP, une protéine de liaison aux ARNs, permettait également de réprimer celle du miR-198, présentant justement des propriétés antimigratoires (Fig. 7A). Ces données sont en adéquation avec nos résultats initiaux d'analyse d'expression des miARNs par puce, puisque l'extinction de p63 dans la lignée de carcinome épidermoïde de la tête et du cou JHU-029 (en augmentant l'expression des miARNs -527 et -665 et en réprimant en conséquence l'activation de la voie du TGF-β) conduisait à augmenter le niveau d'expression du miR-198 (Supp Fig. 1A). Nous avons par ailleurs pu démontrer qu'à l'inverse, la surexpression de $\Delta Np63\alpha$, de même que l'inhibition artificielle des miR-527 et -665 induisaient tous deux la répression de KSRP et du miR-198 (Fig. 7B, 7C, 7D et 7E). La démarche opposée, visant à surexprimer les miARNs -527 et -665 ou à éteindre l'expression de p63, a, quant à elle, conduit à une augmentation du niveau d'expression de KSRP et du miR-198 (Fig. 7B, 7C, 7D et 7E). En dehors de la promotion du processus de dissémination métastatique, ces données permettent de replacer le mécanisme de régulation de l'activation de la voie du TGF-ß dépendant de la répression des miR-527 et -665 par ΔNp63 α , dans un contexte physiologique de cicatrisation cellulaire.

In fine, cette étude illustre comment les protéines de la famille de p53 et plus particulièrement $\Delta Np63\alpha$ et TAp73 β , participent activement à la mise en place des régulations **épigénétiques** dépendantes des miARNs, dans des processus physiologiques tels que la cicatrisation et comment le détournement de tels processus par les cellules cancéreuses peut conduire à l'échappement tumoral. Ces données sont d'une importance capitale dans la compréhension de l'implication fonctionnelle des miARNs antimétastatiques -527 et -665 comme régulateurs de la voie du TGF- β et ouvrent des perspectives nouvelles quant à leur emploi comme molécules thérapeutiques originales. En outre, leur utilisation relèverait d'un grand intérêt dans le contexte de l'**Ostéosarcome**, dont la progression est intimement liée à la présence de **TGF-\beta** dans le microenvironnement.

II.2.1.c. Article 4 : « ΔΝρ63α silences a miRNA program to aberrantly initiate a wound-healing program that promotes TGF-β-induced metastasis » *Cancer Research, 2016.*

Rodriguez Calleja L, Jacques C, Lamoureux F, Baud'huin M, Tellez Gabriel M, Quillard T, Sahay D, Perrot P, Amiaud J, Charrier C, Brion R, Lecanda F, Verrecchia F, Heymann D, Ellisen LW, Ory B.

Cancer Research

Δ Np63 α Silences a miRNA Program to Aberrantly Initiate a Wound-Healing Program That Promotes TGF β -Induced Metastasis

Lidia Rodriguez Calleja^{1,2}, Camille Jacques^{1,2}, François Lamoureux^{1,2}, Marc Baud'huin^{1,2,3}, Marta Tellez Gabriel^{1,2}, Thibaut Quillard^{1,2}, Debashish Sahay⁴, Pierre Perrot^{1,2,3}, Jerome Amiaud^{1,2}, Celine Charrier^{1,2}, Regis Brion^{1,2}, Fernando Lecanda⁵, Franck Verrecchia^{1,2}, Dominique Heymann^{1,2,3}, Leif W. Ellisen⁶, and Benjamin Ory^{1,2}

Abstract

Primary cancer cell dissemination is a key event during the metastatic cascade, but context-specific determinants of this process remain largely undefined. Multiple reports have suggested that the p53 (TP53) family member p63 (TP63) plays an antimetastatic role through its minor epithelial isoform containing the N-terminal transactivation domain (TAp63). However, the role and contribution of the major p63 isoform lacking this domain, $\Delta Np63\alpha$, remain largely undefined. Here, we report a distinct and TAp63-independent mechanism by which $\Delta Np63\alpha$ expressing cells within a TGF β -rich microenvironment become positively selected for metastatic dissemination. Orthotopic transplantation of $\Delta Np63\alpha$ -expressing human osteosarcoma cells into athymic mice resulted in larger and more frequent lung metastases

Introduction

The p53 family of transcription factors, including p53 (TP53), p63 (TP63), and p73 (TP73), are key players in tumor development (1). The p53 gene is the prototypical human tumor suppressor and is mutated or lost in the majority of human cancers (1). Unlike p53, neither p63 nor p73 exhibits frequent somatic mutation in cancer (2, 3). Nevertheless, a tumor suppressor role

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (http://cancerres.aacrjournals.org/).

B. Ory and L.W. Ellisen contributed equally to this article.

L.W. Ellisen and B. Ory are co-senior authors of this article.

Corresponding Authors: Benjamin Ory, Faculté de Medecine, University of Nantes, 1 rue Gaston Veil, Nantes 44035, France. Phone: 332-7264-1142; Fax: 332-4041-2870; E-mail: Benjamin.ory@univ-nantes.fr; and Leif W. Ellisen, LELLISEN@mgh.harvard.edu

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2317

©2016 American Association for Cancer Research.

than transplantation of control cells. Mechanistic investigations revealed that $\Delta Np63\alpha$ repressed miR-527 and miR-665, leading to the upregulation of two TGF β effectors, SMAD4 and T β RII (TGFBR2). Furthermore, we provide evidence that this mechanism reflects a fundamental role for $\Delta Np63\alpha$ in the normal wound-healing response. We show that $\Delta Np63\alpha$ -mediated repression of miR-527/665 controls a TGF β -dependent signaling node that switches off antimigratory miR-198 by suppressing the expression of the regulatory factor, KSRP (KHSRP). Collectively, these findings reveal that a novel miRNA network involved in the regulation of physiologic wound-healing responses is hijacked and suppressed by tumor cells to promote metastatic dissemination. *Cancer Res; 76(11); 3236–51.* ©*2016 AACR.*

for p73 is suggested by genetic and biochemical studies, whereas p63 has been linked to tumorigenesis rather than tumor suppression (4). In the normal stratified epithelia, p63 functions to maintain cellular regenerative proliferation and survival, and overexpression and/or genomic amplification of p63 are observed in a subset of human cancers (5).

All three p53 family members encode proteins with highly homologous DNA-binding domains, through which they regulate both shared and distinct subsets of transcriptional targets (6). Both p63 and p73 are expressed from two distinct promoters, thereby producing isoforms that either contain or lack the Nterminal transactivation domain (TAp63/p73 and Δ Np63/p73, respectively; ref. 3). Differential mRNA splicing also gives rise to multiple C-terminal variants of both p63 and p73. In both normal epithelia and in epithelial cancers including head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), prostate, and breast cancer, the predominant p63 isoform expressed is Δ Np63 α (7, 8). Supporting the central role of this isoform, selective knockout of Δ Np63 but not TAp63 *in vivo* recapitulates the phenotype of complete p63 knockout (9–11).

Regulation by miRNAs is known to contribute to diverse cellular processes in both normal and cancer cells. Although p53 is known to regulate miRNAs that contribute to its function, the identity and contribution of p63- and p73-regulated miRNAs are poorly understood (12).

We recently demonstrated that p63 itself directly regulates a subset of miRNAs that function in a feed-forward circuit to regulate p73 levels and activity (13). This finding is in keeping with an emerging consensus that miRNAs are particularly prominent



¹INSERM, UMR-S 957, Nantes, Equipe labellisée LIGUE 2012, France. ²Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Rue Gaston Veil, Nantes, France. ³Nantes University Hospital, Nantes, France. ⁴Faculté de Médecine, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Claude Bernard Lyon 1, Paris, France. ⁵Division of Oncology, Adhesion and Metastasis Laboratory, Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, Pamplona, Navarra, Spain. ⁶Massachusetts General Hospital Cancer Center and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts.

within regulatory circuits controlling transcription factor functions. Emerging data suggest that such circuits may be particularly important for regulation of cellular functions associated with tumor metastasis (14). In the last decade, several miRNAs have been identified as promoters or suppressors of metastatic dissemination. These miRNAs regulate metastasis through divergent or convergent regulation of metastatic genes within specific pathways. The consequences of this regulation can be the modification of the cancer cell phenotype itself or a modification of the metastatic microenvironment composition (15).

One such metastatic pathway potentially under the control of miRNAs is the TGF β pathway.

TGF β is a ubiquitously expressed cytokine that regulates numerous biologic activities in a wide range of tissues. In addition to its role in regulating cell development, differentiation, and survival, TGFβ inhibits the proliferation of epithelial, endothelial, and hematopoietic cell lineages (16). A hallmark of neoplastic transformation is the resistance to TGFB-mediated cytostasis, which ultimately converts the signals produced by this cytokine into oncogenic activities, and particularly enhanced cancer cell invasion and metastasis. This dramatic modification of TGFB function underlies the adverse prognosis associated with elevated TGF β levels in developing carcinomas, involving their acquisition of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), and metastatic chemoresistant phenotypes (17). The molecular mechanisms whereby TGFβ promotes the progression of late-stage carcinomas as well as cancer cell invasion and metastasis remain to be elucidated, highlighting the need to understand the seemingly paradoxical activities of TGFB in normal and malignant cells.

The potential role of p63 in metastasis regulation remains poorly understood. The TAp63 isoform was identified as a metastasis suppressor by decreasing mobility and invasion (18). In addition, Adorno and colleagues, have described a mechanism whereby TGF β functions upstream to abrogate TAp63-mediated metastasis suppression through formation of a ternary complex involving mutant p53 and SMAD2 (19). In contrast, the relationship, if any, of the major Δ Np63 α isoform to metastasis and TGF β remains controversial. One study described Δ Np63 α as a prometastatic protein, whereas two recent contradictory studies describe Δ Np63 isoform as pro- or anti-EMT, in a TGF β -dependent manner (18, 20–22).

Here, we report a systemic analysis of p63-regulated miRNAs, which uncovered a prominent and selective contribution of Δ Np63 α to miRNA-dependent control of the TGF β pathway. We show that Δ Np63 and TAp73, but not TAp63, control the expression of miR-527 and miR-665, two miRNAs that repress the central TGF β regulators SMAD4 and TGFBR2. We provide evidence that this p63-mediated pathway is linked to control of normal wound healing through TGF β -dependent regulatory network orchestrates the metastatic dissemination of tumor cells within the TGF β -containing microenvironment. Taken together, our findings implicate a miRNA-dependent circuit involved in normal wound healing via Δ Np63 α as a key mediator of TGF β -induced metastatic dissemination.

Materials and Methods

Tumor cell line and patient tumor material

The cell line JHU-029 was a generous gift of David Sidransky (Johns Hopkins University, Baltimore, MD). This line was maintained by the Massachusetts General Hospital Center for Molecular Therapeutics cell line bank and underwent high-density SNP typing, revealing that each was unique compared with >800 other banked lines. Stocks of JHU-029 used in this study express no wild-type p53 due to a frameshift mutation in p53 codon 108 that results in premature truncation. Tetracycline-inducible HA-TAp73 β cells were established in JHU-029 using the TREx plasmid system (Invitrogen). Cells were maintained at 37°C with 5% CO₂ in RPMI (Lonza) supplemented with 10% FBS, penicillin, and streptomycin.

The human osteosarcoma cell lines MNNG/HOS (young female high-grade osteosarcoma from femur origin transformed *in vitro* by *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine treatment) were purchased from the ATCC and maintained in RPMI1640 (Lonza) supplemented with 10% FBS and 2 mmol/L L-glutamine. All cell lines were cultured in a humidified 5% CO₂/air atmosphere at 37°C. The cell line was maintained by our University cell facility. Genetic characteristics were determined by PCR single locus technology by Eurofins company using Promega, PowerPlex 21 PCR Kit. All cell lines were passaged for less than 3 months and tested in July 2015.

Osteosarcoma cell lines subpopulations were obtained at the time of diagnostic biopsy (B) or after surgical resection of lung metastasis (M), in patients diagnosed with osteosarcoma at the Hospital of the University of Navarra (Clínica Universidad de Navarra, CUN, Pamplona, Spain). The clinical features of clinical samples are available in Supplementary Table S1. Samples were obtained following patient informed consent, and after ethical approval by the Navarra University Hospital Ethics Committee. All subpopulations were thoroughly characterized as described previously (23).

miRNA microarray analysis

For each sample, 2 µg of TRIzol-extracted total RNA was purified using the RNeasy Mini Cleanup Kit (Qiagen). After having passed sample quality control on the Bioanalyser2100, the samples were labeled using the miRCURY Hy3/Hy5 power labeling kit and hybridized on the miRCURY LNA Array (v.10.0; Exigon). Spike-in controls were added in various concentrations covering the full signal range, in both Hy3 and Hy5 labeling reactions giving the opportunity to evaluate the labeling reaction, hybridization, and the performance of the array experiment in general. The quantified signals (background correction) were normalized using the global locally weighted scatterplot smoothing (Lowess) regression algorithm. The diagram only represents the miRNAs that passed the filtering criteria across samples (fold change > 1.50). The microarray data discussed in this publication have been deposited in NCBI Gene Expression Omnibus (GEO Series accession number GSE25524).

Transient transfection of pre-miR and anti-miR

All the pre-miR and anti-miR were obtained from Ambion and transfected at a final concentration of 30 nmol/L using the siPORT-NeoFX Transfection Agent (Ambion) according to the manufacturer's protocol. The pre-miR and anti-miR negative controls used are random sequences that have been tested in human cell lines and tissues and validated to not produce identifiable effects.

Transient transfection of TAp73b and ΔNp63α

Both TAp73 β and Δ Np63 α sequences were inserted in pcDNA3 vector (Invitrogen). Of note, 2 µg of DNA was

transfected using FuGENE HD Transfection Reagent (Promega) according to the manufacturer's protocol. We used pcDNA3 empty vector as a control. These assays were all performed as described previously (13).

Cell proliferation

JHU-029 cells (2×10^3 /well) were plated in 0.1-mL RPMI1640 with 10% FBS and treated with pre-miRs and anti-miRs at indicated concentration. Seventy-two hours after transfection, a solution of WST-1 was added to the wells. Cell proliferation was assessed by optical density measurement at 470 nm with Victor2 1420 (MultilabelCounter, PerkinElmer). The viability percentage was calculated by the following formula: OD at 470 nm with indicated pre-miR/OD at 470 nm with pre-miR control \times 100. Each assay was repeated in triplicate.

Western blotting analysis

Samples containing equal amounts of protein (depending on the antibody, 20-50 µg) from lysates of cultured cell lines underwent electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel and were transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were blocked in 3% BSA-PBS-0.05% Tween at room temperature for 1 hour and blots were probed overnight at 4°C with primary antibodies (TBRII, 1:1,000; Abcam), (SMAD4, 1:500; Santa Cruz Biotechnology), (SMAD3 and P-SMAD3, 1:1,000; Cell Signaling Technology), (p63, 1:1,000; Sigma-Aldrich), (p73, 1:500; Calbiochem), or GAPDH (1:2,000; Cell Signaling Technology) to detect proteins of interest. After incubation, the membranes were washed three times with washing buffer (PBS containing 0.05% Tween) for 5 minutes. Membranes were then incubated for 1 hour with 1:10,000 diluted secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology) at room temperature. Specific proteins were detected using G-Box (Syngene) after washing.

Quantitative reverse transcription PCR

Total RNA was extracted from cultured cells, human biopsies, or xenografts using TRIreagent (Invitrogen Life Technologies). Total RNA was reversed transcribed using the ThermoScript RT-PCR System (Life Technologies). Real-time monitoring of PCR amplification of complementary DNA (cDNA) was performed using DNA primers (primers sequences are available in Supplementary Table S2) on CFX96 real-time PCR detector system (Bio-Rad) with SYBR PCR Master Mix buffer (Bio-Rad). Target gene expression was normalized to the average *B2M* and *GAPDH* levels in respective samples as an internal standard, and the comparative cycle threshold (C_t) method was used to calculate relative quantification of target mRNAs. Each assay was performed in triplicate.

Quantitative reverse transcription PCR miRNA

A specific reverse transcription was performed for each miRNA from 100 ng of total RNA, using a specific stem-loop RT primer (50 nmol/L) and the MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems). The reverse transcription conditions were as follows: 30 minutes at 16°C followed by 30 seconds at 20°C, 30 seconds at 42°C, 1 second at 50°C for 60 cycles, and finally 5 minutes at 85°C. Mature miRNA expression levels were measured by real-time qRT-PCR using the SYBR PCR Master Mix buffer (Bio-Rad) and a CFX96 real-time PCR detector system (Bio-Rad). The expression of each gene was normalized to the small nuclear U6B RNA as a reference. All experiments

were performed in triplicate. Primer sequences for the reverse transcription and qPCR are available in Supplementary Tables S3 and S4 respectively.

Lentiviral and retroviral production and mRNA qRT-PCR

p63 shRNA lentiviral particles were produced by transfection of required viral plasmids (4 μ g of each: RSV-RRE, RGR, VSV-G, and 4 μ g of p63 all isoforms shRNA, p63Allsi, or 4 μ g of GFP shRNA, GFPsi) following the manufacturer's protocol (CalPhos Transfection Kit; Clontech) in HEK 293T cell line. HEK 293T were cultured in DMEM enriched with 10% FBS and 1× non-essential amino acids (Lonza). JHU-029 cells were infected with HEK 293T supernatants (with GFPsi as a control or p63Allsi) and selected by antibiotic resistance (puromycin, 1 μ g/mL) for several weeks. p63 all isoforms-shRNA targeted sequence is 5'-GGGTGAGCGTGT-TATTGATGCT-3'. p63-directed shRNA was validated not to cross react with p53 or p73 (13). Primer sequences for mRNA qRT-PCR validation are available upon request.

3'UTR reporter assays

A total of 5×10^4 cells were seeded in 24-well plates and were transfected with the indicated reporter constructs depending on the different conditions. Lysates were prepared at 48 hours after transfection, and luciferase activity was measured using the Dual Luciferase Reporter Assay system (Promega) and a luminometer (MicroLumat Plus, EG&G Berthold).

For PAI-1 reporter assay, cells were transfected with the reporter vector [(CAGA)9-lux] and pRL SV40 (containing *Renilla* luciferase, Promega) together with TAp73 β , Δ Np63 α , or pre-miRs following the manufacturer's recommendation (siPORT NeoFX Transfection Agent, Invitrogen). (CAGA)9-lux reporter vector was generated using pGL3-basic vector (Promega) where nine repetitions of the CAGA box sequence were inserted between BglII and HindIII restriction sites.

From the MNNG/HOS cell line cDNA, two fragments of the SMAD4 3'UTR (90 bp–1,900 bp and 1,900 bp–4,055 bp; primers sequences are in Supplementary Table S5) were separately cloned into pMIR-REPORT Luciferase vectors (Ambion) using the Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies). Each fragment was cloned downstream of the Firefly Luciferase between HindIII and SpeI restriction sites.

For *Smad4* 3'UTR reporter assays, cotransfection with 10 ng of either control reporter vector (pMIR control, Ambion), UTR-reporter vector (pMIR *SMAD4* 3'UTR), or mutated UTR-reporter vector (pMIR mutated *SMAD4* 3'UTR) all together with pre/antimiRs control, 527 or 371-5p (15 μ mol/L) and 25ng of pRL SV40 (Promega) was performed.

For psi-check2 *T* β *RII* 3'UTR reporter assays, cells were cotransfected with control reporter vector (psi-ckeck2 control, Promega), UTR-reporter vector (psi-check2 *T* β *RII* 3'UTR), or mutated UTRreporter vector (psi-check2 mutated *T* β *RII* 3'UTR) together with pre/anti-miRs control, 527, 665, and 371-5p (15 µmol/L) was done.

Psi-check2 T β RII 3'UTR was a kind gift from Dr. Ioanna Keklikoglou [German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany] where 3'UTR of the *T\betaRII* gene was inserted between XhoI and NotI sites of the psi-check2 vector.

TβRII and SMAD4 3'UTR site-directed mutagenesis

According to the TargetScan database, miR-527 recognizes two putative sequences within the SMAD4 3'UTR and miR-665 recognizes two putative sequences within the $T\beta RII$ 3'UTR (Supplementary Fig. S2).

Mutant seed-binding sequences were created with Quickchange lightning Multi Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies, Inc) according to the manufacturer's indications. Mutagenic primers were randomly designed with the web-based Quickchange Primer Design Program (Supplementary Table S5). For 3'UTR *SMAD4* fragment 1 and fragment 2, a single seed sequence was mutated. For 3'UTR $T\beta RII$, 2 seed sequences were mutated (Supplementary Fig. S2).

Migration and invasion tests

To evaluate migration ability, JHU-029 or MNNG/HOS cell lines were transfected with Tap73 β , $\Delta Np63\alpha$, and control vectors or indicated pre-miRs/anti-miRs. After 24 hours of transfection, cells were starved during 5 hours with RPMI-1640 supplemented with 1% FBS and then pretreated or not with 5 ng/mL TGFB (R&D Systems). All different conditions were trypsinized and treated or not with 5 ng/mL TGFβ before being seeded on the top side of a Transwell chamber (Falcon) on a porous transparent polyethylene terephthalate (PET) membrane (8-µm pore size). Different cell densities were used depending on the experiment to increase or decrease cell migration. Indeed, to be able to observe an increased cell migration in our experimental conditions, we should not already have a saturated migration in our control condition. The percentage migration increase variation between the different control conditions (pre-miR-ct and antimiR-ct) is voluntarily set up (by cell confluence variation) to facilitate the observation of either an increase or a decrease cell migration in presence of TGF β . The bottom chamber of the Transwell was filled with growth medium containing 10% FBS. After 24 hours of incubation, cells on the top side of the filters were mechanically removed and cells migrated to the bottom side were fixed (with glutaraldehyde 10%), stained (with violet crystal 0.1%), and counted. Five random fields were analyzed for each chamber.

Matrigel-coated Transwell was used for invasion assay (50 ng Matrigel/well). After 24-hour incubation, cells that had invaded to the bottom surface of membrane were fixed, stained, and counted. Five random fields were analyzed for each chamber.

Wound-healing test

A total of 50×10^3 JHU-029 cells were seeded in 24-well plate and transfected with Tap73 β , $\Delta Np63\alpha$, and control vectors or indicated pre-miRs/anti-miRs. Twenty-four hours after transfection, cells were starved during 5 hours with RPMI-1640 supplemented with 1% FBS and then treated or not with 5 ng/mL TGF β . Twenty-four hours later, wells were confluent and scratches were performed. Cell migration was recorded during 24 hours every 10 minutes at fixed points and not recovered areas were calculated.

Zymography

The presence of MMP-2 and MMP-9 in serum-free conditioned media was analyzed by zymography in 10% SDSpolyacrylamide gels containing 1 mg/mL gelatin (Sigma-Aldrich). After removal of SDS with Triton X-100, neutral protease activity was revealed by incubation of the gels for 48 hours at 37° C in 50 mmol/L Tris buffer (pH 7.4) containing 2 mmol/L CaCl₂, followed by staining in 0.05% Coomassie blue in an aqueous solution containing 20% isopropanol and 10% acetic acid. Pictures were taken using G-Box (Syngene).

Animal treatment

All procedures involving mice [their housing in the Experimental Therapeutic Unit at the Faculty of Medicine of Nantes (France) and care, the method by which they were anesthetized and killed, and all experimental protocols] were conducted in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA.PdL.06). Mice were anesthetized by inhalation of isoflurane/air (1.5%, 1 L/minute). Tumor volume was measured three times weekly and tumor volume was calculated by using the formula: length × (thickness²)/2. Data points were expressed as average tumor volume \pm SEM.

 $\Delta Np63\alpha$ -MNNG/HOS. MNNG/HOS cells were transiently transfected with either pcDNA3 empty vector or pcDNA3- Δ Np63 α (Invitrogen) following the manufacturer's protocol (FuGENE HD Transfection Reagent, Promega). Cells expressing the insert were selected by antibiotic pressure (2 mg/mL geneticin) for several weeks. MNNG/HOS osteolytic xenograft model was induced by paratibial injection of 1 × 10⁶ of either control or Δ Np63 α -overpressing human MNNG/HOS cells in 5-week-old female athymic nude mice (Harlan Sprague-Dawley, Inc.). Tumor volumes were monitored until a maximum of 2,500 mm³. Tumor and metastasis samples were collected to analyze gene expression by qRT-PCR.

Pre-miR injection. HOS osteolytic xenograft model was induced by an intramuscular injection of 1.5×10^6 human HOS LucF GFP cells next to the tibia of 5-week-old female athymic nude mice (Harlan Sprague-Dawley, Inc.), leading to a rapidly growing tumor in soft tissue with secondary contiguous bone invasion. Once tumors became palpable, mice were randomly assigned to pre-miR control or pre-miR-527 or pre-miR-665. When tumors reached 200 mm³, pre-miRs were injected at a 50 nmol/L concentration every 2 days. The pre-miRs were injected directly into the tumor volume. A total of 20 μ L at 50 nmol/L was injected in four different locations for each tumor. Each experimental group consisted of 8 mice. It is important to note that in our model the baseline metastatic rate depends on the number of cells initially used for paratibial injection. Thus, different cell numbers injected accounts for the different baseline metastatic rates shown in Figs. 5 and 6.

When tumor volume reached $\geq 10\%$ of body weight, mice were sacrificed before an intraperitoneal injection of luciferine substrate (0.12 mg D-luciferine/mg mouse; Interchim) to evaluate lung metastasis by bioluminescence (NightOwl BERTHOLD LB981). Tumor and metastasis samples were collected to analyze gene expression by qRT-PCR.

Statistical analysis

For each experimental datapoint, the SEM from replicate experiments was calculated as noted in the legends and is shown as error bars. All error bars show SEM for at least triplicate measurement from representative experiments. The mean \pm SEM was calculated for all groups and compared by two-tailed paired Student *t* test or by ANOVA, with the Bonferroni multiple comparisons test for *post hoc* analysis. Prism 3.0 software was used for all statistical analysis.

Results

A subset of miRNAs regulated selectively by $\Delta Np63$ target the TGF β pathway

Expression of the different isoforms of p63 seems to be correlated with the metastatic potential of human cancers including squamous cell carcinoma (SCC; refs. 24-27), prostate cancer (28), bladder cancer (29), and some breast cancers (30). To identify miRNAs regulated by p63, we ablated endogenous p63 expression by lentiviral RNA interference, followed by global miRNA expression profiling using the Exiqon Locked Nucleic Acid Platform (Fig. 1A and B). We performed this initial experiment in JHU-029 SCC cells, a human tumor-derived line that expresses high levels of endogenous $\Delta Np63\alpha$, which is the major p63 isoform expressed in both normal basal epithelial cells and the majority of human SCCs (8, 31). At 48 hours, a significant fraction of miRNAs identified as reproducibly regulated by p63 were upregulated following p63 knockdown, consistent with the established ability of the major enodogenous $\Delta Np63\alpha$ isoform to function as a transcriptional repressor (Fig. 1B; the full list of significantly regulated miRNAs is provided in Supplementary Fig. S1A; refs. 8, 32)

Remarkably, examination of predicted target genes of these p63-regulated miRNAs using a combination of in silico resources (TargetScan, MicroCosm, DianaLab, and miRANDA) revealed that four of the sixteen significantly upregulated miRNAs (miR-527, miR-665, miR-371-5p, and miR-583) were all predicted to have targets in the TGFβ pathway including TGFBR2 and SMAD4 (Fig. 1C and Supplementary Fig. S1A; refs. 33, 34). Because p63 and p73 are known to regulate a common subset of genes, we performed direct validation of p63 and p73-dependent regulation of these four endogenous miRNAs (Fig. 1D and E; refs. 8, 35). For p63, we used the same lentiviral RNA interference approach employed for the array analysis, and then validated directly by qPCR the four miRNAs as repressed by endogenous $\Delta Np63$. To determine whether TAp63 isoforms regulated these endogenous miRNAs, we used cells expressing tetracycline (tet)-inducible TAp63 α ; no miRNA regulation was observed (Supplementary Fig. S1B). To test p73-dependent miRNA regulation, we performed the same experiment using tet-inducible TAp73 β , a major p73 isoform expressed in epithelial cells (ANp73 being not expressed in our SCC model, it appeared not relevant to study its implication in this network; ref. 36). Induction of $TAp73\beta$ mRNA is detectable within one hour following addition of tetracycline in these cells (Supplementary Fig. S1C), and induction of each of the four miRNAs was also observed at this early time point. As a control, we tested upregulation of the direct p73 transcriptional target gene PUMA, which was coincident with p73dependent miRNA regulation (Fig. 1E and Supplementary Fig. S1C). Thus, each of these miRNAs is selectively regulated by Δ Np63 and TAp73 β , but not by TAp63 isoforms.

We then tested the ability of p63/p73 and their regulated miRNAs to control the TGF β pathway (Fig. 1C), employing the Smad3/4-specific reporter construct (CAGA)9-lux (37). This reporter includes 9 copies of the SMAD3/4 binding motif fused to luciferase. Cotransfection of the reporter with the corresponding synthetic miRNA duplexes in each case, except for miR-583, inhibited TGF β -induced luciferase expression relative to the control reporter lacking the SMAD3/4 binding motif. As the array-based analysis was not validated experimentally for miR-583, this miRNA will no longer be part of the study

(Fig. 1F). Consistent with our proposed model for p63/p73dependent regulation of this pathway (Fig. 1C), ectopic Δ Np63 α expression, which decreases the expression of these endogenous miRNAs, stimulated the TGF- β -induced luciferase reporter expression. This effect was abolished by the introduction of a single point mutation in Δ Np63 α , R304W, which abrogates the ability of p63 to bind to DNA, emphasizing the role of direct DNA binding in this regulatory process (Fig. 1G; ref. 38). The role of endogenous Δ Np63 α in this pathway was shown through knockdown experiments, which led to a decrease in TGF β -dependent luciferase reporter induction (Supplementary Fig. S1D). Finally, ectopic expression of TAp73 β , which increases the expression of these endogenous miRNAs, led to an inhibition of TGF β -induced luciferase expression compared with control (Fig. 1G).

miR-527 and miR-665 repress Smad4 and TBRII, respectively Two predicted seed-binding sequences for miR-665 and one for miR-371-5p are present within the $T\beta RII$ 3'UTR, and two predicted seed sequences for miR-527 are present within the SMAD4 3'UTR (Supplementary Fig. S2A and S2B). Thus, to validate the predicted TGFB pathway proteins targeted by miR-527, miR-665, and miR-371-5p, we first performed 3'UTR reporter assays. Using a $T\beta RII$ 3'UTR reporter construct, we validated the miR-665 as a robust repressor of $T\beta RII$, and eliminated miR-371-5p from the potential candidates (Supplementary Fig. S2C). To address direct SMAD4 and T β RII regulation by miR-527 and miR-665, respectively, we introduced point mutations within these 3'UTR reporter constructs, and then cotransfected these constructs with miRNA mimics (also called pre-miRs; Supplementary Fig. S2A and S2B). As predicted, in both cases, miRNA-mediated downregulation of the 3'UTR reporter was completely abolished when a reporter containing the mutant UTR was used instead (Fig. 2A). Of note, the long size of the SMAD4 3'UTR forced us to divide it in two smaller segments and to make two reporter constructs; this revealed to us that only the second binding site for miR-527 within the SMAD4 3'UTR was active (Fig. 2A). To test the endogenous miRNA regulation, we cotransfected anti-miRs into SCC cells with either the wild-type or mutant UTR reporter. Consistent with our model, 527 and 665 anti-miRs mediated upregulation of the SMAD4 and TβRII 3'UTR constructs, respectively (Supplementary Fig. S2D).

We next tested the effects on the endogenous mRNA levels for SMAD4 and TGFBR2, performing ectopic expression of miRNAs with pre-miRs. In addition, we tested the contribution of the endogenous miRNAs using an anti-miR strategy. As predicted, transfection of the two miRNA mimics suppressed the endogenous SMAD4 mRNA level (Fig. 2B), while expression of specific anti-miRs caused a significant increase in endogenous SMAD4 mRNA for miR-527 and miR-665 but not for miR-371 (Supplementary Fig. S2E). For TBRII, only the miRNA mimic for miR-665 was able to repress endogenous $T\beta RII$ mRNA level (Fig. 2B) and only the anti-miR-665 increased the endogenous TBRII mRNA level (Supplementary Fig. S2E). Of note, these experiments confirmed again that miR-371-5p cannot regulate either SMAD4 or $T\beta RII$, so we discarded it from our list of potential miRNAs regulating the TGFβ pathway. Because miRNAs can also be translational regulators, we next evaluated the effects of the endogenous miRNAs using anti-miRs followed by Western blot analysis. These experiments confirmed miR-527 as a regulator of SMAD4



Figure 1.

p63-regulated miRNAs target the TGF β pathway. A, knockdown of endogenous p63 RNA (top) and protein (bottom) by p63-directed or control (C_1) lentiviral shRNA in JHU-029 human SCC cells at 48 hours. β -Tubulin (β -Tub) served as a loading control. B, array analysis showing the fold change and direction of change for all miRNAs regulated \geq 1.5-fold in p63-ablated versus control samples shown in A. miRNAs predicted to target members of the TGF β pathway are indicated. C, graphical abstract of our working hypothesis. D, validation of p63 repression of miRNAs targeting the TGF β pathway by qRT-PCR at 72 hours post-lentiviral p63-directed or control shRNA expression in JHU-029 cells. E, validation of p73 activation of miRNAs targeting the TGF β pathway by qRT-PCR at 1 and 2 hours post-tretracycline treatment using a tetracycline-inducible TAp73 β JHU-029 human SCC cells. F, p63/p73-regulated miRNAs regulate the TGF β pathway. A reporter construct containing the SMAD4-binding motif of PAI-1 promoter fused to luciferase was cotransfected with the indicated p63 and p73 isoforms. A reporter construct containing the SMAD4-binding motif of *PAI-1* promoter fused to luciferase was cotransfected with the indicated p63 and p73 isoforms. Results show relative luciferase units (RLU) normalized to the control reporter lacking the SMAD4-binding motif. All error bars show SEM for triplicate measurements from representative experiments. *, *P* < 0.05; ***, *P* < 0.01; ****, *P* < 0.001. Two-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison tests were used.



Figure 2.

miR-527 and miR-665 repress Smad4 and TBRII, respectively, A. miRs 527 and 665 repress gene expression via SMAD4 and TBRII 3' UTRs, respectively. This repression is lost when mutant seed sequences are introduced. Cotransfection of the indicated miRNA mimics or control (ct) miRNA, together with the UTRreporter, mutated UTR-reporter, or control reporter: results show relative luciferase units (RLU) normalized to the control miRNA (fg, fragment; SMAD4 3'UTR was too large to be cloned in a single construct). Oneway ANOVA followed by Dunnett multiple comparison tests were used *. P < 0.05. B. aRT-PCR for SMAD4 and TBRII RNA levels in 48-hour miRNA-transfected JHU-029 cell line. C. JHU-029 cells were transfected with anti-miR-ct (controls) or antimiRNA candidates (anti-miR-527 and anti-miR-665) and SMAD4 and T βRII expression levels were evaluated by Western blotting 48 hours after transfection. Densitometry measurements are indicated. D. immunoblotting for P-SMAD3 and SMAD3 from JHU-029 cells transfected with pre/anti-miR-ct (controls) or pre/anti-miR candidates (pre/anti-miR-527 and pre/anti-miR-665). Cells were treated or not with 5 ng/mL TGF β for 15 minutes. All error bars show SEM for triplicate measurements from representative experiments

and miR-665 as a regulator of T β RII at the protein level (Fig. 2C). As a validation of our model and of the TGF β pathway regulation, we performed Western blots for the endogenous phosphorylated form of SMAD3 (p-SMAD3) after treatment with TGF β . Indeed, in control conditions, we observed an increase in p-SMAD3 as a result of TGF β treatment (Fig. 2D). After transfection of the respective pre-miRs and anti-miRs, only those corresponding to miR-665 were able to regulate the phosphorylation of SMAD3 following TGF β treatment. This finding is expected given that only this miRNA has a target upstream of SMAD3 in the TGF β pathway, namely T β RII (Fig. 2D). This result has been confirmed in MNNG-HOS cell line (Supplementary Fig. S2F).

$\Delta Np63\alpha$ and TAp73 β regulate Smad4 and T βRII

According to our model, if $\Delta Np63\alpha$ and TAp73 β regulate miR-527 and miR-665 controlling *SMAD4* and *T\betaRII*, then the modulation of these factors should impact the level of SMAD4 and T β RII and consequently the TGF β response in the cells. This hypothesis was first tested by qPCR, which showed that *SMAD4* but not *SMAD7* expression was specifically repressed by ectopic expression of TAp73 β or knockdown of endogenous p63 (Fig. 3A and Supplementary Fig. S3A). The same regulation was observed for *T\betaRII* (Fig. 3A and Supplementary Fig. S3). As predicted by our model, the principal final targets of the pathway, *CTGF* and *PAI-1*, were also regulated in the same way (Fig. 3A and Supplementary



Figure 3.

p63 and p73 regulate SMAD4 and T β RII. A, mRNA expression of indicated key members of the TGF β pathway analyzed over time by qRT-PCR after induction of TAp73 β by a tetracycline inducible system in the JHU-029 cell line. B, qRT-PCR for the indicated key members of the TGF β pathway in JHU-029 after 48 hours of transfection with pcDNA3 (control) or pcDNA3 Δ Np63 α .*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. Two-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison tests were used. C, immunoblotting for SMAD3 and p-SMAD3 in JHU-029 after 48 hours of transfection with TAp73 β and sRNA for p63 with their respective controls. Cells were treated or not with 5 ng/mL TGF β for 15 minutes to show lower activation of the TGF β pathway. p63, p73, SMAD4, and T β RII protein levels were analyzed in JHU-029 cells after 48 hours of transient overexpression of TAp73 β or knockdown of p63 using shRNA. Densitometry measurements are indicated. All error bars show SEM for triplicate measurements from representative experiments.

Fig. S3). The effect on *PAI-1* was also confirmed in the MNNG-HOS cell line (Supplementary Fig. S3B). The ectopic expression of Δ Np63 α , described as a repressor of our miRNAs of interest, induced as expected the expression level of *SMAD4*, *T* β *RII*, *CTGF*,

and *PAI-1* (Fig. 3B). Of note, we also observed the induction of $T\beta RI$, which is not a predicted target of these miRNAs but which supports functionally the overexpression of $T\beta RII$. Furthermore, the protein levels of SMAD4 and T β RII analyzed by Western blot

analysis were also consistent with our model. Indeed, ablation of endogenous p63 and p73 overexpression both repressed SMAD4 and T β RII protein levels and also repressed the phosphorylation of SMAD3 following TGF β treatment (Fig. 3C). The effect of Δ Np63 α overexpression was then evaluated in the MNNG-HOS osteosarcoma cell line model lacking this protein isoform. As expected, we observed an increase of the SMAD4 and T β RII protein levels and also a strong increase of the phosphorylation of SMAD3 following TGF β treatment (Supplementary Fig. S3C).

The $\Delta Np63\alpha\text{-}$ and TAp73β-regulated miRNA network controls TGFβ-induced migration

We first tested the functional relevance of our model using multiple independent migration assays. The promigration properties of TGF β were assessed using a Boyden chamber test.

We first transfected pre-miRs for our two miRNAs of interest. Both pre-miRs corresponding to miR-527 and miR-665 decreased migration induced by TGF β , from 760% to 521% and from 760% to 191%, respectively (Fig. 4A) while those pre-miRs do not affect cell viability at all under the same experimental conditions (Supplementary Fig. S4A).

We then performed the same experiment in presence of $\Delta Np63\alpha$ and TAp73 β . After 24 hours of TGF β treatment at

5 ng/mL concentration, we observed a 10% increase in migration compared with control conditions. As predicted by our molecular analysis, ectopic expression of TAp73ß decreased global migration by 43% (Fig. 4B). In contrast, the expression of $\Delta Np63\alpha$ increased strongly the effects of TGFB as indicated by an increase in migration from 10 to 480% of the untreated conditions. Interestingly, without TGFB treatment, the expression of $\Delta Np63\alpha$ seems to slightly decrease the basal migratory potential of the cells, as previously noted (Fig. 4B; ref. 18). Direct evidence showing that $\Delta Np63\alpha$ regulates TGF β signaling via downregulation of miR-527 and miR-665 is provided by the abrogation of the promigration potential of $\Delta Np63\alpha$ following overexpression of miR-527 and miR-665 Fig. 4B). Accordingly, we also observed by Western blot analysis that overexpressing these miRNAs abrogated the effects on SMAD4 caused by $\Delta Np63\alpha$ expression (Supplementary Fig. S4B). Direct evidence showing that TAp73ß regulates TGFß signaling via upregulation of miR-527 and miR-665 is provided by the abrogation of the antimigration potential of TAp73ß following anti-miR-527 and -665 transfection (Supplementary Fig. S4C). Finally, we validated the promigration potential of TBR2 in the presence of TGF β and the inhibition of this effect by the miR-665 (Supplementary Fig. S4D).



Figure 4.

The p63 and p73-controlled miRNA network regulates TGF β -induced migration. A, JHU-029 cells were transfected with indicated miRNA mimics or with control. Twenty-four hours later, cells were treated or not with TGF β (5 ng/mL) and were retreated before the migration test. B, JHU-029 cells were transfected with TAp73 β , Δ Np63 α , or pcDNA3 (control). Cells were treated or not with TGF β (5 ng/mL) 24 hours later and retreated before the migration test. Migrated cells were counted after 24 hours of migration in Boyden chambers. Migrated cells were counted after 24 hours of migration in Boyden chambers. Migrated cells were counted after 24 hours of migration in boyden chambers. Migrated cells were counted after 24 hours of migration in Boyden chambers. Migrated cells were exected after 24 hours of migration in Boyden chambers. Migrated cells were counted after 24 hours of migration in Boyden chambers. Migrated cells were counted after 24 hours of migration in Boyden chambers. Migrated cells were counted after 24 hours of migration in Boyden chambers. Migrated cells were exected after 24 hours of migration in Boyden chambers. Migrated cells were counted after 24 hours of migration in Boyden chambers. Migrated cells were counted after 24 hours of migration in Boyden chambers. Migrated cells were counted after 24 hours of migration in Boyden chambers. Migrated cells were counted after 24 hours of migration in Boyden chambers. The value multiple comparison tests were used. All error bars show SEM for triplicate measurements from representative experiments. C, scratch assay was performed 48 hours after transfection of JHU-029 cells with TAp73 β , Δ Np63 α , or pcDNA3 (control), before a 24-hour TGF β treatment (or not) at 5 ng/mL. D and E, the same scratch assay was performed 48 hours after transfection of the indicated miRNA mimics/anti-miRs or with controls. Of note, the difference in the response to TGF β treatment between the respective controls of Fig. 4A and B is due to the intentional difference in the cell number plated, which depended on the experimental hypothesis (increased or decreased migration).

The migration potential of the cells in the presence of TGF β was also tested using an *in vitro* wound-healing assay, also called a scratch assay. Ectopic expression of TAp73 β decreased the cell migration potential by about 22% compared with control, while expression of Δ Np63 α increased it by more than 22% (Fig. 4C). We then tested the contribution of these miRNAs directly using pre-miRs and anti-miRs. Overexpression of pre-miR-527 and -665 decreased the cell migration potential by about 10% and 45%, respectively, compared with the anti-miR control, while over-expression of anti-miR-527 and -665 increased it by more than 2% and 10%, respectively (Fig. 4D and E). Globally, those data support the promigratory potential of endogenous p63 and the antimigratory effect of endogenous miR-527 and miR-665, in a TGF β -rich microenvironment context.

$\Delta Np63\alpha$ induces TGF β -mediated metastasis in vivo

Because we demonstrated *in vitro* that $\Delta Np63\alpha$ increases cell migration in presence of TGF β , we wished to verify whether $\Delta Np63\alpha$ could increase, *in vivo*, the metastatic potential of tumor cells in a physiologic context where TGF β is both present and important. One such *in vivo* model is osteosarcoma, a primary bone tumor. This type of tumor recruits osteoclasts and thereby induces abnormal bone resorption, which in turn releases growth factors including TGF β from the bone matrix and stimulates tumor proliferation and potentially metastasis dissemination (39–41). In this way, osteosarcoma cells establish a vicious cycle of bone resorption and tumor growth in which TGF β has been shown to play a role (39).

To study the influence of $\Delta Np63\alpha$ on tumor cell metastatic potential in presence of TGFB, we used the human osteosarcoma cell line MNNG/HOS. An important characteristic of the MNNG/ HOS cells for these experiments is their very low $\Delta Np63\alpha$ expression level, providing us the opportunity to directly assess the contribution of increased $\Delta Np63\alpha$ through stable ectopic expression of this protein (Fig. 5A). We first validated in vitro that repression of miR-527 and -665 was observed following overexpression of $\Delta Np63\alpha$ (Supplementary Fig. S5A). Indeed, we observed an increased sensitivity of the p63-expressing MNNG/ HOS to the promigratory potential of TGF β (Fig. 5B). The same result was observed in an experiment-assessing invasion through Matrigel at the bottom of a Boyden chamber. In presence of TGFB, the invasion of the p63-expressing MNNG/HOS increased by 85%, whereas in the same conditions, the control cells increased their invasion by only 9% (Fig. 5B). The matrix metalloproteinase (MMP) are proteases, activated by the TGFB pathway, capable of degrading multiple extracellular matrix proteins. The proinvasive potential of $\Delta Np63\alpha$ in presence of TGF β could be partially explained by an increased activity of MMP-9 as demonstrated by our zymography experiment (Supplementary Fig. S5B). Taken together, these in vitro observations validate our hypothesis that $\Delta Np63\alpha$ increases TGF β -dependent migration and invasion.

An *in vivo* evaluation of our hypothesis was then performed using a human xenograft model involving MNNG/HOS cells that recapitulates features of the human disease (41). We injected control MNNG/HOS cells or their Δ Np63 α -expressing counterparts (1–1.5 million cells) paratibially into athymic mice. Impor-

tantly, no significant difference in orthotopic tumor growth was observed between control and p63-expressing MNNG/HOS after injection (Fig. 5C). At 65 days after injection, the animals were sacrificed, the lungs dissected, and the number of metastatic nodules evaluated using an optical microscope. We observed a remarkable increase in the number of lung metastatic nodules in mice injected with $\Delta Np63\alpha$ -expressing MNNG/HOS compared with the control counterparts (an average of 4.9 vs. 0.25 metastatic nodules/mouse respectively; Fig. 5D). Moreover, the metastatic nodules from $\Delta Np63\alpha$ -expressing tumors were not only more numerous but also larger (Fig. 5D). Notably, the analysis of the orthotopic tumors at the end of the experiment confirmed that after 65 days the transfected MNNG/HOS were still overexpressing $\Delta Np63\alpha$ relative to control cells by 7-fold (Fig. 5E). Even more dramatic was the expression of $\Delta Np63\alpha$ in the metastatic lesions, which was more than 60-fold compared with the control metastases. This finding suggests strong selection for $\Delta Np63\alpha$ expression during the metastatic process. Similarly, a higher level of $\Delta Np63\alpha$ was also observed in metastases than in the respective orthotopic tumors (Fig. 5F). Moreover, as predicted by our in vitro data, the metastases showed a strong decrease in endogenous miR-527 and miR-665 expression levels (Fig. 5F). Finally, in this same group of mice harboring a $\Delta Np63\alpha$ -overexpressing tumor, the orthotopic tumors that gave rise to metastases expressed a higher level of both *SMAD4* and *T\betaRII* compared with orthotopic tumors that did not metastasize (Fig. 5G). The protein level of SMAD4 and P-SMAD3 (as a readout of TBR2 activity) were evaluated by IHC. We observed in the tumors that gave rise to metastasis both a larger area of cells expressing SMAD4 and the presence of proliferative tumor cell follicles harboring nuclear p-SMAD3 (Supplementary Fig. S5C).

We then validated the relevance of this endogenous miRNA/ TGF β pathway in osteosarcoma patient samples. We obtained from the University of Navarra 6 pairs of osteosarcoma primary tumors and their respective lung metastasis biopsy specimens. qPCR analysis revealed a decreased level of miR-527 and miR-665 in the metastases and a concomitant increase of *SMAD4* and *T* β *RII* (Supplementary Fig. S5D). Collectively, these data support the promigratory potential of Δ Np63 α through its regulation of the endogenous miR-527/miR-665/Smad4/T β RII network in an *in vivo* TGF β -rich microenvironmental context.

miR-527 and miR-665 regulate metastatic dissemination in vivo

We next evaluated directly the metastasis regulation potential of miR-527 and miR-665 in vivo through injection of the respective pre-miR constructs into osteosarcoma orthotopic tumors. As noted, this type of tumor was selected for its metastatic dissemination sensitivity to TGF β (41). Orthotopic tumors were generated by paratibial injection of 1.5 million MNNG/HOS cells expressing both luciferase and GFP (42). At 200 mm³ of tumor volume, mice were treated every 48 hours with 50 nmol/L pre-miR control (miR-ct group) or pre-miR-527 (miR-527 group) (Fig. 6A). No differences in primary orthotopic tumor growth were observed between miR-527 and miR-665-treated tumors versus the control group (Fig. 6B). At the tumor volume endpoint (2500 mm³), the average number of lung metastases for miR-527, miR-665, or the control group were evaluated both visually and using bioluminescence imaging of lungs after sacrifice (Fig. 6C and D). Mice injected with miR-527 and miR-665 demonstrated a significant reduction of lung metastatic nodules. To credential the mechanism of this effect, a gene expression analysis was then


Figure 5.

pG3 induces TGFβ-mediated metastasis *in vivo*. A, overexpression of Δ Np63 α mRNA (top) and protein (bottom) in Δ Np63 α -HOS group versus control group. B, HOS cells were transfected with Δ Np63 α or control vectors and treated or not with TGFβ (5 ng/mL) after 24 hours. Cell migration (left) and invasion (right) were analyzed after 24 hours. Results are expressed in terms of cell-occupied area vs. total area. Two-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison tests were used (***, *P* < 0.001). C, tumor progression was calculated with the formula (t² × 1)/2, where *t* is the tumor thickness and *i* is the tumor length. Average tumor volumes for Δ Np63 α or control groups over time are represented in the graph. Mann–Whitney statistical test was used. D, number of metastasis found at tumor volume endpoint (2,500 mm³) for each mouse and average for Δ Np63 α or control groups. Lung images were obtained after sacrifice showing the difference in appearance of the Δ Np63 α metastasis neves to control group. Arrows, metastatic foci. Mann–Whitney statistical test was used. Δ *Np*63 α (E), miR-527, miR-665 (F), *TjRII*, and *SMAD4* expression levels (G) were analyzed by qRT-PCR in the indicated groups [PT, primary tumors; MET, metastasis; non met-PT, primary tumors that did not produce metastasis and that did (Met-PT)]. All error bars show SEM for triplicate measurements from representative experiments.

performed on biopsies from the control and the miRNA-injected groups. We first validated the efficiency of the miRNA injection into the orthotopic tumor. Indeed, qPCR analysis revealed a 7 and a 2-fold increase in miRNA expression in the orthotopic tumor from the miR-527 and miR-665–treated group, respectively (Fig. 6E and F). In agreement with our model attributing antimetastatic



Figure 6.

miR-527 and miR-665 regulate metastasis dissemination *in vivo*. A, experimental schema. 1.5 mol/L HOS LucF GFP were injected paratibially in nude mice. At 200 mm³ tumor volume, mice were treated every 48 hours with 50 nmol/L pre-miR control (miR-ct group), pre-miR-527 (miR-527 group), or pre-miR-665 (miR-665 group). B, tumor progression was calculated as in Fig. 5. Average tumor volumes for miR-527, miR-665, or control groups over time are represented in the graph. Kruskal-Wallis test followed by Dunnett multiple comparison test were used. C, average number of metastasis found at tumor volume endpoint (2,500 mm³) for miR-565, or control groups. E, miR-665, or control groups. E, miR-527 and *SMAD4* expression levels were analyzed by qRT-PCR. F, miR-665 and $T\beta RI$ expression levels were analyzed by qRT-PCR. F, miR-665 and $T\beta RI$ expression levels were analyzed by qRT-PCR. All error bars show SEM for triplicate measurements from representative experiments. PT, primary tumors; MET, primary tumors that did not produce metastasis.

potential to miR-527 and miR-665, we observed a lower level of miR-527 or miR-665 in the metastatic nodules compared with the orthotopic tumor, and this difference was reflected functionally in a higher level of *SMAD4* or *TβRII*, respectively, in the metastatic lesions (Fig. 6E and F). These findings were further confirmed at the protein level through IHC for SMAD4 and p-SMAD3 (Supplementary Fig. S6A). Notably, the few metastases observed in the miR-527 and miR-665 groups express a lower level of *SMAD4* and *TβRII*, respectively, compared with the miR-ct group, validating their inhibition by miR-527 and miR-665. Correspondingly, IHC showed decreased SMAD4 and p-SMAD3 in these specimens (Supplementary Fig. S6B).

In keeping with a contribution of this pathway in carcinomas as well as mesenchymal tumors, we found a weak but statistically significant inverse correlation between $\Delta Np63$ and miR-527 in a small cohort of breast tumor specimens (Supplementary Fig. S6C), and the analysis of a larger cohort from GEO reveled again a weak but statistically significant inverse correlation between miR-527 and *SMAD4* (Supplementary Fig. S6D).

p63, miR-527, and miR-665 regulate a wound-healing pathway

Finally, we sought to discover the normal physiologic context for the regulatory network we had uncovered. Of immediate interest was wound healing, a biologic process involving complex regulation of various pathways including cell migration,

proliferation, and extracellular matrix remodeling, generally stimulated by TGF β and recently shown to involve $\Delta Np63\alpha$ (43–46). Thus, we asked whether the endogenous $\Delta Np63\alpha$ / miRNA network regulating the TGF^β pathway we identified was associated with a newly identified pathway controlling the normal wound-healing response. Recently, TGFB signaling has been described as switching off antimigratory miR-198 expression by downregulating the RNA-binding protein KSRP (47). Indeed, KSRP promotes the biogenesis of a subset of miRNAs harboring the GUG motif as in miR-198 within its terminal loop (48). Moreover, it has been demonstrated that phosphorylated R-SMAD proteins, the transducers of TGFβ signaling, activate the expression of a miRNA targeting KSRP (47). Supporting the link between our model and the wound-healing KSRP/miR-198 pathway (Fig. 7A), we noted that in our initial microarray analysis, shRNA-mediated inhibition of endogenous p63 resulted in a nearly 6-fold upregulation of miR-198 (Supplementary Fig. S1A). Further supporting this link, we found that the expression of KSRP is repressed by the expression of $\Delta Np63\alpha$ and increased following the expression of both miR-527 and miR-665. In keeping with regulation of this wound-healing pathway by the endogenous p63/miR-527/665 circuit, we observed that KSRP is up regulated by repression of endogenous p63, while repression of either endogenous miR-527 or miR-665 with anti-miRs leads to KSRP repression (Fig. 7C).



Figure 7.

p63, miR-527, and miR-665 regulate a wound-healing pathway. A, schematic representation of the interplay between the p63/miR-527/miR-665 pathway and the wound-healing *KSRP*/miR-198 pathway. B, *KSRP* expression level was analyzed by qRT-PCR after 48 hours overexpression of Δ Np63 α or shRNA against p63 and their respective controls in HOS cells and 029 cells, respectively. C, expression of the pre-miR-527, pre-miR-665, anti-miR-527, anti-miR-665, and their controls. D, miR-198 expression level was analyzed by qRT-PCR after 48-hour overexpression of Δ Np63 α or shRNA against p63 and their respective controls. D, miR-198 expression level was analyzed by qRT-PCR after 48-hour overexpression of Δ Np63 α or shRNA against p63 and their respective controls in HOS cells and 029 cells, respectively. E, expression of the pre miR-527, pre-miR-665, anti-miR-665, and their respective controls in HOS cells and 029 cells, respectively. E, expression of the pre miR-527, pre-miR-665, anti-miR-665, and their respective controls. All error bars show SEM for triplicate measurements from representative experiments.

We then validated directly the predicted consequences of these effects on miR-198 expression. As anticipated, miR-198 is repressed by the expression of Δ Np63 α and activated after repression of endogenous p63 (Fig. 7D). Conversely the overexpression of both miR-527 and miR-665 leads to expression of miR-198, while repression of these endogenous miRNAs with anti-miRs led to miR-198 repression (Fig. 7E). Thus, the p63/miR-527/665 circuit we have discovered is an endogenous regulator of the key wound-healing factors KSRP and miR-198.

Discussion

Metastatic dissemination of cancer is a complex and contextdependent process that is responsible for the vast majority of cancer lethality. Understanding the molecular details of this process will thus be critical for developing more effective therapeutics. Here we demonstrate that $\Delta Np63\alpha$, the major p63 isoform expressed in the epithelium and squamous malignancies including HNSCC, enhances TGFβ-dependent metastatic dissemination. This effect is mediated through direct inhibition of a miRNA transcriptional network involving miR-527 and miR-665. A key novel feature of our work is demonstrating how $\Delta Np63\alpha$ functions to control cellular microenvironmental cues via TGFB. In contrast to TAp63, which is proposed to be controlled by upstream TGF β /SMAD activation (19), we reveal a distinct pathway whereby $\Delta Np63\alpha$ controls downstream TGF β /SMAD activity. Supporting a selective role for Δ Np63 α in this mechanism, we provide evidence that this pathway is involved in the normal wound-healing response, which itself has been linked to $\Delta Np63\alpha$ (45, 46). Indeed, in the context of our orthotopic model, we observed substantially increased $\Delta Np63\alpha$ expression in the metastatic lesions relative to the respective primary tumors, and in advanced squamous carcinomas we have shown that $\Delta Np63\alpha$ mRNA levels exceed those of TAp63 by up to 200-fold (49). While multiple mechanisms including clonal selection or epigenetic regulation are likely to contribute to selection for $\Delta Np63\alpha$ in these distinct contexts, these findings collectively point to $\Delta Np63\alpha$ as a driver of tumor progression and metastasis.

Our data suggest that in a TGFβ-rich microenvironment, $\Delta Np63\alpha$ is a prometastatic transcription factor. This context and isoform-specific effect of $\Delta Np63\alpha$ may explain the lack of agreement in the literature on the contribution of this p63 isoform to cancer dissemination. One study showed that $\Delta Np63\alpha$ promotes tumor formation and metastasis through the regulation of *brachyury* expression, an important gene for limb development, which is also implicated in both EMT and mesenchymal-to-epithelial transition (20). Related to the EMT process, $\Delta Np63\alpha$ also promotes the expression of at least one important mesenchymal marker in bladder cancer as well as accelerates EMT in normal human keratinocytes (29). In contrast, other studies have reported p63 and/or $\Delta Np63\alpha$ as an antimetastatic factor, through the upregulation of caspase-1 and CD82 for example (50, 51). In addition, $\Delta Np63\alpha$ was shown to negatively regulate Erk signaling for further inhibition of cell migration and invasion in breast cancer (30).

Our study resolves some of these conflicting data by emphasizing the contribution of the tumor microenvironment. This is a parameter not accounted for in many studies in the field, yet so important for understanding the complexity of metastatic

dissemination. Including TGFB in the equation describing the role of p63 in metastatic dissemination helps clarify this role. Accordingly, we performed in vivo validation of our hypothesis in an orthotopic bone tumor model for two essential reasons. First, these cells express little or no $\Delta Np63\alpha$, providing us opportunity to experimentally introduce this protein to study its effects. Second and even more importantly, osteosarcoma develops in a bone microenvironment, the largest reservoir for TGFB (52). When tumor cells reach bony sites, a "vicious cycle" between tumor cells and local bony cells is established, resulting in a loss of equilibrium between bone resorption and bone matrix deposition. In the case of osteolytic metastatic lesions, the balance will bend towards the osteoclastic population, leading to a high bone resorption. Degradation of bone matrix releases high quantities of cytokines (TGF^β and IGF-1), which further enhance tumor cell proliferation that in turn will cause more osteolysis and liberation of TGFβ, both locally and in the general circulation (41). Thus, our findings demonstrate a general mechanism whereby $\Delta Np63\alpha$ -expressing cells, in a TGFβ-rich microenvironment, are positively selected during metastatic dissemination owing to the repression of miR-527 and miR-665 and the subsequent upregulation of two major proteins of the TGFB pathway: SMAD4 and TBRII. To demonstrate in vivo that the prometastatic activity of $\Delta Np63\alpha$ is mediated by the repression of miR-527 and miR-665, another control in vivo experiment might be performed where a group of mice injected with $\Delta Np63\alpha$ -overexpressing cells is also treated with miR-527 and miR-665.

Importantly, we provide evidence for the endogenous physiologic context in which this $\Delta Np63\alpha$ -mediated pathway normally functions. $\Delta Np63\alpha$ is an established mediator of epithelial regenerative proliferation that has been, not surprisingly, implicated in the wound-healing process (45, 46). In addition, it is well established that wound healing involves complex regulation of similar pathways as metastatic dissemination, including cell migration and extracellular matrix remodeling, generally stimulated by TGF β (43, 44). The physiologic relevance of our findings is therefore strongly supported by our demonstration of the connection between the $\Delta Np63\alpha$ /miRNAs network regulating the TGFβ pathway on the one hand, and TGFβ-dependent regulation of wound healing through KSRP/miR-198 on the other. By demonstrating the link between this metastatic network and the normal wound-healing response, this study reveals a new mechanism through which deregulation of p63 may contribute to human cancer.

In conclusion, we have uncovered a new miRNA network regulated by Δ Np63 α in the context of a TGF β -rich microenvironment. This network is involved in the physiologic regulation of wound healing, but is hijacked by the tumor to disseminate, making our discovery relevant in both physiologic and pathologic contexts. Our study opens some potential therapeutic possibilities. For example, miR-527 and miR-665 along with *SMAD4* and *T\betaRII* expression levels might be used clinically as biomarkers to determine whether or not patients are likely to develop metastasis. Ultimately, understanding such metastatic regulatory networks should also provide the opportunity for effective therapeutic intervention.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: F. Verrecchia, D. Heymann, L.W. Ellisen, B. Ory Development of methodology: L.R. Calleja, F. Verrecchia, B. Ory

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): L.R. Calleja, C. Jacques, F. Lamoureux, M. Baud'huin, M.T. Gabriel, C. Charrier, B. Ory

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): L.R. Calleja, C. Jacques, F. Lamoureux, M.T. Gabriel, D. Sahay, C. Charrier, D. Heymann, L.W. Ellisen, B. Ory

Writing, review, and/or revision of the manuscript: L.R. Calleja, F. Lamoureux, M.T. Gabriel, T. Quillard, P. Perrot, D. Heymann, L.W. Ellisen, B. Ory

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): L.R. Calleja, J. Amiaud, R. Brion, B. Ory Study supervision: L.R. Calleja, B. Ory

Other (contributed with samples and other clinical material and providing expertise on animal models): F. Lecanda

References

- Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. Cell 2009;137:413–31.
- Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. Mol Cancer Res 2004;2:371–86.
- Deyoung MP, Ellisen LW. p63 and p73 in human cancer: defining the network. Oncogene 2007;26:5169–83.
- Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, et al. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. Genes Dev 2008;22:2677–91.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. Nature 1999;398:714–8.
- Leong CO, Vidnovic N, DeYoung MP, Sgroi D, Ellisen LW. The p63/ p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers. J Clin Invest 2007;117: 1370–80.
- Sniezek JC, Matheny KE, Westfall MD, Pietenpol JA. Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma. Laryngoscope 2004;114:2063–72.
- Rocco JW, Leong CO, Kuperwasser N, DeYoung MP, Ellisen LW. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73dependent apoptosis. Cancer Cell 2006;9:45–56.
- Candi E, Rufini A, Terrinoni A, Dinsdale D, Ranalli M, Paradisi A, et al. Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: selective genetic complementation in p63 null mice. Cell Death Differ 2006;13: 1037–47.
- Romano RA, Smalley K, Magraw C, Serna VA, Kurita T, Raghavan S, et al. DeltaNp63 knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation. Development 2012;139:772–82.
- Su X, Paris M, Gi YJ, Tsai KY, Cho MS, Lin YL, et al. TAp63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance. Cell Stem Cell 2009;5:64–75.
- He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. Nature 2007;447: 1130–4.
- Ory B, Ramsey MR, Wilson C, Vadysirisack DD, Forster N, Rocco JW, et al. A microRNA-dependent program controls p53-independent survival and chemosensitivity in human and murine squamous cell carcinoma. J Clin Invest 2011;121:809–20.
- Pencheva N, Tavazoie SF. Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. Nat Cell Biol 2013;15:546–54.
- Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. Nature 2012;481:190–4.
- 16. Massague J. TGFbeta in cancer. Cell 2008;134:215-30.
- Taylor MA, Parvani JG, Schiemann WP. The pathophysiology of epithelialmesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta in normal and malignant mammary epithelial cells. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2010;15:169–90.

Grant Support

This article was written as a part of research project which received funding from the Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement $n^{\circ}264817$ – BONE-NET.L.W. Ellisen was funded by RO1 DE-015945. C. Jacques was funded by INSERM and Région Pays de la loire, Philippe Hulin, Nantes University, PICell for time-lapse microscopy.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received August 25, 2015; revised February 18, 2016; accepted March 4, 2016; published OnlineFirst March 17, 2016.

- Su X, Chakravarti D, Cho MS, Liu L, Gi YJ, Lin YL, et al. TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. Nature 2010;467:986–90.
- Adorno M, Cordenonsi M, Montagner M, Dupont S, Wong C, Hann B, et al. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. Cell 2009;137:87–98.
- Cho MS, Chan IL, Flores ER. DeltaNp63 transcriptionally regulates brachyury, a gene with diverse roles in limb development, tumorigenesis and metastasis. Cell Cycle 2010;9:2434–41.
- Danilov AV, Neupane D, Nagaraja AS, Feofanova EV, Humphries LA, Direnzo J, et al. DeltaNp63alpha-mediated induction of epidermal growth factor receptor promotes pancreatic cancer cell growth and chemoresistance. PLoS ONE 2011;6:e26815.
- Oh JE, Kim RH, Shin KH, Park NH, Kang MK. {Delta}Np63alpha protein triggers epithelial-mesenchymal transition and confers stem cell properties in normal human keratinocytes. J Biol Chem 2011;286: 38757–67.
- Patiño-García A, Zalacain M, Folio C, Zandueta C, Sierrasesúmaga L, San Julián M, et al. Profiling of chemonaive osteosarcoma and paired-normal cells identifies EBF2 as a mediator of osteoprotegerin inhibition to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. Clin Cancer Res 2009;15:5082–91.
- 24. Melino G. p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. Cell Death Differ 2011;18:1487–99.
- Gu X, Coates PJ, Boldrup L, Nylander K. p63 contributes to cell invasion and migration in squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Lett 2008;263:26–34.
- Barbieri CE, Tang LJ, Brown KA, Pietenpol JA. Loss of p63 leads to increased cell migration and up-regulation of genes involved in invasion and metastasis. Cancer Res 2006;66:7589–97.
- Yang X, Lu H, Yan B, Romano RA, Bian Y, Friedman J, et al. DeltaNp63 versatilely regulates a Broad NF-kappaB gene program and promotes squamous epithelial proliferation, migration, and inflammation. Cancer Res 2011;71:3688–700.
- Tucci P, Agostini M, Grespi F, Markert EK, Terrinoni A, Vousden KH, et al. Loss of p63 and its microRNA-205 target results in enhanced cell migration and metastasis in prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109:15312–7.
- 29. Tran MN, Choi W, Wszolek MF, Navai N, Lee IL, Nitti G, et al. The p63 protein isoform DeltaNp63alpha inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205. J Biol Chem 2013;288:3275–88.
- Bergholz J, Zhang Y, Wu J, Meng L, Walsh EM, Rai A, et al. DeltaNp63alpha regulates Erk signaling via MKP3 to inhibit cancer metastasis. Oncogene 2014;33:212–24.
- Thurfjell N, Coates PJ, Vojtesek B, Benham-Motlagh P, Eisold M, Nylander K. Endogenous p63 acts as a survival factor for tumour cells of SCCHN origin. Int J Mol Med 2005;16:1065–70.
- 32. Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA. The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14–3-3 sigma promoters in vivo and

has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. Mol Cell Biol 2003;23:2264–76.

- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. Nucleic Acids Res 2008;36(Database issue):D149–53.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res 2008;36(Database issue):D154–8.
- Harms K, Nozell S, Chen X. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. Cell Mol Life Sci 2004;61:822–42.
- DeYoung MP, Johannessen CM, Leong CO, Faquin W, Rocco JW, Ellisen LW. Tumor-specific p73 up-regulation mediates p63 dependence in squamous cell carcinoma. Cancer Res 2006;66:9362–8.
- Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. EMBO J 1998;17:3091–100.
- Celli J, Duijf P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP, et al. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. Cell 1999;99:143–53.
- Kozlow W, Guise TA. Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2005;10:169–80.
- Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Cespedes MV, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. Cancer Cell 2012; 22:571–84.
- Lamora A, Talbot J, Bougras G, Amiaud J, Leduc M, Chesneau J, et al. Overexpression of Smad7 blocks primary tumor growth and lung metastasis development in osteosarcoma. Clin Cancer Res 2014;20: 5097–112.
- 42. Rousseau J, Escriou V, Perrot P, Picarda G, Charrier C, Scherman D, et al. Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemother-

apeutic treatments in osteosarcoma preclinical models. Cancer Gene Ther 2010;17:387–97.

- 43. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. Nature 2008;453:314–21.
- 44. Hameedaldeen A, Liu J, Batres A, Graves GS, Graves DT. FOXO1, TGF-beta regulation and wound healing. Int J Mol Sci 2014;15: 16257-69.
- Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. DeltaNp63/ BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding. Biochem Biophys Res Commun 2008;369:994–1000.
- 46. Noszczyk BH, Majewski ST. p63 expression during normal cutaneous wound healing in humans. Plastic Reconstr Surg 2001;108:1242-7.
- Sundaram GM, Common JE, Gopal FE, Srikanta S, Lakshman K, Lunny DP, et al. 'See-saw' expression of microRNA-198 and FSTL1 from a single transcript in wound healing. Nature 2013;495:103–6.
- Trabucchi M, Briata P, Garcia-Mayoral M, Haase AD, Filipowicz W, Ramos A, et al. The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. Nature 2009;459:1010–4.
- Ramsey MR, Wilson C, Ory B, Rothenberg SM, Faquin W, Mills AA, et al. FGFR2 signaling underlies p63 oncogenic function in squamous cell carcinoma. J Clin Invest 2013;123:3525–38.
- Celardo I, Grespi F, Antonov A, Bernassola F, Garabadgiu AV, Melino G, et al. Caspase-1 is a novel target of p63 in tumor suppression. Cell Death Dis 2013;4:e645.
- Wu J, Liang S, Bergholz J, He H, Walsh EM, Zhang Y, et al. DeltaNp63alpha activates CD82 metastasis suppressor to inhibit cancer cell invasion. Cell Death Dis 2014;5:e1280.
- Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. J Biol Chem 2002;277:21352–60.

II.2.1.d. Complément de discussion à l'Article 4 :

Les résultats de la présente étude ont pu mettre en évidence que $\Delta Np63\alpha$ était un médiateur clé dans les processus de migration cellulaire conduisant à la dissémination métastatique des Carcinomes et des Sarcomes Osseux (Fig. 4B et 5D). Toutefois, au regard des données actuelles de la littérature, l'implication de cette isoforme dans les mécanismes migratoires a surtout été étudiée dans un contexte physiologique de cicatrisation. Ainsi, il est intéressant de noter que les résultats de notre étude sont en contradiction avec ceux de Ichikawa et al., qui rapportent, pour leur part, que ΔNp63 s'oppose à la migration de kératinocytes, justement requise dans un contexte de cicatrisation²³³. Selon les auteurs, Δ Np63 agirait en défaveur de ce processus en induisant l'expression de la **matriline-2**, de façon dépendante de BMP-7 et de Smad4. Il est intéressant de noter que nos travaux ont également rapporté que $\Delta Np63\alpha$ induisait l'expression de Smad4 (Fig. 3B), suggérant ainsi que le rôle de cette isoforme dans la migration cellulaire dépende du contexte environnemental et puisse être nuancé par le TGF-β ou les BMPs, ces deux facteurs contribuant à l'activation de la voie des Smads. Toujours en contradiction avec ce que nous avons pu montrer ici, une autre étude rapporte que $\Delta Np63\alpha$ s'oppose à la **TEM**, réduisant alors le potentiel métastatique des carcinomes épithéliaux²³⁴. Quoi qu'il en soit, dans le contexte tumoral de l'Ostéosarcome, la migration cellulaire semble toutefois être induite par ΔNp63 : nos résultats ont en effet été confirmés par l'étude de Cam et al., qui ont pu démontrer que cette isoforme promouvait la dissémination métastatique d'un modèle d'Ostéosarcome canin xénogreffé chez la souris²³⁵.

Le rôle oncogénique de $\Delta Np63\alpha$ a par ailleurs déjà fait l'objet d'études dans le contexte des Sarcomes Osseux. Son implication dans la progression tumorale de l'Ostéosarcome a ainsi été rapportée, notamment par l'intermédiaire de ses fonctions promotrices de l'angiogénèse²³⁶. Il a ainsi été montré que la surexpression de ΔNp63 dans ce modèle conduisait à une augmentation du niveau de phosphorylation de STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), contribuant alors à stabiliser HIF-1α (Hypoxia-**Inducible Factor 1** α) et à augmenter en conséquence la sécrétion de VEGF par ces cellules. Par ailleurs, la surexpression artificielle de ANp63 dans la lignée d'Ostéosarcome SaOS2, a révélé qu'en se fixant directement au promoteur de Gli1, cette isoforme induisait l'expression de ce médiateur de la voie HH, contribuant alors à la progression tumorale de l'Ostéosarcome²³⁷. Le même type de surexpression artificielle de ΔNp63 dans la lignée SaOS2 a également permis d'identifier son effet transactivateur de l'expression du gène S100A2, codant pour une protéine de liaison aux ions Ca²⁺, préalablement caractérisée par son implication dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire²³⁸. Il est toutefois important de souligner que certains travaux dénotent une surexpression endogène de ΔNp63 dans l'Ostéosarcome, que nos analyses transcriptionnelles et protéigues n'ont pas permis de confirmer (datas non montrées)²³⁶. Toutefois, en accord avec nos résultats, Ram et al., ont pu rapporter l'absence d'expression de ΔNp63α dans les lignées d'Ostéosarcome humaines **non-invasives** SaOS2, HOS et MG63, alors que cette dernière constitue l'isoforme **prédominante** de p63 dans les lignées **invasives** de ce cancer²³⁷. La surexpression de Δ Np63 a également été rapportée dans des lignées d'Ostéosarcome canin, dans lesquelles son inhibition induit l'expression des facteurs po-apoptotiques **Noxa** et **PUMA**, indépendamment de p53²³⁵. En lien avec ces données, une étude récente a rapporté que des tumeurs spontanées induites par ablation de p53 dans des cellules épithéliales, **perdaient l'expression de \DeltaNp63 au cours des stades précoces** du développement tumoral, cette isoforme étant ensuite **ré-exprimée** dans les **lésions métastatiques** pulmonaires²³⁴. Ces données soutiennent ainsi nos résultats à la faveur du rôle pro-métastatique de Δ Np63α *in vivo*.

Les résultats de notre étude ont montré que les fonctions pro-métastatiques de Δ Np63 α dans l'Ostéosarcome étaient dues à son rôle inhibiteur de l'expression de miARNs impliqués dans la régulation de la voie du TGF- β (Fig. 1B, 1C et 1D). Pour autant qu'elle régule l'expression de miARNs, il est intéressant de noter que cette isoforme est également elle-même sujette à des régulations par les miARNs. Il a notamment été montré que le miR-203 ciblait directement la partie 3'UTR de Δ Np63, contrôlant ainsi non seulement le potentiel de prolifération de précurseurs épithéliaux et de cellules de carcinome de l'œsophage, mais aussi le processus de différenciation kératinocytaire^{239,240}. Malgré le fait qu'aucune interaction directe n'ait pu être mise en évidence, l'équipe de Liang et al., a tout récemment rapporté que le miR-140 présentait des fonctions d'inhibiteur de Δ Np63²⁴¹. Ce groupe a en effet pu montrer que la surexpression ectopique de ce miARN dans des cellules d'adénocarcinome pancréatique diminuait l'expression de Δ Np63 au niveau protéique et réduisait le pouvoir invasif de ces cellules *in vitro*, confirmant encore une fois le rôle promigratoire de cette isoforme.

Même si nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux miR-527 et -665, nos analyses par puces à miARNs ont pu montrer que Δ Np63 régulait l'expression d'un ensemble d'autres miARNs (**Fig. 1B et Supp Fig. 1A**). En accord avec ces résultats, des études plus approfondies ont ainsi pu mettre en lumière certains liens entre cette isoforme et d'autres miARNs. En se fixant directement dans sa région promotrice, Δ Np63 activerait ainsi directement l'expression du **miR-944**, contribuant alors à la **différenciation** des cellules de l'épiderme²⁴². De plus, les effets anti-TEM de Δ Np63 α dans les cancers épithéliaux, évoqués dans le paragraphe précédent, seraient attribuables à son pouvoir de modulation de l'expression d'un panel de miARNs-cibles, connus pour leurs implications dans la **dissémination métastatique**, tels que les miR-19a, -21, -34a, -200a, -200b, -203 et -205 par exemple²³⁴.

Nos résultats ont enfin pu démontrer qu'en **réprimant l'expression des miR-527 et -665**, $\Delta Np63\alpha$ permettait d'activer la voie de signalisation du TGF- β , inhibant en conséquence l'expression de KRSP, un inducteur de l'expression d'un miARN anti-métastatique, le **miR-** **198 (Fig. 7A à 7E)**. Nous avons par ailleurs pu démontrer que l'inhibition de **KSRP** et du **miR-198** induite par $\Delta Np63\alpha$ était un des mécanismes participant à l'activation des voies de **cicatrisation cellulaire**. Ces résultats ont été tout récemment confirmés par Puppo et al., qui rapportent que la **répression** de **KRSP** par le **miR-27b-3p** soit un des mécanismes nécessaires à l'exécution de la TEM induite par le **TGF-** β , dans des cellules mammaires²⁴³. Faisant lien avec l'étude de Boldrup et al., évoquée dans l'introduction de cet article et qui rapportait que **p63** induisait la surexpression et l'épissage alternatif de **CD44**, ce groupe a également pu montrer que **KSRP** contrôlait l'épissage alternatif de ce facteur ^{230,243}. Ces données sont ainsi en accord avec nos résultats et suggèrent que les interactions entre $\Delta Np63\alpha$, **KSRP** et le **CD44** contribuent aux processus de cicatrisation cellulaire et de dissémination métastatique.

L'ensemble de ces résultats a pu permettre d'illustrer l'implication des miARNs dans le processus de **dissémination métastatique** et amène à se questionner sur l'**identification** et le **mode d'action** de nouveaux miARNs impliqués dans un tel mécanisme, dans le contexte de l'Ostéosarcome.

II.2.2. Implication des miARNs -198 et -206 dans la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome :

Article 5: "La perte d'expression des miARN-198 et -206 au cours de la progression tumorale permet la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome" :

(Article en cours de soumission)

Lidia Rodriguez Calleja, Camille Jacques, Fernando Lecanda, Dominique Heymann, Benjamin Ory.

II.2.2.a. Introduction à l'Article 5 :

La dissémination métastatique est un processus biologique complexe, multi-étapes, par lequel les cellules tumorales initialement confinées au niveau de leur site de développement primaire, vont gagner les systèmes de circulation systémiques et se propager dans l'organisme pour former des tumeurs secondaires ou métastases. L'hétérogénéité cellulaire des tumeurs primaires fait qu'une minorité de ces cellules seulement soit génétiquement parée pour accomplir l'ensemble des étapes de ce processus. Malgré tout, la dissémination métastatique demeure toujours une des manifestations principales de la récidive de l'Ostéosarcome, malgré sa prise en charge thérapeutique.

Comme l'étude précédente a pu le démontrer, les régulations épigénétiques relayées par les **miARNs** peuvent contribuer à la progression tumorale et la **dissémination métastatique** de l'Ostéosarcome. Toutefois, les implications exactes de ces petites molécules sont encore trop peu documentées dans ce contexte et une meilleure **identification** de ceux régulant ce processus pourrait aider les cliniciens dans l'amélioration de la prise en charge thérapeutique de cette pathologie.

Dans le but d'identifier de **nouveaux miARNs** impliqués dans la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome, la démarche initiale de cette étude a consisté à analyser le **profil d'expression** de ces petits régulateurs épigénétiques dans des biopsies issues de tumeurs primaires et de métastases d'Ostéosarcome. Pour ce faire, un modèle murin de xénogreffe d'Ostéosarcome a été employé, généré par injection paratibiale d'une lignée humaine d'Ostéosarcome modifiée, la lignée MNNG-HOS exprimant la **GFP** (**Green Fluorescent Protein**) (**Fig. 1A et 1B**). Des **échantillons** des **tumeurs primaires** (**TPs**), des **cellules tumorales circulantes** (**CTCs**) et des **métastases pulmonaires** associées (**METAs**) ont ensuite été biopsiées et le profil d'expression des miARNs a pu être comparé entre ces différents types de prélèvements (**Fig. 1B et 1C**).

Cette analyse a pu montrer que le niveau d'expression des **miR-198** et **-206** était considérablement réduit dans les prélèvements issus des METAs comparativement à ceux des TPs (**Fig. 1C, 1D et 2A**), alors qu'inversement, celle du **récepteur oncogénique C-Met** était augmentée dans ces échantillons (**Fig. 2A**). Nos analyses *in silico* ayant justement

rapporté le ciblage potentiel de ces deux miARNs vis-à-vis de C-Met, une démarche de modulation artificielle de leur niveau d'expression a été menée, dans une optique de validation fonctionnelle de l'authenticité de cette interaction. Des transfections transitoires de miARNs synthétiques (pré-miARNs) ou d'inhibiteurs de ces miARNs (anti-miARNs) ont ainsi été réalisées dans la lignée d'Ostéosarcome MNNG-HOS. Nous avons pu noter que ces transfections faisaient varier l'expression de C-Met ainsi que les niveaux de phosphorylation d'Akt et de ERK 1/2, deux voies de signalisation dont l'activation dépend de C-Met, ceci laissant supposer d'une fixation directe des miARNs sur ce récepteur (Fig. 3A, 3B et 3C). Le caractère direct de cette interaction a finalement pu être validé par les mêmes techniques de modulation d'expression des miARNs, en présence de vecteurs-rapporteurs dont la séquence codant le gène de la luciférase a été fusionnée avec la partie 3'-UTR de C-Met (Fig. 3D).

Les effets inhibiteurs des miR-198 et -206 sur les capacités migratoires et invasives des cellules d'Ostéosarcome ont par ailleurs pu être mis en évidence *in vitro* par des techniques de Chambres de Boyden et des tests de scratch (Fig. 4A, 4B et Supp Fig. 1A). Ces effets pourraient être liés à l'inhibition des Métalloprotéinases matricielles induite par ces miARNs, l'augmentation de leur niveau d'expression diminuant celle de la MMP1 (Supp Fig. 1A, 1B et 1C). Ces résultats ont pu être confirmés *in vivo*, l'injection intra-tumorale des prémiARNs synthétiques dans notre modèle murin de xénogreffe d'Ostéosarcome humain ayant permis de réduire le nombre de métastases pulmonaires chez les animaux ainsi traités (Fig. 5A, 5D et 5E). Un ralentissement de la croissance tumorale, de même qu'une augmentation de la survie globale ont également été rapportés dans le groupe d'animaux traités (Fig. 5B et 5C). Par ailleurs, des analyses par Western Blots ont permis de souris ayant reçu un traitement par le pré-miR-206 en comparaison de celles du groupe Contrôle (Supp Fig. 2A et 2B).

L'ensemble de ces résultats tend donc à montrer que les miR-198 et -206 s'opposent à la migration cellulaire et la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome, via leurs capacités de ciblage direct du récepteur oncogénique C-Met, inhibant alors son expression et son activité. La sous-expression de ces deux miARNs dans des biopsies de METAs pulmonaires humaines et murines, associée à la surexpression de C-Met dans ces mêmes échantillons, comparativement aux TPs dont elles dérivent, suggèrent que ces dérégulations contribuent à la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome. Cette étude permet ainsi de conclure que la perte d'expression de ces miARNs par certaines cellules des TPs leur permette finalement de surexprimer C-Met et d'activer en conséquence les voies de signalisation Akt et ERK 1/2, ce mécanisme contribuant alors à l'acquisition de leur pouvoir métastatique. Par ailleurs, cette étude apporte la preuve de concept que la restauration du niveau d'expression des miR-198 et -206 par injection intra-tumorale, permette de réduire ce mécanisme d'échappement, soulignant ainsi tout le potentiel d'application thérapeutique de ces deux molécules.

II.2.2.b. Article 5: "Loss of miR-198 and -206 during primary tumor progression enables metastatic dissemination in an Osteosarcoma model" (Article en cours de soumission)

Lidia Rodriguez Calleja, Camille Jacques, Fernando Lecanda, Dominique Heymann, Benjamin Ory.

Loss of miR-198 and -206 during Primary Tumor Progression enables

metastatic dissemination in an Osteosarcoma model

Rodriguez Calleja Lidia^{1, 2*}, Jacques Camille^{1,2*}, Lecanda Fernando³, Heymann Dominique^{1,2},

Ory Benjamin^{1,2}.

¹INSERM, UMR-S 957, 1 Rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France
²Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, EA3822, 1 Rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France
³Division of Oncology, Adhesion and Metastasis Laboratory, Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, Pio XII-55, Pamplona, Navarra, 31008, Spain
* Co-first authors

Corresponding author:	Benjamin Ory, PhD, Associate Professor
	INSERM, UMR-S957
	1 Rue Gaston Veil
	44035 Nantes, France
	Email: Benjamin.ory@univ-nantes.fr

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest

Abstract

The metastatic dissemination is a complex multistep process by which tumor cells from a primary site enter into the systemic circulation to finally spread at distant sites into the body. Even if this mechanism requires the tumor-cells to acquire specific features and occurs only in a few of them, it remains the major cause of Osteosarcoma-patients' relapse and mortality. MicroRNAs (miRNAs) have recently been described as novel epigenetic regulators actively implicated in cancer progression and dissemination through their ability to modulate the genes' expression. Nonetheless, their implication in the metastatic spreading of the Osteosarcoma is not well understood and a better delineation of the ones implicated in this process could help clinicians to improve its outcome. In order to identify miRNAs implicated in the metastatic dissemination of Osteosarcoma, we established the miRNA's expression-profile between primary bone-tumors (PTs), circulating tumor cells (CTCs) and lung metastatic (META) samples from in vivo mice xenograft models. In particular, our results show that the expression level of the miR-198 and -206 was drastically decreased in META samples, in which the expression of the metastasis-related receptor C-Met was rightly up-regulated. Through in vitro artificial modulations of the endogenous level of these miRNAs, we highlighted their inhibitory effects on both the migrative and the invasive capabilities of the Osteosarcoma cells as well as we confirmed by luciferase assays that the C-Met receptor is one of their bona-fide targets. Besides, we have also shown that the miRNAmediated C-Met inhibition consequently impacts the activation of two of the C-Met's downstream pathways, the Akt and the ERK ½ ones. The anti-metastatic effect of these miRNAs was also validated in vivo, as their direct injections into the tumors reduce the number of lung-metastases and prolongs the overall survival of the treated animals. All together, our results suggest both the role of the miR-198 and -206 as powerful predictive biomarkers of the tumor cell dissemination and the rationale of their potential therapeutic use in the treatment of Osteosarcoma.

Introduction

With an incidence of 4 to 5 cases per million diagnosed in the United-States, Osteosarcoma is the most common primary malignant bone-tumor [1, 2]. It mainly affects children and young adults and is characterized by an osteoid neo-formation associated with osteolysis, principally occurring at the metaphysis of the long bones [3]. The current treatments of this disease are usually based on a combination of surgery and chemotherapy which have markedly improved the five-year survival rate until 60-70%. However, a significant proportion of the patients still responds poorly to chemotherapy regiments and has a high risk of local relapse or distant metastasis spreading, even after surgical resection [4, 5]. The achievement of the drug's toxicity thresholds and the presence of lung metastasis at the diagnosis time-point are the two major hindrances of the proper Osteosarcoma's cure. Despite all the therapeutic-optimization's efforts, the metastatic dissemination still dramatically compromises the cancer patients' survival and a better understanding of its underlaying mechanisms is needed.

Several studies support the implication of the well known Hepatocyte Growth Factor (HGF) Receptor, C-Met in the regulation of the metastatic dissemination in a wide variety of malignancies including hepatocellular carcinoma [6], lung [7], breast [8] and colon cancers [9], as well as Osteosarcoma [10]. Understanding the mechanisms which modulate the expression of this receptor is thus of particular interest in this context, especially the epigenetic ones, involving the microRNAs.

MicroRNAs (miRNAs) are small, 18- to 24nucleotides non-coding RNAs that regulate gene expression by targeting the 3' untranslated region (3'UTR) of messenger RNAs (mRNAs), resulting in either mRNA cleavage or protein-translation's repression [11, 12]. Since the discovery of the first development-related miRNA in C. elegans [13], hundreds of others have been identified in many species, including Homo sapiens [14]. These epigenetic regulators are involved in plethora of natural biological processes such as proliferation, differentiation, development or apoptosis, but they have also been found to play a major role in tumorigenesis [15, 16]. Indeed, as their expression is often altered in cancer, their deregulation is furthermore frequently associated with the pathological stage of the disease. For instance, it

was reported that such deregulation affects the Osteosarcoma progression, chemoresistance and metastatic dissemination [5]. The miR-183 was found to be down-regulated indeed in Osteosarcoma and its expression level was correlated with the one of the Ezrin, a protein that affects motility and invasion and which also confers the required survival advantages allowing the cells to reach the lungs [17]. In addition, it was demonstrated that restoring the miR-143's expression in Osteosarcoma cells has functional effects both in vitro and in vivo, as it reduces the cell viability, induces apoptosis and suppresses the lung metastases [18]. Such effects were mediated through its ability to target the anti-apoptotic factor BCL-2. Finally, the miR-26a and -454 were also down-regulated in Osteosarcoma and as the expression of the former correlates with the poor prognosis of the patients and their metastatic occurrence, the latter displays anti-proliferative and anti-invasive features through its direct targeting of C-Met [19, 20]. All those evidences sustain that the miRNAs are promising tools in an attempt to better understand the processes that drive malignancies, from their onset to their metastatic spreading. In line with these considerations, the miRNA-mediated control of the C-Met receptor's expression is of particular interest in the context of the Osteosarcomas' metastatic dissemination.

This was thus the purpose of this study, whose the departing point was to analyze the miRNA expression-profiles from primary bone tumors (PTs), Circulating Tumor Cells (CTCs) and lung metastases (METAs) from an in vivo xenograft model of Osteosarcoma. We identified both the miR-198 and the miR-206 as two miRNAs only expressed in PTs. We have shown that their loss by some tumor cells permit them to acquire migrative and invasive capabilities, allowing them to detach from primary tumor sites, enter into the systemic circulation and grow at distant sites. By artificially modulating their expression in Osteosarcoma cells and by performing in vitro luciferase reporter assays, we confirmed that the Hepatocyte Growth Factor Receptor C-Met was a bona-fide target of these miRNAs. Such results consequently corroborate the fact that an increased expression of this receptor was found in metastases samples from both our in vivo model and from Osteosarcoma patients.

In a clinical approach, our work thus adds a novel glimpse at the possibility to use the miR-198 and -206 as novel molecular prognosis markers of the Osteosarcoma's metastatic spreading. In addition, this study shed lights on the potentiality to avoid the poor outcome of Osteosarcoma through restoring a sufficient expression level of these miRNAs into the tumors, which could be a hopeful therapeutic strategy for the future.

Results

<u>A set of miRNAs differentially expressed in</u> primary tumors (PTs), Circulating Tumor Cells (CTCs) and Metastatic samples (METAs) potentially targets the C-Met receptor for inhibition.

In order to better understand to what extent the miRNAs could be involved in the metastatic spreading of the Osteosarcoma, we analyze the miRNA-profiles of bone PTs, CTCs and lung META samples obtained from an in vivo orthotopic mice model. 1.5 million of human Osteosarcoma HOS LucF-GFP cells were thus paratibially injected in athymic mice (Fig. 1A upper panel). The tumor growth was assessed and the animals were sacrificed when the tumor's volumes reached 2500 mm³ (Fig. 1B). At the time of euthanasia, samples of both the bone PTs and METAs were collected from the lungs of the animals, as they are the preferentially site for metastases in this model. CTCs were isolated from the systemic blood by cell sorting facilities, based on the granulometry, the size and the GFP-fluorescence properties of the injected tumor cells. An average of three hundred CTCs were isolated in each experiment (Fig. 1A bottom panel).

The total RNA of each kind of sample was extracted and the expression-profile of 760 knownmiRNAs was established by performing Tagman arrays (TLDAs). The low-density miRNA's expression-profiles obtained in the META samples were normalized on the ones of the PTs samples in two independent experiments (Fig. 1C). To go further in our study, the strategy chosen was to focus only on the miRNAs found in PTs whose the expression is lost during the course of the metastatic spreading. It suggests that the targetgenes normally repressed by these anti-metastatic miRNAs are involved in pathways of paramount importance in promoting the migration of the cancer cells. Eight miRNAs were thus identified as being the most under-expressed in the metastatic cells compared to the PTs (Fig. 1D).

These candidate miRNAs were then subjected to *in silico* analyses thanks to the algorithms provided by TargetScan, DianaLab and miRANDA databases, in order to identify common putative targets involved in the metastatic dissemination.

These analyses reveal that four of them; namely the miR-133b, -198, -206 and -582-5p were predicted to target the C-Met receptor, a well-

known protein that triggers the metastatic C-Met pathway (**Fig. 1D, bolded miRNAs**).

<u>Candidate miRNAs are only expressed in</u> <u>Osteosarcoma primary tumors (PTs) and C-Met is</u> <u>overexpressed in the lung-metastasis (META)</u> <u>samples from both mice and from patients.</u>

To then confirm that the four previously selected miRNAs, namely the miR-133b, -198, -206 and -582-5p are indeed under-expressed in the META samples compared with the PTs ones, we analysed their expression by RT-qPCR in each PT sample and the corresponding META from our initial in vivo model. We could indeed validate the TLDA's results, as the miR-133b and -198 were found to be expressed 5-fold and 8-fold more respectively, in PTs compared with METAs (Fig. 2A). In addition, the expression of the miR-206 is almost ablated in METAs, which perfectly reproduces the previous Taqman results. The miR-582-5p also follows the same expression-profile with however a less pronounced variation, namely less than 2-fold.

Because all the candidate miRNAs are predicted to target the C-Met receptor or are already validated as *bona-fide* C-Met inhibitor, the mRNA level of this gene was also assessed in the same samples. Interestingly, and inversely to the candidate miRNAs, we found that the C-Met receptor is a little more expressed in METAs than in PTs samples (**Fig. 2A**).

In order to confirm and to give more accuracy to our in vivo results, we performed the same analyze with samples from four metastatic Osteosarcoma patients. The expression of the four candidate miRNAs was thus analyzed by RT-qPCR in PTs and in their corresponding METAs. As observed in the in vivo model, all the microRNAs except the miR-582-5p, are more expressed in PTs than in METAs. The expression of the miR-133b was indeed decreased by 2.5-fold, the one of the miR-198 by 1.4-fold and the one of the miR-206 by 2.6-fold (Fig. 2B). Consistent with the miRNAs' expression, we found that their putative target c-Met was 2-fold more expressed in METAs than in PTs. Given the inconsistent results obtained with the miR-582-5p regarding our starting hypothesis, this miRNA was excluded from the further investigations.

All this data contributes to establish the rationale of the starting hypothesis suggesting that the loss of expression of the candidate miRNAs by some tumor cells located within the heterogeneous primary Osteosarcoma is a selecting factor for them in order to spread into the whole body (**Fig. 2C**). As these miRNAs are potential or validated repressors of C-Met, their lost in such cells could result in an increased expression of this receptor, thus allowing them to succeed in the setting of the metastatic nodules.

miR-198 and -206 inhibit the C-Met's translation into protein through a direct targeting and consequently modulate the C-Met's downstream pathways' Akt and the ERK ½.

After confirming that the loss of expression of the miR-133b, -198 and -206, altogether with the concomitant up-regulation of C-Met was a feature of the cells from Osteosarcoma-metastases, we would like to confirm if the C-Met receptor is indeed a bona-fide target of these miRNAs. Through an *in vitro* approach, we artificially modulated the expression level of the three candidate miRNAs, by transfecting either the premiRNAs (miRNA mimics) or their corresponding anti-miRNAs (antisense oligonucleotides, complementary to the specific target-miRNA, inducing its degradation [21]) into HOS LucF-GFP Osteosarcoma cells. The expression of *C-Met* was assessed at mRNA level 72 hours after transfections and no significant differences were observed regarding the miRNAs-levels' modulations (Fig. 3A).

However, as miRNAs can regulate the gene's expression by only preventing the proteintranslation instead of directly inducing the degradation of the corresponding mRNA [22], the miRNA-mediated inhibition of C-Met could happen through this way. To confirm it, the C-Met protein's expression was thus analyzed by Western blotting 48 hours after the transfections of our three candidate pre-miRNAs or anti-miRNAs (Fig. 3B). Although only a slight reduction of the C-Met's expression was observed consequently to the premiRNAs transfections (Fig. 3B right panel), it is obvious that an increased expression of the receptor was obtained when the endogenous miRNAs are inhibited, in particular in the anti-miR-198 and -206's conditions (Fig. 3B right panel).

To functionally support the inhibitorypower of these miRNAs on the expression of C-Met, we assessed the activation's status of the Akt and the ERK ½ signaling, two of the C-Met's downstream pathways. We thus evaluated the phosphorylation level of Akt and ERK ½ by Western blotting, forty-eight hours after either the premiRNAs or the anti-miRNAs' transfections (**Fig. 3C**). Although they have no effect on the total Akt amount, all the miRNAs reduce the P-Akt level, especially the miR-198 (**Fig. 3C, left panel**). Furthermore, they also inhibit the activation of the MAPK pathway, as illustrated by the reduced intensity of the 44 kDa-ERK1-corresponding bands. As expected, the anti-miRNAs, in particular the miR-133b and the -206 ones display the opposite effect on this pathway, by increasing the phosphorylation level of both ERK1 and 2 (**Fig. 3C, right panel**). Surprisingly, and contrary to all expectations, the anti-miRs seem to decrease the phosphorylation of Akt. Nevertheless, this data even support that these miRNAs have functional consequences on the regulation of pathways that are normally activated by the C-Met receptor.

Finally, to further assess if the candidate miRNAs rightly modulate the C-Met's expression through a direct targeting, we performed a luciferase reporter assay, by transfecting a luciferase-bearing vector in which the 3'UTR of C-Met replaces the one of the luciferase gene. Such vectors were thus concomitantly transfected with each candidate pre- or anti-miRNA and the luciferase activity was measured forty-eight hours after transfections. A significant decrease in the bioluminescence was observed consequently to the pre-miRNA-198 and -206's transfections, namely from 37 and 45% respectively compared to the control conditions, meaning that both miRNAs are truly able to bind to the 3'UTR of C-Met (Fig. 3D left panel). Nonetheless, no similar effect was observed with the pre-miR-133b. On the contrary and as expected, an increase in the measuredbioluminescence was obtained in the case of the anti-miRNAs' transfections compared with the control conditions, even if the changes monitored were not statistically significant (Fig. 3D right panel).

Curiously, even if Hu et al., have previously demonstrated the direct targeting of C-Met by the miR-133b in a colorectal cancer model [23], the inconsistency in the results of both the luciferaseassay and the Western Blot analysis obtained with this miRNA does not allow us to get the same conclusion, thus we have chosen to exclude this miRNA from further studies. Notwithstanding, and according to the studies from Tan et al., and from Yan et al., this data gives evidence that C-Met is a *bona-fide* target of both the miR-198 and -206, these ones exerting their epigenetic inhibitory functions through preventing the translation of this receptor into protein [24, 25].

The miR-198 and -206 inhibit both the in vitro migrative and invasive capabilities of the Osteosarcoma cells.

As previously described in the literature and as sustained by our results, it is well established that the C-Met receptor is implicated in the control of several signaling pathways, including the ERK 1/2 and the Akt ones, which further regulate the cellular proliferation, migration and invasion. In line with this consideration and given the C-Met's targeting capabilities of the miR-198 and -206, the functional effects of these miRNAs in controlling the cellular migration was assessed by performing in vitro Boyden Chamber assays. The two miRNAs studied display significant effects on the migrative potential of the Osteosarcoma cells in vitro, as the pre-miR-198's transfections decreased the migration by 27.3% whereas the pre-miR-206's ones reduced it by 34.2% compared to the Control pre-miR's conditions (Fig. 4A, left panel). Consistently, inhibiting these endogenous miRNAs with anti-miRNAs stimulated the cells' migration (by 16.23% and 16.86% for the anti-miR-198 and the -206 one, respectively) compared to the Control anti-miR (Fig. 4A, right panel). Such results thus sustain the inhibitory effect of these miRNAs on the migrative capabilities of the Osteosarcoma cells.

For further evidence, we also performed a wound-healing assay in which a scratch was done in the HOS cells' layer, 48h after their transfection with the candidate pre-miRNAs or anti-miRNAs. In such assays, the pre-miRNAs-transfected cells display early-reduced recovering features, still noticeable 12 hours after performing the scratch, compared with the control conditions (**Supp. Fig. 1A, left panel**). Withal, the stimulating effects of the anti-miRNAs on the migration were barely detectable in this assay (**Supp. Fig. 1A, right panel**).

We then wondered if the miR-198 and -206 also modulate the invasive properties of the Osteosarcoma cells. Matrigel-coated Boyden Chamber assays reveal that in the pre-miRNAs' transfections' conditions, the invading cells' proportion was decreased by more than 70% for each miRNA, compared to the control conditions (Fig. 4B left panel). Moreover, the transfections with the antagonists, especially the one with the anti-miR-198, induced an increase in the invasive capacities of the cells, which were enhanced by 287% in this case (Fig. 4B right panel).

As the invasive capabilities of the cells are often correlated with the expression of the Matrix

Metalloproteinases (MMPs), we wondered if the miRNAs of interest inhibit the Osteosarcoma cell's invasiveness through modulating the expression and/or the activity of the MMPs. Our qPCR results show that the miR-133b, -198 and -206 are all able to reduce the MMP1's expression whereas neither seem to impact the MMP2's one (Supp. Fig. 1B). In addition, only the miR-206 displays a slight inhibitory effect on the MMP9's expression. We completed this study by assessing the activity of the MMPs in the culture media through zymography assays from the proteins secreted by the malignant cells. The results show that both the MMP2's and the MMP9's activities are reduced after increasing the miR-133b's expression only (Supp. Fig. 1C). Taken together, this body of data argues for the crucial role played by the miR-198 and -206, not only on the migration, but also in the invasion process, two prerequisite steps contributing to the metastatic-nodules formation.

As the cell survival is another biological aspect sustained by the activation of the C-Met receptor and its downstream pathways, we finally checked the implication of the miR-198 and -206 in modulating this component. However, the WST-1 assays results show no significant differences in terms of viability in cells overexpressing either the miR-198 or the miR-206 compared to the control cells (Fig. 4C). Nonetheless, this data sustains that these miRNAs' effects, previously observed on both the migrative and the invasive capabilities of the Osteosarcoma cells, are only attributable to their inhibitory effects on pathways directly related to these functions and are not caused by modulations in the cell survival, arguing still here for their anti-metastatic role.

<u>The miR-198 and -206 reduce the metastatic</u> <u>spreading of Osteosarcoma in a HOS LucF-GFP</u> <u>xenograft model and prolong cancer-specific</u> <u>survival.</u>

To finally support the *in vitro* antimigrative capabilities of the miR-198 and -206, we assessed their power in further inhibiting the *in vivo* metastatic dissemination of Osteosarcoma. We thus used an Osteosarcoma xenograft model in which athymic mice were paratibially injected with 1.5 million HOS LucF-GFP cells. The mice received either the pre-miR Control (Ct), the pre-miR-198 or the pre-miR-206 as intra-tumoral injections, three times a week, since the tumor volumes reached approximately 100 mm³ (**Fig. 5A**). The average tumor growth was followed in each group until the time of euthanasia, where the lungs were dissected and subjected to a luciferase-monitored counting of the metastasis number.

As the miR-198 doesn't display a significant effect on the tumor growth after the forty-seventh day following the tumor cells injection, the miR-206's injected group shows a slowed tumor progression (**Fig. 5B**). Furthermore, the intra-tumoral's miRNAs' injections significantly improve the overall mice-survival (**Fig. 5C**).

Moreover, although about 78% of the animals develop metastasis in the Control group, only 25 and 56% display any lung-metastases in the pre-miR-198 and -206 injected groups, respectively (**Fig. 5D**). In addition, both miRNAs reduce the number of the lung-metastases developed by the animals, especially the miR-198 that decreases by about four times the average metastatic spreading compared with the Control miRNA's injected group (**Fig. 5E**). So, used as therapeutics these miRNAs not only impact the number of the animal-bearing metastasis, but also the average metastasis number per animal.

In addition, the protein expression of C-Met in PT samples from the miR-206's injected group is reduced compared with the Control one (**Supp. Fig. 2A, B**), thus reinforcing the demonstration of the *in vivo* inhibitory effect of this miRNA on its target and its consequent impact on the metastasis occurrence.

These data thus bring the proof of concept of the use of these miRNAs as potential therapeutic tools in order to control the metastatic spreading of the Osteosarcoma.

Discussion

The metastatic spreading of the tumor's cells is one of the main causes of the cancertherapies' failure, especially in Osteosarcoma in which only few therapeutic options are available. As this multistep-process depends on the intrinsic properties of the tumor cells and the treatmentresponses from the patients, it seems obvious that this evasion-mechanism is regulated by both genetic and epigenetic components [26]. Its genetic-related fraction can at least partially correspond to the accumulation of oncogenes' activating-mutations by the most genetically unstable cells within the heterogeneous primary tumor. Such mutations-bearing cells can thus be subjected to the so-called Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT), allowing them to detach from the bone-primary site, enter into the circulation, extravasate and thereby grow at secondary organs, preferentially the lungs in the case of the Osteosarcoma [27]. Even if Osteosarcoma cells are not epithelial, a mechanism similar to EMT can still be observed, presenting similar features [28, 29].

Furthermore, beyond the mutational processes undergone by oncogenes, their epigenetic modulation through the miRNAsilencing machinery is another alternative way to control their expression level, consequently impacting the metastatic dissemination. Even if some studies have already demonstrated the implication of such tumor-suppressor miRNAs in the metastatic-dissemination of Osteosarcoma, their precise functions still need to be deciphered in this context. For instance, it was reported that the miR-26b inhibits the metastatic spreading of this cancer through both its CTGF and Smad1 direct targeting [30]. In addition, the miR-33b-mediated inhibition of C-Myc was reported to decrease both the migrative and the invasive properties of the MG63 Osteosarcoma cells in vitro [31]. Therefore, identifying new miRNAs/targets couples involved in the metastatic progression of Osteosarcoma appears of paramount interest in an attempt to use them as biomarkers to improve the diagnostic, the prognostic and the outcome of this rare malignancy.

Here, we report that human primary Osteosarcoma samples from *in vivo* xenograft models harbor a different miRNA-signature compared with their associated distant lungmetastases. We found that among the most differentially expressed miRNAs, four in particular, namely; the miR-133b, -198, -206 and -582-5p are only expressed in the cells from bone-primary sites (Fig. 1C, D and Fig. 2A). Interestingly, the loss of expression of these miRNAs was confirmed in metastatic samples from Osteosarcoma patients compared with their primary tumor biopsies (Fig. 2B).

Over both in vitro and in vivo experiments. we have more precisely defined that the downderegulation of the miR-198 and -206 belongs to the required-cellular features permitting the metastatic spreading of the Osteosarcoma cells. Indeed, by modulating the expression of these miRNAs in vitro, we highlighted their functional implication in regulating both the migrative and the invasive capacities of the cells (Fig. 4A, B and Supp. Fig. 1A). In addition, we confirmed that such functional effects were at least partially mediated through these miRNAs' direct binding-capabilities towards the 3'UTR of the tyrosine-kinase receptor C-Met, as previously described in other models (Fig. 3D) [24, 25]. Furthermore, our results are in accordance with another study reporting that inhibiting the expression of this receptor through a siRNA-mediated strategy or by using a pharmacologic inhibitor, the Crizotinib, prevented the uveal melanoma's metastatic spreading [32]. In addition, it was shown that the expression of this receptor was gradually increased during the course of the colorectal cancer development, as well as it was correlated with its liver-metastatic dissemination [9]. In line with this data, we have also shown that the C-Met's expression was up regulated both in the lung-metastases from our mice Osteosarcoma xenograft model and in the ones from Osteosarcoma's patients (Fig. 2A, B).

As the metastatic dissemination-related functional effects of the miR-198 and -206 are at least partially attributable to their direct targeting of C-Met (Fig. 3A, B), we have also demonstrated that they consequently act on the activation levels of two of its downstream pathways, the ERK 1/2 and the Akt ones (Fig. 3D) [33, 34]. Besides, a recent work highlighted the implication of the ERK ½ signaling in the metastatic dissemination of the Osteosarcoma cells, as it reports that a (-)epigallocatechin-3-gallate treatment markedly inhibits both the migrative and the invasive capabilities of the cells, as well as it reduces the P-ERK level [35]. Additionally, it was also demonstrated that the EMT is mediated by the ERK ½ pathway in Osteosarcoma cells [36]. Moreover, the crucial role of the PI3K/Akt pathway in the metastatic development of Osteosarcoma was also reported, this pathway displaying a significant higher activation level in lung-metastasis bearing patients compared with the non-metastatic ones [37]. Interestingly, the PI3K/Akt pathway is also linked to the EMT and the invasive capabilities of the Osteosarcoma cells, as it contributes to the Matrix Metalloproteinases' activation. It was indeed reported that inhibiting this pathway decreases both the MMP2 and the MMP9 activities, further impeding the metastatic spreading of the murine Osteosarcoma cell line LM8, nevertheless highly aggressive [38]. This data are linked to the anti-invasive potential of the miR-198 and -206, here rather associated with their inhibitory effect on the MMP1's expression (**Fig. 4B and Supp. Fig 1B**).

Furthermore, in a therapeutic approach, this study brings the proof of concept that the miR-198 and -206 could be employed as powerful treatment-tools in the Osteosarcoma context. To our knowledge, it is indeed the first time that the direct intra-tumoral injection of these miRNAs was performed in a Bone Sarcoma model. Our study shows that, used as therapeutics, these miRNAs reduce both the tumor growth and the metastaticspreading, further resulting in increasing the mice's overall survival (Fig 5). Besides, our data even strengthen the relevance of using these miRNAs in an Osteosarcoma's context, as the anti-migrative and the anti-invasive roles of the miR-198 were previously demonstrated in this pathology, due to its direct binding to another target gene : ROCK1 [39]. In addition, these authors demonstrated that the expression level of this miRNA was correlated with the TNM stage and the metastatic spreading of the disease. In gastric, colorectal and lung cancers a decrease in the miR-198's expression was also correlated with the metastasis occurrence [40-42]. Furthermore, Osteosarcoma patients displaying low levels of miR-206 and -133b in tumor and sera were shown to exhibit high Osteosarcoma grade as well as distant metastasis [43, 44].

Such results complete the mode-of-actionrelated knowledge about the miR-198 and -206 and shed light on their crucial role in the metastatic spreading of the Osteosarcoma, at least through their direct C-Met targeting. In a clinical context, this work thus aims to open the road to new therapeutic opportunities provided by the use of a synthetic version of these molecules, in an attempt to improve the outcome of this pediatric cancer.

Materials & Methods

Tumor cell lines and patient tumor material

The HOS LucF-GFP cells are modified MNNG/HOS cells (young female high grade Osteosarcoma from femoral origin, transformed in by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine vitro treatment) that include the Firefly luciferase (LucF) and the Green Fluorescent protein (GFP) genes stably inserted in their genome. Cell modification was done by lentiviral infection following the procedure previously described to modify mouse POS-1 and rat OSRGA cell lines [45]. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen-Life Technologies Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone), 2 mmol/L L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin. The cells were maintained in a humidified 5% CO₂/air atmosphere at 37 °C and were passaged for less than 3 months.

Osteosarcoma cell lines sub-populations were obtained at the time of diagnostic biopsy (B) or after surgical resection of lung metastasis (M), in patients diagnosed with Osteosarcoma at the Hospital of the University of Navarra (Clínica Universidad de Navarra, CUN, Pamplona, Spain). Samples were obtained following patient informed consent and after ethical approval by the Navarra University Hospital Ethics Committee. All subpopulations were thoroughly characterized as previously described by Patiño-García et al., [46]. The **Supp. Table 1** contains all the patients' details.

Animal treatment

All procedures involving mice (their housing in the Experimental Therapeutic Unit at the Faculty of Medicine of Nantes (France) and care, the method by which they were anesthetized and killed and all experimental protocols) were conducted in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA.PdL.06). MNNG/HOS osteolytic xenograft model was induced by paratibial injection of 1.5 \times 10⁶ of HOS LucF-GFP cells in five weeks-old female athymic nude mice (Harlan Sprague-Dawley, Inc.), leading to a rapidly growing tumor in soft tissue with secondary contiguous bone invasion. The tumor growth was monitored three times weekly and tumor volumes were calculated by using the formula: length*width*depth*0.5. Data points were expressed as average tumor volume ± s.e.m. until a maximum of 2500 mm³.

Mice were anesthetized by inhalation of a combination of isoflurane/air (1.5%, 1L/min) and

blood was collected in tubes containing EDTA (1.5 mg \pm 0.35 mg EDTA/mL of blood) by intracardiac puncture. Blood samples were incubated with a red-cells lysis buffer (composition: 8.26 g NH4Cl, 1 g KHCO3, 200 µL EDTA 0.5 M, pH 8; all together diluted in 100 mL ddH₂O; filtered and adjusted to pH 7.4) and the remaining cells were counted and diluted in PBS 2% FBS + 0.7 mM EDTA. From in vitro culture 1x10⁶ HOS LucF-GFP cells were trypsinized and diluted in PBS 2% FBS + 0.7 mM EDTA and served as a control for CTCs' isolation. Cell sorting was made in the cell sorting facility SFR/INSERM U892. Primary tumor samples and lungs from each animal were also collected. Lungs observation and further metastasis dissection and collection were done under an optic microscope. RNA was extracted from all samples.

Luciferase-monitored counting of the metastasis

The mice were sacrificed seven minutes after they received an intra-peritoneal injection of 250 μ L of a luciferine solution. The lungs were dissected and the EG&G Berthold Night Owl In-vivo Molecular Imaging System facility associated to the WinLight 32 software, were used to monitor the disseminated HOS LucF-GFP cells and to count the lung-metastasis.

RNA extraction

Cultured cells and in vivo samples were lysed with 700 µL of «QIAzol® Lysis Reagent» (QIAGEN, CA, USA). Messenger RNA (mRNA) and miRNA were extracted with the "QIAGEN miRNeasy Mini Kit" (QIAGEN) following manufacturer's instructions. The mRNA concentration was measured by optical density (OD) at 230, 260 and 280 nm thanks to a spectrophotometer (Nanodrop, Thermo Scientific).

Taqman low density array (TLDA)

RNAs from the isolated CTCs, PTs and META samples were sent to the IGGM (*Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier*) where the expression of 760 miRNAs was analyzed by Taqman Low Density Array (TLDA). To obtain the miRNAs' expression profiles of the above-mentions samples, data was normalized with three reference miRNAs (RNU6B, RNU44 and RNU48), with respect to primary tumors and a 2-fold difference was considered as significant threshold regarding each miRNA's expression variation. The results from two independent experiments were compared.

Quantitative reverse transcription-PCR

The mRNA was retro-transcribed into complementary DNA (cDNA) with the ThermoScript™ RT-qPCR System (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. Realtime monitoring of PCR amplification of cDNA was performed using DNA primers (primers sequences are available in Supp. Table 2) on CFX96 real-time PCR detector system (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) with SYBR PCR Master Mix buffer (Bio-Rad). Target genes expression were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -2 microglobulin (B2M) levels in respective samples as an internal standard and the comparative cycle threshold (Ct) method was used to establish a relative quantification of target mRNAs. Each assay was performed in triplicate.

A specific reverse-transcription (RT) was performed for each miRNA from 100 ng of total RNA, using a specific stem-loop RT primer (50 nM) and the MultiScribe Reverse transcriptase (Applied Biosystems). The mature miRNAs' expression levels were measured by Real-time qPCR using the SYBR PCR Master Mix buffer (Bio-Rad) and a CFX96 realtime PCR detector system (Bio-Rad). The expression of each gene was normalized to the one of the small nuclear RNU6B RNA as a reference. All experiments were performed in triplicate. Primers sequences are available in **Supp. Table 3 and 4**.

Transfections

MirVana[™] miRNA mimics (pre-miRNAs) or mirVana[™] miRNA inhibitors (anti-miRs) (Ambion, Invitrogen) were transfected at 30 nM final concentration thanks to the siPORT[™] NeoFX[™] Transfection Agent (Invitrogen), following manufacturer's instructions.

Western blotting analysis

Samples containing equal amounts of protein (depending on the antibody, 5-50 µg) from lysates of cultured Osteosarcoma cells underwent electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels and were transferred to polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes. The membranes were blocked in 3% BSA-PBS-0.05% Tween at room temperature for 1 h and blots were probed overnight at 4 °C with the following primary antibodies : rabbit anti-**MET** (C-12), 1:500; Santa Cruz Biotechnology, rabbit anti-**Akt** #9272S, 1:1000; rabbit anti-**P-Akt** (S473) #9272S, 1:1000; rabbit anti-**P44/42** #9102S, 1:1000; rabbit anti-**P-44/42 MAPK** (T202/Y204) #4370S, 1:2000; or rabbit anti-**GAPDH** 14c10, 1:2000; Cell Signaling Technologies, Beverly, CA, to detect proteins of interests. After incubation, the membranes were washed 3 times with washing buffer (PBS containing 0.05% Tween) for 5 min. Membranes were then incubated for 1 h with 1:10,000 diluted secondary antibody (goat-antirabbit sc-2004 #J1512, 1:10000; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) at room temperature. Specific proteins were detected using SuperSignal[®] WestDura Extended Duration Substrate (ThermoScientific, Rockford, USA) and a G-Box (Syngene, Cambridge, UK) after washing. Pictures were analysed thanks to the ImageJ Glyceraldehyde-3-phosphate software. dehydrogenase was used as an internal loading control.

Luciferase Reporter assay

HOS LucF-GFP cells were cultured in 24 well-plate (40,000 cells/well) and transfected with 10 ng of either control reporter vector (Psi-ckeck2 control) or UTR-reporter vector (Psi-check2 C-Met **3'UTR**) together with pre/anti-miRs control, -133b, -198 and -206 (15 µM) following manufacturer's recommendation thanks to the siPORT[™] NeoFX[™] Transfection Agent (Invitrogen). Forty-eight hours after transfection, cells were lysed and the luciferase activity was measured with the "Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System" kit (Promega). 25 µL of substrates for Renilla and Firefly luciferases are added each time to the lysed cells and the resultant bioluminescence was measured with TriStar LB 941 (Berthold Technologies). Psicheck2 C-Met 3'UTR was a kind gift from Dr. Chonglin Luo German (Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany) in which the C-Met 3'UTR sequence was inserted between the Notl and XhoI sites[47].

Migration and invasion assays

HOS LucF-GFP cells were transfected with the indicated pre-miRs or anti-miRs and 30 000 cells were seeded on the upper side of a Transwell Chamber (Falcon), on a porous transparent polyethyleneterephthalate (PET) membrane (8-µm pore size) in 1% FBS. The lower chamber of the Transwell was filled with growth medium containing 10% FBS. Such 1%/10% FBS-gradient was generated between the upper and the lower Chambers of the system, to promote the cell migration. After 24 hours of incubation, cells on the upper side of the Chambers were mechanically removed and cells that migrated to the lower side were fixed with 10% Glutaraldehyde and stained with 0.1% Crystal Violet. Pictures of the Chambers were taken and five different areas were arbitrary chosen to perform quantitative analyses. Representative pictures of the Boyden were chosen here. For all the Boyden Chambers experiments, error bars show the standard deviation for n = 8 measurements from representative experiments and two-tailed paired Student's *t-tests* were used to compare the different conditions.

The same procedure was used to monitor the invasive capabilities of the cells, with this difference that the upper side of the Transwell Chambers were Matrigel-coated (50 ng Matrigel/well).

Time-lapse scratch assays

HOS LucF-GFP cells were plated in 24-well plate and transfected with the indicated pre/antimiRs (50 nM). 48 hours later and upon cell confluence, scratches on the center of the wells were performed thanks to pipet-tips. The scratch recovery was recorded for 24h and pictures were taken every 10 minutes. Calculations were made with AxionVisionRel 4.8 software (Zeiss).

Viability assays

HOS LucF-GFP Osteosarcoma cells were plated in 96-wells plates (2000 cells/well) and transfected with the pre-miRs, as previously mentioned. The cell viability was evaluated with WST-1 solution (4-[3-(4-lodophenyl)-2-(4nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate, Roche, Mannheim, Germany). 72 hours after the transfections, the culture medium was removed and replaced by the WST-1 reagent diluted in fresh medium in a 1:10 proportion. After a 7 hours incubation time, the absorbance at 470 nm was measured for each well on a 96-multiwell microplate reader (Victor² 1420; PerkinElmer Inc.) and normalized to the average reading of wells containing medium only. Each assay was performed in triplicate. The viability percentage is calculated by this formula: OD at 470 nm with indicated pre-miR/ OD at 470 nm with Control premiR x 100.

Statistical analysis

All error bars show SEM (s.e.m.) or SD (s.d.) for at least triplicate measurement from representative experiments. Statistical tests were done with GraphPad Prism 6 software (* = $p \le 0.05$, ** = $p \le 0.01$, *** = $p \le 0.001$). In the case of comparing two samples, two-tailed Student *t*-tests were performed, whereas multiple comparisons were analysed by one-way ANOVA tests followed by a Dunnett's test. The test used in each case is indicated on the legend of the corresponding figure. Error bars from the *in vivo* tumor growth monitoring represent the s.e.m. from the mean tumor volume of the mice (n = 8 mice in each group). A p < 0.05 was used as the criteria for statistical significance.

- 1. Geller, D.S. and R. Gorlick, *Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies.* Clin Adv Hematol Oncol, 2010. **8**(10): p. 705-18.
- 2. Marina, N., et al., *Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma*. Oncologist, 2004. **9**(4): p. 422-41.
- Ottaviani, G. and N. Jaffe, The epidemiology of osteosarcoma. Cancer Treat Res, 2009. 152: p. 3-13.
- 4. Gorlick, R., *Current concepts on the molecular biology of osteosarcoma*. Cancer Treat Res, 2009. **152**: p. 467-78.
- Kobayashi, E., F.J. Hornicek, and Z. Duan, MicroRNA Involvement in Osteosarcoma. Sarcoma, 2012. 2012: p. 359739.
- Ogunwobi, O.O., et al., Epigenetic upregulation of HGF and c-Met drives metastasis in hepatocellular carcinoma. PLoS ONE, 2013. 8(5): p. e63765.
- 7. Cassinelli, G., et al., *Inhibition of c-Met and prevention of spontaneous metastatic spreading by the 2-indolinone RPI-1.* Mol Cancer Ther, 2006. **5**(9): p. 2388-97.
- 8. Ebrahim, H.Y., et al., Norstictic Acid Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation, Migration, Invasion, and In Vivo Invasive Growth Through Targeting C-Met. Phytother Res, 2016. **30**(4): p. 557-66.
- Gayyed, M.F., et al., *c-MET expression in* colorectal adenomas and primary carcinomas with its corresponding metastases. J Gastrointest Oncol, 2015. 6(6): p. 618-27.
- 10. Cantiani, L., et al., *Caveolin-1 reduces* osteosarcoma metastases by inhibiting c-Src activity and met signaling. Cancer Res, 2007. **67**(16): p. 7675-85.
- 11. Nana-Sinkam, S.P. and C.M. Croce, *Clinical applications for microRNAs in cancer.* Clin Pharmacol Ther, 2013. **93**(1): p. 98-104.
- Shen, J., S.A. Stass, and F. Jiang, MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. Cancer Lett, 2013.
 329(2): p. 125-36.
- 13. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.* Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
- 14. Pasquinelli, A.E. and G. Ruvkun, *Control of developmental timing by micrornas and their targets.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2002. **18**: p. 495-513.
- 15. Iorio, M.V. and C.M. Croce, *MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge*

impact. J Clin Oncol, 2009. **27**(34): p. 5848-56.

- 16. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
- Zhao, H., et al., miR-183 inhibits the metastasis of osteosarcoma via downregulation of the expression of Ezrin in F5M2 cells. Int J Mol Med, 2012. 30(5): p. 1013-20.
- Zhang, H., et al., microRNA-143, downregulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting Bcl-2. Oncol Rep, 2010. 24(5): p. 1363-9.
- 19. Song, Q.C., et al., *Downregulation of microRNA-26a is associated with metastatic potential and the poor prognosis of osteosarcoma patients.* Oncol Rep, 2014. **31**(3): p. 1263-70.
- 20. Niu, G., et al., *miR-454 is down-regulated in osteosarcomas and suppresses cell proliferation and invasion by directly targeting c-Met.* Cell Prolif, 2015. **48**(3): p. 348-55.
- Garzon, R., G. Marcucci, and C.M. Croce, Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. Nat Rev Drug Discov, 2010. 9(10): p. 775-89.
- 22. Wu, L., J. Fan, and J.G. Belasco, *MicroRNAs* direct rapid deadenylation of mRNA. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4034-9.
- 23. Hu, G., et al., *miR-133b regulates the MET* proto-oncogene and inhibits the growth of colorectal cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Biol Ther, 2010. **10**(2): p. 190-7.
- 24. Tan, S., et al., *miR-198 inhibits migration* and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting the HGF/c-MET pathway. FEBS Lett, 2011. **585**(14): p. 2229-34.
- Yan, D., et al., MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. J Biol Chem, 2009. 284(43): p. 29596-604.
- 26. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
- Zhu, L., M.M. McManus, and D.P. Hughes, Understanding the Biology of Bone Sarcoma from Early Initiating Events through Late Events in Metastasis and Disease Progression. Front Oncol, 2013. 3: p. 230.

- 28. Ru, N., et al., SPRY4 Intronic Transcript 1 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition Through Association with Snail1 in Osteosarcoma. DNA Cell Biol, 2016. **35**(6): p. 290-5.
- 29. Shang, Y., et al., *TIM-3 expression in human osteosarcoma: Correlation with the expression of epithelial-mesenchymal transition-specific biomarkers.* Oncol Lett, 2013. **6**(2): p. 490-494.
- 30. Duan, G., et al., *MicroRNA-26b inhibits* metastasis of osteosarcoma via targeting *CTGF and Smad1.* Tumour Biol, 2015. **36**(8): p. 6201-9.
- Xu, N., et al., MicroRNA-33b suppresses migration and invasion by targeting c-Myc in osteosarcoma cells. PLoS ONE, 2014. 9(12): p. e115300.
- 32. Surriga, O., et al., *Crizotinib, a c-Met inhibitor, prevents metastasis in a metastatic uveal melanoma model.* Mol Cancer Ther, 2013. **12**(12): p. 2817-26.
- 33. Paumelle, R., et al., *Hepatocyte growth* factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. Oncogene, 2002. **21**(15): p. 2309-19.
- Hui, A.Y., et al., Src and FAK mediate cellmatrix adhesion-dependent activation of Met during transformation of breast epithelial cells. J Cell Biochem, 2009. 107(6): p. 1168-81.
- 35. Tang, G., et al., (-)-Epigallocatechin-3gallate inhibits osteosarcoma cell invasiveness by inhibiting the MEK/ERK signaling pathway in human osteosarcoma cells. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2015. **34**(1): p. 85-93.
- 36. Hou, C.H., et al., *Cyr61 promotes* epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis of osteosarcoma by Raf-1/MEK/ERK/Elk-1/TWIST-1 signaling pathway. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 236.
- 37. Zhu, L.B., et al., Knockdown of Aurora-B inhibits osteosarcoma cell invasion and migration via modulating PI3K/Akt/NFkappaB signaling pathway. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(7): p. 3984-91.
- Tsubaki, M., et al., Reduction of metastasis, cell invasion, and adhesion in mouse osteosarcoma by YM529/ONO-5920-induced blockade of the Ras/MEK/ERK and Ras/PI3K/Akt pathway. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. 259(3): p. 402-10.
- 39. Zhang, S., Y. Zhao, and L. Wang, MicroRNA-198 inhibited tumorous

behaviors of human osteosarcoma through directly targeting ROCK1. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **472**(3): p. 557-65.

- 40. Cui, Z., X. Zheng, and D. Kong, *Decreased* miR-198 expression and its prognostic significance in human gastric cancer. World J Surg Oncol, 2016. **14**(1): p. 33.
- 41. Wu, S., et al., *miR-198 targets SHMT1 to inhibit cell proliferation and enhance cell apoptosis in lung adenocarcinoma.* Tumour Biol, 2015.
- 42. Wang, M., et al., *MiR-198 represses tumor* growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fucosyl transferase 8. Sci Rep, 2014. **4**: p. 6145.
- 43. Zhang, C., et al., Serum levels of microRNA-133b and microRNA-206 expression predict prognosis in patients with osteosarcoma. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(7): p. 4194-203.
- 44. Bao, Y.P., et al., *Roles of microRNA-206 in* osteosarcoma pathogenesis and progression. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(6): p. 3751-5.
- 45. Rousseau, J., et al., Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models. Cancer Gene Ther, 2010. **17**(6): p. 387-97.
- 46. Patino-Garcia, A., et al., *Profiling of chemonaive osteosarcoma and pairednormal cells identifies EBF2 as a mediator of osteoprotegerin inhibition to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(16): p. 5082-91.
- Luo, C., et al., miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes. J Invest Dermatol, 2013.
 133(3): p. 768-75.





Figure 1 I A set of miRNAs differentially expressed in Primary Tumors (PTs), Circulating Tumor Cells (CTCs) and Metastatic samples (METAs) potentially targets the C-Met receptor for inhibition.

(A) Experimental design: 1.5 million HOS LucF-GFP Osteosarcoma cells were paratibially injected in nude mice. Tumors were let grown until their volumes reach 2500 mm³. At this time point, the mice were sacrificed and samples from primary bone tumors (PTs), Circulating Tumor Cells (CTCs) and metastatic nodules (METAs) were collected and subjected to RNA extraction (upper panel). The lower panel shows the two kinds of scatter plots used to isolate the CTCs from one experiment on the two performed. The scatter plots representing the cell-granulometry (SSC) in function of the cellsize (FSC) (left panel) and the one representing the SSC in function of the GFP-fluorescent signal (right panel) are presented. Both top scatter plots illustrate the control conditions used as a reference for the blood-sample CTCs' isolation, composed of the HOS LucF-GFP cells cultured in vitro. Both bottom scatter plots illustrate the results from the CTCs sorted from the blood-samples and P2 is composed of the CTC population recovered in one of the experiments. (B) The tumor volumes (mm³) of eight mice paratibially injected with HOS LucF-GFP cells is represented over time (days) as the thin colored curves. The average tumor volume is represented by the black thick curve. Tumor volumes were calculated with the formula $(t^2 \times I)/2$ where t is the tumor thickness and I is the tumor length. Error bars show s.e.m.. Here are presented the results from one of the two independent experiments performed. (C) Differential miRNAs' expression-profiles are illustrated here as assessed by Taqman Low Density Array (TLDA) analysis. Each histogram shows both the fold change and the direction of change for one given miRNA's expression regulated more than 2-folds between the PTs and the METAs samples from two independent experiments (Exp 1 and Exp 2). RNU6B, RNU44 and RNU48 were used as housekeeping genes and the miRNA's expression from the METAs is normalized on the PT one. (D) The list of the eight microRNAs over the 760 analysed, found to be expressed only in PTs. From those, and as assessed by TargetScan, DianaLab and miRANDA databases' algorithms, four miRNAs were found to potentially target the C-Met receptor (bolded miRNAs).



A Mice samples



В

Human Osteosarcoma samples with

135

Figure 2 I Candidate miRNAs are over-expressed in Osteosarcoma primary tumors (PTs) and C-Met is overexpressed in the lung-metastasis (METAs) samples from both mice and patients.

The four candidate miRNAs' expression (miR-133b, -198, -206 and -582-5p) as well as the one of C-Met was analysed by RT-qPCR from xenografted-Osteosarcoma from mice samples (**A**) and from metastatic Osteosarcoma patients diagnosed at the Hospital of the University of Navarra (**B**). The expression levels were compared between primary tumors (PTs) and their associated metastases (METAs). Average expression and error bars (s.d.) are represented for n = 3 measurements from representative experiments. RNU6B, GAPDH and B2M are used as housekeeping genes. (**C**) The rationale of the hypothetic mechanism: the cells from the primary bone tumor (PT) express the candidates miRNAs predicted to/or already validated as inhibiting C-Met, thus maintaining a low activity of this receptor and its downstream signaling pathways, keeping the PT cells at their initial site. The miRNAs' loss of expression in Circulating Tumor Cells (CTCs) and metastatic nodules (METAs) releases the pressure exerted on C-Met, resulting in increasing both its expression and activity, thus enhancing the metastatic potential of those cells.



C-Met 1,4 Relative mRNA expression 8'0 0'0 0'0' 7'0 0'0'0' 0 Anti-miR Ct -133b -198 -206

В















Figure 3 I miR-198 and -206 inhibit the C-Met's translation into protein through a direct targeting and consequently modulate the Akt and the ERK ½ signaling, two C-Met's downstream pathways. The expression of C-Met was assessed at mRNA level by RT-qPCR (A) and at protein level by Western blotting (B) in the HOS LucF-GFP Osteosarcoma cell line, 72 hours after the pre-miRNAs' transfections (left panel) and 48 hours after the anti-miRNAs' transfections (right panel). Error bars show s.d. for n = 3 measurements from representative experiments. GAPDH and B2M were used as housekeeping genes. (C) The expression of Akt, P-Akt, ERK 1/2 and P-ERK 1/2 was assessed by Western blotting in the HOS LucF-GFP Osteosarcoma cell line 72 hours after the pre-miRNAs' transfections (left panel) or 48 hours after the anti-miRNAs' ones (right panel). For all the Western blots presented, the GAPDH was used as an internal loading control. (D) The HOS LucF-GFP Osteosarcoma cells were co-transfected with the indicated pre-miRNAs (left panel) or anti-miRNAs (right panel), together with either the UTR-reporter (Psi-check2 C-Met 3'UTR, white bars) or the control vector (Psi-check2 control, black bars), the cells were lysed forty-eight hours after transfections and the luciferase bioluminescence was assessed. Results are shown as relative luciferase units (RLU) normalized to the control pre/anti-miR, and the control vector's results were assigned to 1. Error bars show s.d. for n = 3 measurements from representative experiments. Oneway ANOVA and Dunnett's multiple comparison tests were used to compare the significance of the results.

Figure 4 :



Pre-miR Ct Pre-miR-198 Pre-miR-206

The last is a state	and the second second	and the second second
	2016 3120	
11 - 1 - 1 - X		and the second second
and the second	- 1	
REAL PROPERTY	State Ital	107475 P. 1027

В



Pre-miR Ct Pre-miR-198 Pre-miR-206



Anti-miR Ct Anti-miR-198 Anti-miR-206



Anti-miR Ct Anti-miR-198 Anti-miR-206

С



Figure 4 I The miR-198 and -206 inhibit both the *in vitro* migrative and invasive capabilities of the Osteosarcoma cells.

(A) The migrative capabilities of the Osteosarcoma cells were assessed by migration assays in Boyden Chambers. The HOS LucF-GFP cells were transfected with the indicated pre-miRs (**left panels**) or anti-miRs (**right panels**) and 30 000 cells were seeded on the upper surface of the 8 μ m-pored-Chambers in a 1% FBS-containing medium. The cells that had migrated to the lower surface of membranes after 24h of incubation were counted. Histograms show the percentage of the lower membranes' surface occupied by cells / the total lower membranes' surface. Representative pictures were taken. Error bars show s.e.m. for n = 3 measurements from representative experiments. (**B**) The invasive capabilities of the cells were assessed as the same way as presented in (**A**), with this difference that the upper surfaces of the Boyden Chambers were preliminary coated with 50 ng of Matrigel. (**C**) The viability of the cells was assessed through WST-1 assays in HOS LucF-GFP cells 72h after the cells' transfections with the pre-miRNAs -198, -206 or controls (Ct). Error bars show s.e.m. for n = 3 measurements. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test was used to assess the significance of the results in the experiments presented here.

Figure 5 :



Thr2: 65535 Range: 131070

Thr1:16962 **0**

Figure 5 | The miR-198 and -206 reduce the metastatic spreading of Osteosarcoma in a HOS LucF-GFP xenograft model and prolong cancer-specific survival.

(A) Experimental design: 1.5 million HOS LucF-GFP Osteosarcoma cells were paratibially injected in nude mice. Three groups of eight mice were then randomly assigned and each one was intratumorally injected with either the Pre-miR Ct, the -198 or the -206 ones three times a week since the tumor volumes reached 100 mm³. The tumor growth was monitored until the time of the euthanasia, when the tumors were approximately 3000 mm³. At this time, the lungs were dissected and subjected to a luciferase-monitored counting of the metastases. (B) The mean tumor volume of the treated-mice was compared with control group \pm s.e.m. (n = 8 mice in each group). A Two-way ANOVA statistical test was used to compare the effect of the different miRNAs on the tumor growth. (C) In Kaplan–Meier curves, cancer-specific survival was compared between mice treated with PremiR Ct, Pre-miR-198 and -206. The log-rank (Mantel-Cox) test was used to compare the overall survival between the three groups. (D) Histograms represent the percentage of the lung metastases-bearing mice depending on the treatment-groups. (E) Histograms show the average number of metastases counted thanks to luciferase-monitoring in each group of mice. Representative overlay illustrating pictures were presented.


<u>Supp. Figure 1 | The miR-198 and -206 inhibit the *in vitro* migrative and invasive capabilities of the Osteosarcoma cells through impacting both the Matrix Metalloproteinases expression and activity.</u>

(A) The HOS LucF-GFP cells were transfected with the indicated pre-miRNAs (left panel) or antimiRNAs (right panel) and a wound was generated forty-eight hours later on the cell layer, at cell confluence. Histograms show the recovery percentages in each transfection's condition, 12 hours after performing scratches, with respect to the corresponding condition at t₀. Pictures were taken at the initial time-point (t_0) (upper panel) and 12 hours after performing the scratches (t_{12}) (lower panel). The scratch areas were outlined in red. (B) The expression of MMP1, MMP2 and MMP9 was assessed by RT-qPCR in HOS LucF-GFP Osteosarcoma cells, 72 hours after transfections with the indicated Pre-miRNAs. Error bars show s.d for n = 3 measurements from representative experiments and GAPDH was used as housekeeping gene. (C) The HOS LucF-GFP Osteosarcoma cells were transiently transfected with the indicated Pre-miRNAs at a final concentration of 100 nM per well in DMEM-10% FBS-containing medium. Forty-eight hours later, the cells were subjected to both a starvation without FBS and another round of Pre-miRNAs' transfection at a final concentration of 30 nM per well. The supernatants were harvested forty-eight hours later, the proteins were extracted and the Matrix Metalloproteinases' activities of the MMP2 and the MMP9 were assessed by zymography. Picture of a representative gel from two independent experiments is presented (left panel) and a relative quantization of the MMP2 and the MMP9 activities was performed thanks to the ImageJ software (middle and right panels respectively). Error bars show s.d for n = 2 measurements from representative experiments.



Supp. Figure 2 | Treating the mice with the pre-miR-206 leads to a decreased expression of C-Met in the Primary Tumors (PTs).

(A) The expression of C-Met was assessed by Western Blotting in the Primary Tumors (PTs) from the corresponding-miR-injected mice. Each band represent the expression of C-Met in the PT from one mouse (n = 8). GAPDH was used as a loading control. (B) A quantization of the bands obtained in (A) was performed thanks to the ImageJ software. The average expression of C-Met was calculated for n = 7 mice per group and normalized on the expression of the GAPDH.

Supp. Tables :

			Age at		Overall	Time to		Primary	Metastasis
			the		survival*	progression**	6 1 1	Tumor	biopsy
Case	Location	Sex	diagnosis	Metastasis	(months)	(months)	Status	biopsy	
491	Femur	Male	16	YES	84	27	Dead	491Bp8	491Rp4
531	Femur	Female	22	YES	28	0	Dead	531Bp	531MIIp52
588	Tibia	Male	16	YES	46	27	Dead	588Bp10	588Mp12
595	Femur	Female	16	YES	12	0	Dead	595Bp3	595Mp11

* from diagnosis to May 2013.

** time between the end of treatment of the primary and metastasis or relapse.

Table 1 : Patient's samples features and clinical data. All the patient were diagnosed at the Hospital of the University of Navarra (Clínica Universidad de Navarra, CUN, Pamplona, Spain).

Gene (human)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')		
C-Met	TCTGCCTGCAATCTACAAGG	ATTATTCCTCCGAAATCCAAAGT		
B2M	AGCTGTGCTCGCGCTACTCTC	CACACGGCAGGCATACTCATC		
GAPDH	TGGGTGTGAACCATGAGAAGTATG	GGTGCAGGAGGCATTGCT		

Table 2 : Sequences of the forward and reverse primers used in the qPCR.

miRNA	Hairpin RT primer (5'-3')
hsa-miR-133b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTAGCTGG
hsa-miR-198	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAACCTAT
hsa-miR-206	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCACACAC
hsa-miR-582-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGTAACTG

Table 3: Sequences of the Hairpin RT primers used for the miRNA-RT.

miRNA	Forward primer (5'-3')	Universal Reverse primer (5'-3')
hsa-miR-133b	CATCCTTTGGTCCCCTTCAA	GTGCAGGGTCCGAGGT
hsa-miR-198	GACAGAGGTCCAGAGGGGAG	GTGCAGGGTCCGAGGT
hsa-miR-206	GCCATCCTGGAATGTAAGGAA	GTGCAGGGTCCGAGGT
hsa-miR-582-5p	GCCATCCTTACAGTTGTTCAAC	GTGCAGGGTCCGAGGT

Table 4 : Sequences of the different forward and universal reverse primers used in the qPCR for the miRNAs.

II.2.2.c. Complément de discussion à l'Article 5 :

En établissant le **profil d'expression des miARNs** dans des biopsies tumorales issues de tumeurs primaires et de métastases pulmonaires d'Ostéosarcome, cette étude a pu mettre en lumière un des mécanismes épigénétiques conduisant à la dissémination métastatique de ce cancer. Les cellules métastatiques présentant en effet un faible niveau d'expression des miR-198 et -206, associé à une surexpression du récepteur oncogénique au **HGF** (Hepatocyte Growth Factor), C-Met, nos analyses fonctionnelles ont pu démontrer que ce récepteur était une des cibles directes de ces miARNs (Fig. 1C, 1D, 2A, 3A, 3B et 3D). Ceci atteste alors que la **perte d'expression des miR-198** et -206 par certaines cellules des tumeurs primaires soit un des mécanismes à l'origine de la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome.

La surexpression de C-Met a été décrite dans de nombreux cancers dont l'Ostéosarcome²⁴⁴, dans lequel les **amplifications** de son *locus* sont d'ailleurs de **mauvais pronostic**, aussi bien en termes de survie sans rechute que de survie globale²⁴⁵. Ces données sont soutenues par le fait que le niveau d'expression de ce récepteur corrèle également de façon significative avec de faibles chances de survie dans le cadre du Sarcome d'Ewing²⁴⁶. Patanè et al., ont d'ailleurs rapporté le pouvoir oncogénique de C-Met dans l'Ostéosarcome, sa surexpression stable dans des ostéoblastes induisant en effet la transformation tumorale de ces cellules²⁴⁷. Ces auteurs ont ainsi pu observer que la surexpression de ce gène dans ces cellules leur permettait de présenter toutes les caractéristiques phénotypiques de l'Ostéosarcome in vitro ainsi que le comportement de ces tumeurs in vivo. La surexpression de ce récepteur a également été retrouvée dans des biopsies d'Ostéosarcome canin, dans lesquelles elle est associée à une augmentation de son activité²⁴⁸. Il existerait par ailleurs une corrélation significative entre le niveau d'expression de C-Met et la **dissémination métastatique** de l'Ostéosarcome dans ce même modèle²⁴⁹. En revanche, contrairement à ce qui a pu être rapporté chez l'Homme, cette étude n'a pas pu montrer que le niveau d'expression de ce récepteur impactait la survie des animaux.

En proposant d'investiguer les origines épigénétiques de la dissémination métastatique de l'**Ostéosarcome**, notre étude s'inscrit dans une dynamique porteuse, que de nombreuses équipes de Recherche à travers le monde ont également pris le parti de suivre ces dernières années. Il a par exemple été décrit que le **miR-22** s'opposait à ce processus d'échappement dans ce modèle, par l'intermédiaire de son ciblage de **l'ATP citrate lyase**, une enzyme impliquée dans la synthèse *de novo* des lipides²⁵⁰. A l'inverse, la dissémination métastatique de ce cancer serait favorisée par les **miR-200c**²⁵¹ et **-130a**²⁵², ce dernier ciblant le suppresseur de tumeur **PTEN** (**Phosphatase and Tensin Homolog**). Le **miR-26a** permettrait également de promouvoir la dissémination métastatique de ce cancer, en partie à cause de son ciblage direct de la **Glycogène-Synthase Kinase-3β** (**GSK-3β**), une enzyme inhibitrice de la voie **Wnt/β-cat**²⁵³. Il a par ailleurs tout récemment été démontré

que le **polymorphisme de nucléotide rs1056629**, concernant la partie 3'UTR de la **MMP9**, perturbait l'interaction de cette Métalloprotéinase matricielle avec le **miR-491-5p**, associant en conséquence ce polymorphisme à un risque accru de développement d'un Ostéosarcome métastatique²⁵⁴. Le lien entre les miARNs et C-Met a par ailleurs déjà constitué un champ d'investigation dans le cadre de cette pathologie. Il a en effet pu être rapporté que la surexpression artificielle du **miR-34a** dans ce modèle réduisait l'expression de **C-Met**, même si aucune interaction directe entre ces deux partenaires n'a pu être mise en évidence ici²⁵⁵. Quoi qu'il en soit, cette étude a démontré que la surexpression de ce miARN inhibait la migration *in vitro* et la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome *in vivo*.

Notre étude s'est plus particulièrement intéressée aux **miR-198** et **-206**, dont l'implication dans l'échappement tumoral dépendant ou non de C-Met a déjà été décrite dans de nombreux modèles. L'équipe de Tan et al., a en effet préalablement rapporté que la capacité de ciblage direct de **C-Met** par le **miR-198** lui conférait des propriétés **anti-migratoires** et **anti-invasives** dans un modèle de carcinome hépatocellulaire²⁵⁶. Ces propriétés ont également pu être identifiées dans le cancer colorectal, dans lequel ce miARN cible cette fois-ci la **Fucosyl-Transférase 8** (**FUT8**), une enzyme clé dans la régulation du métabolisme des protéines²⁵⁷. Par ailleurs, les fonctions de suppresseur de tumeurs de ce miARN ont déjà été identifiées dans l'Ostéosarcome, l'augmentation artificielle de son niveau d'expression réduisant les propriétés de prolifération, de migration et d'invasion des cellules des lignées HOS et U₂OS²⁵⁸. De façon intéressante, cette étude rapporte que les effets du miR-198 seraient ici causés par son ciblage direct du transcrit du gène *ROCK1 (Rho-Associated Kinase 1*).

Concernant le miR-206, une étude atteste de son opposition à la **production autocrine** de **TGF-β**, ainsi que de son rôle inhibiteur de l'expression de la **neuropiline-1** (**NRP1**) et de **Smad2**, réduisant en conséquence la migration, l'invasion et la propension à la TEM des cellules de cancer du sein²⁵⁹. En accord avec notre étude, il a tout récemment été décrit que ce miARN ciblait directement **C-Met** dans le **cancer du poumon à non petites cellules (NSCLC)**, inhibant alors les voies de signalisation **PI3K/Akt/mTOR**, témoins de l'activation de ce récepteur²⁶⁰. La **sous-expression** du miR-206 a préalablement été rapportée dans le cadre de l'**Ostéosarcome**, dans lequel elle est associée aux stades de progression avancés de la maladie, à la présence de métastases ainsi qu'à un faible degré de différenciation histologique²⁶¹. Il est important de souligner que les effets fonctionnels *in vitro* de ce miARN sur la migration et l'invasion, que nous avons pu mettre en évidence dans la lignée MNNG-HOS (**Fig. 4A, 4B et Supp Fig. 1A**), ont également été confirmés par ce groupe dans la lignée MG63.

Notre analyse n'ayant pas développé le **caractère pronostic** des miR-198 et -206, il est intéressant de noter qu'un faible niveau d'expression des **miR-206** et **-133b** (ce dernier faisant également partie des miARNs d'intérêt dans notre étude) dans le sérum de patients atteints d'Ostéosarcome, soit associé avec de plus faibles chances de survie sans rechute et

de survie globale²⁶². La **sous-expression** du **miR-133b** a par ailleurs déjà été rapportée dans l'Ostéosarcome, en comparaison avec des échantillons de muscles squelettiques²⁶³. Cette équipe a également pu montrer que la surexpression artificielle de ce miARN dans les lignées U₂OS et MG63 induisait une augmentation de la mort cellulaire par apoptose, ainsi qu'une inhibition des capacités de prolifération et des pouvoirs migratoires et invasifs de ces cellules. Ces résultats sont contradictoires avec les nôtres, dans la mesure où nous n'avons pas pu démontrer que le miR-133b module de façon significative de telles caractéristiques dans la lignée MNNG-HOS (data non montrées). Toutefois, il est possible de mettre en parallèle les résultats de ce groupe avec certaines des données que nous avons pu obtenir, notamment du fait que cette équipe ait pu démontrer que la **surexpression** du **miR-133b** réduisait l'expression de **C-Met** et la **phosphorylation** d'**Akt (Fig. 3C)**²⁶³. En effet, dans la démarche opposée, nos transfections d'anti-miRs ont permis d'obtenir, non seulement les plus importantes augmentations du niveau d'expression des transcrits de C-Met, mais aussi les plus importantes augmentations du niveau de phosphorylation de ERK 1/2, parmi tous les miARNs candidats de notre étude (**Fig. 3A et 3C**).

Enfin, même si notre travail propose que la dérégulation des miR-198 et -206 soit un des mécanismes à l'origine de la surexpression de C-Met dans l'Ostéosarcome, les facteurs épigénétiques ne sont pas les seuls à en être la cause. L'équipe de Cantiani et al., a ainsi pu mettre en évidence que le gène de la Cavéoline-1, sous-exprimé dans l'Ostéosarcome, inhibait la signalisation de la voie de C-Met, sa surexpression artificielle s'opposant alors à la dissémination métastatique in vivo²⁶⁴. L'ensemble de ces éléments justifie que l'inhibition de cet oncogène puisse constituer une piste thérapeutique intéressante dans le traitement des Sarcomes Osseux. A ces fins, des thérapies visant à inhiber son expression ont déjà été testées dans des modèles précliniques d'Ostéosarcome, comme c'est notamment le cas de celles employant le PF-2341066, un inhibiteur sélectif de C-Met²⁶⁵. Les résultats sont encourageants, ce composé contribuant à ralentir la croissance tumorale et la dissémination métastatique d'un modèle murin de xénogreffe d'Ostéosarcome humain. Par ailleurs, cette molécule permettrait également de limiter les lésions ostéolytiques et ostéocondensantes associées à la tumeur. De façon intéressante, il a également pu être démontré que l'inhibition de l'activité de C-Met par le PHA-665752 ainsi que le blocage de son interaction avec son ligand, par l'intermédiaire d'un anticorps anti-HGF, permettait de re-sensibiliser les cellules d'Ostéosarcome au Cisplatine, via un mécanisme de répression de la voie PI3K/Akt²⁶⁶. Curieusement, un autre inhibiteur pharmacologique de C-Met, le SU11274, induit un ralentissement de la prolifération des ostéoblastes de la lignée SaM-1, sans pour autant affecter celle de la lignée d'Ostéosarcome HOS²⁶⁷. Cette même étude a également démontré que l'hydrocortisone, en inhibant la boucle autocrine/paracrine menant à la synthèse de HGF, bloquait la prolifération de la lignée d'ostéoblastes SaM-1, mais pas celle des lignées d'Ostéosarcome HOS et SaOS2, non productrices d'HGF. Ces données sont en accord avec les nôtres, l'inhibition de l'expression de C-Met par l'emploi des pré-miR-198 et -206 n'ayant pas permis d'observer d'effet sur la viabilité cellulaire (Fig. 4C).

A l'instar des molécules inhibitrices de C-Met telles que le **PF-2341066** ou le **PHA-665752** précédemment évoquées, notre étude s'inscrit finalement dans une démarche thérapeutique d'inhibition de la dissémination métastatique associée à une diminution de l'expression de C-Met. Les injections intra-tumorales des **miR-198** et -**206** conduisant en effet à réduire le nombre de métastases pulmonaires des animaux traités (**Fig. 5D, 5E**), ce travail souligne tout l'intérêt de ces miARNs comme potentielles nouvelles molécules thérapeutiques.

II.3. LES microARNs DANS LA CHIMIORESISTANCE DES SARCOMES OSSEUX :

II.3. Implication des miARNs dans la chimiorésistance des Sarcomes Osseux :

<u>Article 6 : « La répression de TAp73β par le miARN-193a-5p module la chimiorésistance au</u> <u>Cisplatine des Sarcomes Osseux » :</u>

Oncotarget. 2016 Jul 29.

Camille Jacques, Lidia Rodriguez Calleja, Marc Baud'huin, Thibaut Quillard, Dominique Heymann, François Lamoureux, Benjamin Ory.

II.3.1. Introduction à l'Article 6 :

Dans la partie précédente de cette thèse, nous avons pu démontrer qu'en ciblant de façon directe certains **oncogènes** tels que **C-Met** ou des effecteurs de la voie du **TGF-**β, les **miARNs** étaient impliqués dans la **dissémination métastatique** de l'Ostéosarcome. Ce processus caractérise les stades cancéreux les plus **avancés** et fait partie des mécanismes d'échappement tumoral pouvant apparaître malgré une prise en charge thérapeutique efficace dans un premier temps. Ainsi, les **résistances thérapeutiques** et la **dissémination métastatique** sont intimement liées et une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à la chimiorésistance demeure toujours, à l'heure actuelle un des enjeux majeurs en Cancérologie. Cette partie propose donc d'étudier l'implication des **miARNs** dans la **chimiorésistance** des **Sarcomes Osseux** et développera plus particulièrement le rôle du **miR-193a-5p** dans la **chimiorésistance** au **Cisplatine**.

Avec environ cent-cinquante nouveaux cas par an en France, l'Ostéosarcome et le Sarcome d'Ewing sont les deux types de tumeurs osseuses malignes primitives les plus fréquents. Ces cancers agressifs sont très souvent localisés au niveau des os longs et touchent principalement les adolescents et les jeunes adultes. Bien que le **Cisplatine** soit une molécule couramment employée pour leur traitement, certains patients y sont malheureusement mauvais répondeurs. Par ailleurs, les **processus moléculaires** par l'intermédiaire desquels le Cisplatine induit la **mort des cellules cancéreuses** ne sont pas encore complètement élucidés. Dans un tel contexte, il est donc important de mieux les définir afin de mieux comprendre comment ces cancers parviennent à s'en affranchir en développant des mécanismes de chimiorésistance.

Il a été développé dans l'<u>Article 4</u>, que les facteurs de transcription de la famille de p53, Δ Np63 α et TAp73 β régulaient l'expression de miARNs, mais il n'en demeure pas moins vrai, qu'à l'inverse, ces facteurs soient eux aussi la cible de régulations épigénétiques dépendantes des miARNs. L'étude suivante s'attachera donc à mieux comprendre comment la régulation de l'isoforme suppresseur de tumeurs TAp73 β par le miR-193a-5p peut être un des mécanismes à l'origine de la résistance des Sarcomes Osseux au Cisplatine.

Dans un premier temps, ce travail a ainsi visé à mieux appréhender comment **TAp73** β , déjà connu pour son implication dans le maintien de la stabilité du génome et dans les mécanismes de chimiosensibilité, était impliqué dans la chémo-réponse des Sarcomes Osseux au Cisplatine²⁶⁸. Ce travail a pu démontrer l'implication de ce suppresseur de tumeurs dans les mécanismes **d'induction d'apoptose** en réponse au Cisplatine dans ce modèle (**Fig. 3a, 3b, 5a et 5c**). En faisant varier le niveau d'expression de ce gène dans différentes lignées d'Ostéosarcome et de Sarcome d'Ewing, nous avons par ailleurs pu souligner que TAp73 β était aussi capable de contrôler les **capacités clonogéniques** de ces cellules ainsi que leur **viabilité** en réponse au Cisplatine (**Fig. 3a, 3c, 3d, 5a, 5b**).

Compte tenu de ces résultats, il était donc tout à fait envisageable que des mécanismes d'inhibition de l'expression de TAp73ß dépendants des miARNs, soient en partie responsables de la chimiorésistance au Cisplatine. Par ailleurs, un mécanisme de résistance endogène au Cisplatine impliquant le **miR-193a-5p** avait déjà été mis en évidence dans un modèle de carcinome de la tête et du cou, ce travail ayant également démontré que **TAp73**ß était une cible directe de ce miARN²⁰³. La modulation de l'expression du **miR-193a-5p** a donc été réalisée *in vitro*, dans différentes lignées de Sarcomes Osseux, à l'aide du miARN ou de l'anti-miARN de synthèse correspondant. Ces expérimentations ont ainsi permis de démontrer que ce petit ARN régulait la **viabilité cellulaire**, les **capacités clonogéniques** et la **mort cellulaire par apoptose** induite par le Cisplatine dans ce modèle (**Fig. 4a à 4g et 6a à 6h**). Dans des perspectives d'utilisation cliniques, nous avons également pu montrer que l'inhibition de ce miARN **re-sensibilisait** la lignée d'Ostéosarcome MG63 au Cisplatine (**Fig. 6a et 6h**), apportant ainsi la preuve de concept que la réduction de l'expression de ce miARN puisse constituer une nouvelle approche thérapeutique d'optimisation de l'efficacité de cet agent dans ces cancers.

Ces résultats soulignent donc l'implication du miR-193a-5p dans la chimiorésistance au Cisplatine des Sarcomes Osseux et ouvrent la voie aux nouvelles opportunités thérapeutiques suggérées par le ciblage de l'axe miR-193a-5p/TAp73β dans ces pathologies.

II.3.2. Article 6: « miRNA-193a-5p repression of p73 controls Cisplatin chemoresistance in primary bone tumors » *Oncotarget. 2016 Jul 29.*

Camille Jacques, Lidia Rodriguez Calleja, Marc Baud'huin, Thibaut Quillard, Dominique Heymann, François Lamoureux, Benjamin Ory.

miRNA-193a-5p repression of p73 controls Cisplatin chemoresistance in primary bone tumors

Camille Jacques^{1,2}, Lidia Rodriguez Calleja^{1,2}, Marc Baud'huin^{1,2,3}, Thibaut Quillard^{1,2}, Dominique Heymann^{1,2,3}, François Lamoureux^{1,2} and Benjamin Ory^{1,2}

¹ INSERM, UMR 957, équipe labellisée ligue 2012, 1 Rue Gaston Veil, Nantes, France

² Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, 1 Rue Gaston Veil, Nantes, France

³ Nantes University Hospital, 1 Rue Gaston Veil, Nantes, France

Correspondence to: Benjamin Ory, email: Benjamin.ory@univ-nantes.fr Keywords: chemoresistance, microRNAs, p73 Received: June 30, 2016 Accepted: July 14, 2016

Published: July 29, 2016

ABSTRACT

Osteosarcoma and Ewing Sarcoma are the two most common types of Bone Sarcomas, principally localized at the long bones of the extremities and mainly affecting adolescents and young adults. Cisplatin is one of the current options in the therapeutic arsenal of drugs available to cure these aggressive cancers. Unfortunately, chemoresistance against this agent is still a major cause of patient relapse. Thus, a better understanding of the molecular pathways by which these drugs induce cancer cell death, together with a better delineation of the origins of chemoresistance are required to improve the success rate of current treatments. Furthermore, as p53 is frequently mutated in Bone Sarcomas, other pathways in these cancers must mediate drug-induced cell death. Here, we demonstrate for the first time that TAp73 β , a p53-family protein, is implicated in Cisplatin-induced apoptosis of Bone Sarcomas'. Furthermore, while acquired resistance developed by cancer cells against such drugs can have multiple origins, it is now well accepted that epigenetic mechanisms involving microRNAs (miRNAs) are one of them. We show that miRNA-193a-5p modulates the viability, the clonogenic capacity and the Cisplatin-induced apoptosis of the Bone Sarcoma cells through inhibition of TAp73β. Collectively, these results shed light on the involvement of miR-193a-5p in Cisplatin chemoresistance of Bone Sarcomas', and they open the road to new therapeutic opportunities provided by targeting the miR-193a-5p/TAp73 β axis in the context of these malignancies.

INTRODUCTION

While they are relatively uncommon cancers, Osteosarcoma and Ewing Sarcoma are the two most frequent types of Primary Bone Sarcomas, affecting both children and young adults. Resulting from a boneremodeling processes' deregulation, these aggressive tumors mainly arise at the long bones of the extremities, and are characterized by an ectopic and anarchic osteoid neo-formation associated with osteolysis. With an incidence of 4 to 5 cases per million and a peak around 18 years old, Osteosarcoma is by far the most common type of these neoplasms [1, 2]. Although no specific genetic lesions have been uncovered until now to distinguish these tumors, the locus of the tumor suppressor *p53* gene is altered in about 50% of the patients [3, 4]. With approximately 225 new cases diagnosed per year in the United-States, Ewing Sarcoma is the second most common Bone cancer after Osteosarcoma [5]. It displays an incidence peak around 15 years of age and a slight prevalence in males [6, 7]. In 85% of the cases, Ewing Sarcoma is outlined by the chromosomal translocations t(11;22)(q24;12), giving rise to the chimeric transcription factor EWS-Fli1, whose the oncogenic features are well documented [8]. In addition, a mutational hot-spot of *p53* was suggested in Ewing Sarcoma, as the same missense mutation at codon 176 was found in several samples from primary tumors [9].

Presently, the standard of care for young patients suffering from Bone Sarcomas is based on a multimodal

therapy including neo-adjuvant chemotherapy and surgical resection, together with local radiotherapy and adjuvant chemotherapy [5, 10]. Such treatments have markedly improved the outcomes of the patients worldwide, since the 5-year survival rates after treatment approach 60-70% for the localized forms. Unfortunately, chemoresistance, tumor burden and pulmonary metastases at the time of diagnosis all confer a very poor prognosis, and survival rates drop to around 30% in these cases [11]. The unsatisfactory outcomes for such patients and the toxicity -based limitations of current chemotherapeutic agents both underscore the urgency of finding novel therapeutic strategies. In this context, there is a real need to better understand the relevant drug-induced cell death processes and chemoresistance-related mechanisms.

The P73 gene is a member of the P53-related transcription factor family. It plays a crucial role during embryonic development and tumor progression, through mechanisms involving control of the genome stability and chemosensitivity [12-17]. Although P53 and P73 display a common architecture, with several highly homologous domains, different promoters and alternative splicings contribute to the generation of a considerable number of distinct P73 isoforms. Longer isoforms bearing the trans-activating N-terminal domains are called the TA isoforms and mimic the tumor-suppressor function of p53 through their ability to trans-activate apoptotic transcriptional target-genes such as p21, Noxa or PUMA [18]. On the contrary, the $\Delta Np73$ isoforms, lacking the TA domain, have a rather dominant-negative function [19]. Although P53 is mutated or inactivated in about 50% of the human cancers, it is rarely the case for P73, making it a potent drug-induced-cell-death mediator [20, 21]. It is thus noteworthy that the expression of P73 modulates chemosensitivity of several cancer types. Nonetheless, this feature remains to be investigated in the Bone Sarcomas' context [22].

It has already been established that miRNA-193a-5p is implicated in P73 regulation [23]. miRNAs are small non-coding RNAs involved in the post-transcriptional regulation of the gene expression. As they act as key regulators of multiple target-genes, they are able to finetune various physiological processes and are aberrantly deregulated in several diseases including cancers [24-26]. These features together with their substantial stability could therefore make them potent bio-markers, novel targets or powerful drugs [27]. We have already described that the TAp73B isoform is a mediator of Cisplatin-induced apoptosis in a head and neck squamous cell carcinoma model [23]. Additionally, we also demonstrated that through modulating the expression of TAp73β, the miR-193a-5p was a key component of an endogenous Cisplatinchemoresistance mechanism. In this study, we sought to determine if the TAp73 β /miR-193a-5p axis could also be implicated in the Cisplatin-resistance of Bone Sarcomas. We observed that inhibiting TAp73 β reduces the caspase activity and increases both the clonogenic features and the cell's Cisplatin-resistance. Moreover, blocking the Bone Sarcoma cells' endogenous miR-193a-5p expression reverses such effects, leading to Cisplatin-sensitization. Such results shed light on the role of the miR-193a-5p in the Bone Sarcomas' Cisplatin-chemoresistance and open the road to new therapeutic opportunities provided by its targeting in an attempt to improve the outcome of these pediatric cancers.

RESULTS

Human Bone Sarcoma cells express TAp73β and the miR-193a-5p and are Cisplatin- sensitive

To directly assess the relevance of studying the TAp73β/miR-193a-5p axis in the drugs-resistance mechanisms of Bone Sarcomas, we first evaluated the expression of TAp73β at mRNA level and the miR-193a-5p's expression in seven Osteosarcoma cell lines and in seven Ewing Sarcoma cell lines (Figure 1a, 1b). As the JHU-029 head and neck squamous carcinoma cells were previously used as a model to study the p63/miR193a-5p/p73 axis, they were included in our screening and serves as a control [23]. All the cell lines express TAp73 β except the CAL-72 one, potentially because it is the only Osteosarcoma cell line of our panel displaying a wild-type and functional p53 status (Figure 1a, Supp. Figure 1). In addition, the 143B cell line displays the highest expression of this apoptotic factor. It is indeed about 50% more elevated than in the JHU-029 carcinoma cells previously presented as over-expressing it [23]. The SaOS₂, SJSA-1, HOS, EW24 and SKES-1 cells display an intermediate expression level, whereas this transcription factor is barely detectable in the other cell lines. The miR-193a-5p is expressed in all the cell lines tested, but significantly more in the Osteosarcoma cells compared to the Ewing Sarcoma ones (Figure 1b). These results strongly suggest the implication of the miR-193a-5p in Osteosarcomaspecific cellular processes but nevertheless fully justify pursuing this work in both Bone Cancer types in order to assess the impact of such discrepancy in the drugresistances' context. The same Bone Sarcoma cells' panel was treated with Cisplatin to assess its effects on the cell viability (Figure 1c, 1d, 1e). A concentration-dependent inhibition of cell viability was observed in all the cell lines studied with important variability of the GI₅₀. The Ewing Sarcoma cells A673, EW24 and IOR/BRZ are the more sensitive ones as they exhibited GI_{50} between 1.472 and 2.296 μ M (Figure 1d, 1e). With GI₅₀ comprise between 4.067 and 11.95 µM, the SJSA-1, CAL-72, 143B, HOS, U2OS, TC32, RDES, TC71 and SKES-1 cells display an intermediate sensitivity. In contrast, the MG63 and SaOS, cell lines are twenty to forty times less sensitive compared



Figure 1: Human Bone Sarcoma cells express TAp73β and the miR-193a-5p and are Cisplatin- sensitive. a. Expression of TAp73β and **b.** miR-193a-5p were evaluated by qRT-PCR in seven human Osteosarcoma (black patterns) and seven Ewing Sarcoma (grey patterns) cell lines and compared with the ones of the human head and neck squamous carcinoma cells JHU-029 (white pattern). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, β2-microglobulin and RNU6B were used as housekeeping genes. Error bars show standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. **c.** Seven human Osteosarcoma cell lines (143B, CAL-72, HOS, SaOS2, SJSA-1, MG63 and U2OS) and **d.** seven Ewing Sarcoma cell lines (A673, EW24, IOR/BRZ, TC32, TC71, SKES-1 and RDES) were cultured for 48 h in the presence of Cisplatin at the indicated concentrations and cell viability was determined by WST-1 assay. The head and neck squamous cell carcinoma cell line JHU-029 was used as a reference cell line. The viability of the non-treated control of each cell line was assigned as 100%. **e.** GI₅₀ for Cisplatin in tumor cell lines. **f.** Correlation between the Cisplatin GI₅₀ and the miR-193a-5p expression in the human Bone Sarcoma cell lines, assessed by WST-1 assay and by qRT-PCR and tested by the *Pearson product-moment correlation test.* **g.** GI₅₀ for Cisplatin in Osteosarcoma (black patterns) and Ewing Sarcoma cell lines (grey patterns). An unpaired Student's *t-test* was used to compare the differences between the mean values of the Cisplatin-GI₅₀ and the miR-193a-5p's expression in the burst of the Cisplatin-193a-5p's expression in the mean values of the Cisplatin-93, and the miR-193a-5p's expression in the Student's *t-test* was used to compare the differences between the mean values of the Cisplatin-93, and the miR-193a-5p's expression in the Osteosarcoma and in the Ewing Sarcoma cell lines.

with the first ones, with a GI_{50} of 24.85 μ M and around 45.57 µM respectively. Interestingly, those two cell lines are the ones displaying the highest miR-193a-5p levels (Figure 1b). A statistically significant correlation was found between the GI₅₀ and the miR-193a-5p expression level in all the cell lines, reinforcing the hypothesis of the miR-193a-5p's involvement in the Cisplatinchemoresistance in such model (Figure 1f). In addition, a non-significant higher global average GI₅₀ is observed in the Osteosarcoma compared with the Ewing Sarcoma cells (Figure 1g). Interestingly, a significant higher global expression of the miR was also found in the Osteosarcoma cell lines compared with the Ewing Sarcoma ones (Figure 1h), arguing again in favor of its presumed implication in the Cisplatin-chemoresistance. Following investigations were thus based on the hypothesis that a high miR-193a-5p expression could induce a high Cisplatinchemoresistance due to the miRNA-inhibitor's effects on TAp73 β 's expression. The cell lines were thus chosen for further analysis based on their TAp73B and miR-193a-5p expression levels.

Cisplatin modulates the expression level of the miR-193a-5p, TAp73 β and its target-genes in Bone Sarcoma cells

To better understand to what extent the miR-193a-5p/TAp73 β axis is involved in the Cisplatin-response of the Bone Sarcoma cells, the RDES Ewing Sarcoma cell line and the SJSA-1 Osteosarcoma one were treated or not with 3 μ M Cisplatin during twenty-four hours and the expression levels of the miR-193a-5p, TAp73 β and two of its target-genes, p21 and MDM2 were assessed by qRT-PCR (Figure 2a, 2b, 2c, 2d and Supp. Figure 2a, 2b, 2c, 2d). In the RDES cells, we can notice that the Cisplatin induces a down-regulation of the miR-193a-5p from about 82% compared with the non-treated control cells. As expected, the expression levels of TAp73 β and two of its direct targets are strongly increased in these conditions. Similar results were observed in the SJSA-1 cells except for MDM2 expression (Supp. Figure 2a, 2b, 2c, 2d). Those two cell lines were picked because of their relatively low TAp73 β expression level allowing and easier activation observation. These results highlight the inhibitory effect of the Cisplatin on the expression of the miR-193a-5p, but the exact underlying mechanism needs to be investigated.

TAp73β-mediated Cisplatin sensitivity of human Bone Sarcomas

In order to better delineate to what extent TAp73ß is implicated in the Cisplatin-response of Bone Sarcoma cells, TAp73 was down-regulated with siRNAs in the RDES Ewing Sarcoma cell line used in Figure 2 (with a low TAp73 β expression level) and in the 143B Osteosarcoma one because they express the highest TAp73 β level of all the cell lines tested (Figure 3a and Supp. Figure 3a). According to the tumor suppressive functions of TAp73 [28], the consequent 50% reduction of TAp73 β 's expression obtained in the RDES cell line (Figure 3a) leads to a significant diminution of its caspase 3/7 activity, supporting the implication of the TAp73 β isoform in the apoptotic processes in these cells (Figure 3b). Moreover, these results are linked to the improved clonogenic capabilities observed in these conditions, as the TAp73si-cells were able to form about 2.5 times more clones in 2D than the GFPsi ones (Figure 3c). In addition, the implication of TAp73 in the Cisplatin-sensitivity of the RDES cells was highlighted by the fact that a reduced-TAp73 expression in those cells contributes to reduce their sensitivity to Cisplatin in a viability assay (Figure 3d). The same effects were confirmed in the 143B Osteosarcoma cells after TAp73 inhibition, even if this cell line displays the highest TAp73ß expression level compared with the other cell lines (Supp. Figure 3a, 3b, 3c, 3d and Figure 1a). Together, these data support the implication of TAp73 in



Figure 2: Cisplatin modulates the expression level of the miR-193a-5p, TAp73 β and its target-genes in Bone Sarcoma cells. Expression of miR-193a-5p a., TAp73 β b., p21 c. and MDM2 d. were evaluated by qRT-PCR in the RDES Ewing Sarcoma cell line after treating the cells or not during twenty-four hours with 3 μ M Cisplatin. RNU6B, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β 2-microglobulin were used as housekeeping genes. Error bars show the standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments.

both the apoptotic and the clonogenic processes, revealing that this gene is related to the Cisplatin-sensitivity in the Bone Sarcoma cells. These results raise the question of the implication of the miR-193a-5p in the Cisplatin-chemoresistance though its ability to regulate TAp73 β .

The TAp73 β 's targeting miR-193a-5p is implicated in the Cisplatin chemoresistance of human Bone Sarcomas

To assess the impact of the miR-193a-5p in the Cisplatin-resistance, its overexpression was performed in the RDES Ewing Sarcoma cell line and in the SJSA-1 Osteosarcoma one. These two cell lines display a non-functional p53 protein, weakly express both TAp73 β and the miR-193a-5p and exhibit the same intermediate Cisplatin sensitivity as shown by their equivalent GI₅₀ (Figure 1 and Supp. Figure 1). Such features raise

the opportunity to easily increase the miR-193a-5p's expression level by transient transfections of pre-miRNAs and make them interesting models in the context of our study. The pre-miR-193a-5p was thus transiently transfected and the cells were treated forty-eight hours later with Cisplatin (Figure 4 and Supp. Figure 4). The transfection's efficiency was validated by qRT-PCR in both cell lines (Figure 4a and Supp. Figure 4a). The consequent expected down-regulation of TAp73B, p21 and MDM2 was also verified at transcriptional level (Figure 4b, 4c, 4d and Supp. Figure 4b, 4c, 4d). In absence of Cisplatin, increasing the miR-193a-5p's expression induces a slight reduction in the caspase 3/7 activity (Figure 4e and Supp. Figure 4e), corroborating the previous results obtained after reducing the expression of TAp73 (Figure 3b and Supp. Figure 3b). The same effect is observed after a 3 µM Cisplatin-treatment. Increasing the miR-193a-5p's expression significantly reduces the caspase 3/7 activity by 14.13 and by 13.23% in the RDES and in the SJSA-1 cells



Figure 3: TAp73β-mediated sensitivity of human Bone Sarcomas: regulation of apoptosis and clonogenicity. a. Expression of TAp73β was evaluated by qRT-PCR in the RDES Ewing Sarcoma cell line, after infecting the cells with viral-supernatant of GFPsi -or TAp73si-transduced HEK293FT cells. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β 2-microglobulin were used as housekeeping genes. **b.** The basal apoptosis level was then evaluated by dosage of the caspase 3/7 activity in protein extracts from the same cells and in the same conditions as in (a). Error bars show the standard deviation for *n* = 3 measurements from representative experiments. **c.** The basal clonogenic capabilities of the cells were evaluated in the same cells and in the same conditions as in (a). One thousand cells were seeded in 6-wells plates and incubated until the possibility of macroscopic clones counting. The cells were then fixed in glutaraldehyde and stained with Crystal Violet. Error bars show the standard deviation for *n* = 3 measurements from representative experiments. Representative pictures of the wells in each condition were chosen. An unpaired Student's *t-test* was used to compare the different conditions in the caspase 3/7 activity assays and in the clonogenic assays. **d.** The same cells in the same conditions as in (a) were cultured for 48 h in the presence of Cisplatin at the indicated concentrations and cell viability was determined by WST-1 assay. The viability of the non-treated control of each cell line was assigned as 100%. A two-way ANOVA test was used to compare the different conditions in the viability assays.

respectively. Inducing the expression of the miR-193a-5p also reduces the Poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage induced by the Cisplatin (Figure 4f and Supp. Figure 4f) and improves the cell viability after only two hours of Cisplatin treatment in both cell lines (Figure 4g and Supp. Figure 4g). Taking together, these results argue for the anti-apoptotic role of the miR-193a-5p, through its TAp73\beta's targeting capabilities and strongly support its implication in the Cisplatin-chemoresistance in this model.

The TAp73β-mediated Cisplatin-induced cell death is countered by miR-193a-5p in human Bone Sarcoma cells

To address the ability of miR-193a-5p to modulate the Cisplatin sensitivity of Bone Sarcoma cells through targeting TAp73 β , a modulation of the expression level of both partners was performed. The MG63 cells display one of the highest basal Cisplatin chemoresistance, probably due to their elevated miR-193a-5p's expression level and their weak basal TAp73b's expression level compared with all the Bone Sarcoma cell lines previously screened (Figure 1). Regarding those features, this cell line appears as the best model to follow this strategy. To assess the implication of TAp73 β in the Cisplatin-chemoresistance in this cell line, the cells were first transiently transfected with a TAp73 β coding vector only. The efficiency of the transfection was validated by qRT-PCR, as the expression of TAp73B was about five thousand times more elevated in the TAp73^β-transfected cells than in the control ones (Figure 5a left panel). These results were also confirmed at protein level, however in a lower extent (Figure 5a right panel). Such increase has a functional effect on the cell viability, increasing the cell sensitivity in response to a four-days Cisplatin treatment at each concentration tested (Figure 5b). Moreover, increasing the expression of TAp73ß markedly improve the Cisplatin-induced caspase 3/7 activity (Figure 5c). Nonetheless, increasing the expression of the TAp73β-targeting miR-193a-5p significantly decreases the caspase 3/7 activities by



Figure 4: The TAp73ß's targeting miR-193a-5p is implicated in the Cisplatin chemoresistance of human Bone Sarcomas. a. miR-193a-5p expression was assessed by qRT-PCR in the RDES Ewing Sarcoma cell line forty-eight hours after either the pre-miR control or the pre-miR-193a-5p mimic's transfection. The expression of TAp73 β b, p21 c, and MDM2 d. were assessed by qRT-PCR in the same conditions as described in (a). RNU6B, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β 2-microglobulin were used as housekeeping genes for qRT-PCR and the error bars show the standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. e. RDES Ewing Sarcoma cell line was transiently transfected in the same conditions as in (a) and was treated forty-eight hours later with 3 µM Cisplatin or the same amount of NaCl 0.9% for additional forty-eight hours. The apoptosis was then evaluated by dosage of the caspase 3/7 activity in protein extracts. Error bars show the standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. A two-tailed paired Student's *t-test* was used to compare the different conditions in the caspase 3/7 activity assays. **f.** Protein's extracts from RDES Ewing Sarcoma cell line in same conditions as in (a) were subjected to Immunoblotting with anti-cleaved-PARP antibodies. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as loading control. g. RDES Ewing Sarcoma cell line was transiently transfected with either pre-miR control or pre-miR-193a-5p mimics and was cultured forty-eight hours later in the presence of Cisplatin at the indicated concentrations for two hours. The cell viability was determined by WST-1 assay and compared with control. The viability of the non-treated control was assigned as 100%. A two-way ANOVA test was used to compare the different conditions in the viability assays. Data refer to three different experiments and western blot images are representative of these. Black lines show where the original gel was cropped to obtain the final image

22.5%. Finally, as predicted by those data, increasing the expression of the miR-193a-5p counteracts the Cisplatinchemo-sensitizing effects of TAp73 β on the cell viability (Figure 5d).

Inhibiting the miR-193a-5p increases the expression of TAp73 β and restores the Cisplatin-sensitivity of human Bone Sarcoma cells

As TAp73 β is a target of the miR-193a-5p, we hypothesized that decreasing the endogenous expression level of this miR may have the same consequences on the Cisplatin-sensitivity than over-expressing TAp73 β . We then tested our sensitizing strategy on the partially Cisplatin-resistant cell line MG63, moreover expressing high level of miR-193a-5p. The MG63 cells were thus transfected with a control anti-miR or the anti-miR- 193a-5p and the efficiency of transfection was validated by qRT-PCR (Figure 6a). As expected, the expression of TAp73 β and two of its target-genes (p21 and MDM2) was increased (Figure 6b, 6c, 6d, 6e). The functional consequence of such modulation was assessed on the caspase 3/7 activities and on the clonogenic capabilities of those cells (Figure 6f, 6g). Without Cisplatin-treatment, inhibiting the expression of the miR only leads to a slight non significant increase of the caspase activity (Figure 6f) but significantly decreases the cell colony-forming ability (Figure 6g). In addition, inhibiting the expression of the miR-193a-5p potentiates the effects of the Cisplatin on the cell viability, significantly sensitizing the cells to this agent (Figure 6h). In addition, the use of the anti-miR-193a-5p also displays a chemo-sensitizer's effect both on the 143B Osteosarcoma and the RDES Ewing Sarcoma cells, in which the expression of TAp73 β was artificially reduced (Supp. Figure 5a and b). Taken together, these



Figure 5: The TAp73β-mediated Cisplatin induced cell death is opposed by the miR-193a-5p in human Bone Sarcoma cells. a. The TAp73ß's expression was assessed in the MG63 Osteosarcoma cell line both at mRNA level by gRT-gPCR (left panel) and at protein level by Western Blotting (right panel) forty-eight hours after the cell's transient transfection with the empty vector pcDNA3 or the TAp73 β one. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β 2-microglobulin were used as housekeeping genes for qRT-PCR. Actin was used as a loading control for Immunoblotting. b. MG63 Osteosarcoma cell line was transiently transfected with either the empty vector pcDNA3 or the TAp73β one and was cultured forty-eight hours later in the presence of Cisplatin at the indicated concentrations for four days. The cell viability was determined by WST-1 assay and compared with control. The viability of the non-treated control was assigned as 100%. Error bars show the standard deviation for n = 2 measurements from representative experiments. An unpaired Student's *t-test* was used to compare the different conditions in the viability assays. c. MG63 cells were transiently transfected with either the pre-miR control or the pre-miR-193a-5p as the same time as pcDNA3 empty vector or the TAp73ß containing-one. The cells were then cultured forty-eight hours later in the presence of 3 µM Cisplatin for additional forty-eight hours. The apoptosis was then evaluated by dosage of the caspase 3/7 activity in protein extracts. Error bars show the standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. A two-tailed paired Student's t-test was used to compare the different conditions in the caspase 3/7 activity assays. d. MG63 cells were transiently transfected with either the pre-miR control or the pre-miR-193a-5p as the same time as pcDNA3 empty vector or the TAp73β containing-one. The cells were then cultured forty-eight hours later in the presence of 3 µM Cisplatin at the indicated concentrations for additional forty-eight hours. The cell viability was determined by WST-1 assay and compared with control. The viability of the non-treated control was assigned as 100%.

results bring the proof of concept that artificially inhibiting the miR-193a-5p expression could be a useful strategy to potentiate the Bone Sarcoma cell's sensitivity to the Cisplatin.

DISCUSSION

The chemoresistance developed by the tumor's cells is one of the main causes of the cancer-therapies' failure, especially in Bone Sarcomas which are very aggressive and in which only few therapeutic options are available. The origins of the acquired drug-resistance can be multiple, but a progressive loss of expression of tumor-suppressor genes along the treatment-course often occurs in cancer cells. As these genes normally sense the genotoxic stress or mediate the drug-induced apoptotic response, such cancer cells can overcome the chemotherapeutic agents' effects. Beyond the mutational processes that can affect such tumor-suppressor's expression or activity, their silencing by the miRNAs is an epigenetic mechanism that has been well accepted to deregulate the drug-resistance-related genes. Unfortunately, only a few studies are available in



Figure 6: Inhibiting the miR-193a-5p increases the expression of TAp73ß and restores the Cisplatin-sensitivity of human Bone Sarcoma cells. a. miR-193a-5p's expression was assessed by qRT-PCR in the MG63 Osteosarcoma cell line forty-eight hours after either the anti-miR control or the anti-miR-193a-5p's transfection. TAp73 β 'S expression was assessed by qRT-PCR **b.** and by Western Blotting c. in the same conditions as described in (a). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β 2-microglobulin were used as housekeeping genes for qRT-PCR and actin serves as Immunoblotting's loading control. The expression of p21 d. and MDM2 e. were assessed by qRT-PCR in the same conditions as described in (a). β2-microglobulin was used as housekeeping genes for qRT-PCR. For the qRT-PCR experiments, error bars show the standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. **f.** The basal apoptosis level was then evaluated by dosage of the caspase 3/7 activity in protein extracts from the same cells and in the same conditions as in (a). Error bars show the standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. g. The basal clonogenic capabilities of the cells were evaluated in the same cells and in the same conditions as in (a). One thousand cells were seeded in 6-wells plates and incubated until the possibility of macroscopic clones counting. The cells were then fixed in glutaraldehyde and stained with Crystal Violet. Error bars show the standard deviation for n = 3 measurements from representative experiments. Representative pictures of the wells in each condition were chosen. A two-tailed paired Student's t-test was used to compare the different conditions in the caspase 3/7 activity assays and in the clonogenic assays. h. MG63 Osteosarcoma cell line was transiently transfected with either the anti-miR control or the anti-miR-193a-5p and was cultured forty-eight hours later in the presence of Cisplatin at the indicated concentrations for two hours. The cell viability was determined by WST-1 assay and compared with control. The viability of the non-treated control was assigned as 100%. A two-way ANOVA test was used to compare the different conditions in the viability assays.

the Bone Sarcoma's context and the precise functions of these molecules still need to be deciphered. For instance, the miR-34c was reported to be decreased in Cisplatin-poor responders' Osteosarcoma patients compared to good ones⁵¹.

Here, we report that the p53-related tumorsuppressor gene TAp73ß is implicated in the Cisplatininduced apoptosis of Bone Sarcomas and that the miRNA-193a-5p, through its TAp73ß's targeting ability, consequently modulates the Cisplatin-sensitivity of these cancers. Interestingly, we have highlighted that this mechanism occurs both in Osteosarcoma and Ewing Sarcoma, even if the global expression levels of TAp73β and the miRNA-193a-5p are lower in Ewing Sarcoma (Figure 1a, 1b). The difference in the global expression level of TAp73 β between these two models might be explained by the osteoblastic-origin of Osteosarcoma and by the requirement of p73 during the vitamin D-mediated osteoblastic differentiation [29]. In addition, this difference could also be supported by the fact that human bone marrow mesenchymal stem cells, which are the cells of origin of Ewing Sarcoma, display a silenced-expression of the p73 gene through the hypermethylation of its promoter [30]. Furthermore, according to both its p53-related role and pro-apoptotic functions, the expression of TAp73 is often higher in a p53-functionnally deficient cellularbackground [31]. This is in agreement with the wildtype p53 status of the CAL-72 Osteosarcoma cell line, in which no TAp73ß expression was detectable (Figure 1a and Supp. Figure 1). In addition, even if the miRNA-193a-5p is poorly documented in the Bone context, the expression of this miR appears to decrease during the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells [32]. However, the miR-193a-3p was reported to be five times more elevated in the MG63 Osteosarcoma cell line than in the HOB osteoblasts, letting presuming here of its oncogenic role [33].

Additionally, this study reports for the first time the inhibitory effect of the Cisplatin on the miR-193a-5p's expression of Bone Sarcomas. As a consequence, the expression of the pro-apoptotic factor TAp73 β and two of its target-genes, p21 and MDM2 are increased (Figure 2 and Supp. Fig.2). Our results are in accordance with a previous work, demonstrating that increasing TAp73B's expression leads to a rapid and robust up-regulation of p21 in the SaOS₂ Osteosarcoma cell line [34]. Through overexpression and knockdown experiments, we found that TAp73 β is implicated in the regulation of both the caspase 3/7 activity and the clonogenic capabilities of the Bone Sarcoma cells. Thus, such involvement in these cellular processes functionally confers to TAp73β a mediator role in the Cisplatin-induced apoptosis of the Bone Sarcomas. These results corroborate recent studies, which have also demonstrated the role of p73 in the Cisplatin-related apoptosis in several models [35, 36].

Regarding its p53-redundant-functions, the

epigenetic regulation of TAp73ß through miRNAs has already been described and interestingly, even if in silico analysis predicts that the miRs -125b, -486-3p and -34a could potentially target TAp73 [37], only the miR-193a-5p was validated as a direct *bona-fide* TAp73β's repressor [23]. Through modulating the miR-193a-5p's expression level, we highlighted its implication in the Cisplatinchemoresistance of the Bone Sarcoma cells, as previously shown in a head and neck squamous cell carcinoma model [23]. In contradiction with our results (Figure 4e, 5c, 6f and Supp. Figure 4e), it was interestingly previously reported that the miR-193 is an inducer of the caspase-3 activity, arguing here for its tumor-suppressive functions [38]. In addition, beyond the fact that the miR-193a-5p can probably inhibit multiple target-genes, it seems clear that its dual role in the apoptotic-processes' control could be partially explained by its p73-targeting features. Obviously, the different functions of the isoforms of p73 are not yet fully elucidated and are undoubtedly modulated by the interactions of p73 itself with the other members of the p53 family, especially p63. In return, this gene-family also regulates the expression of this miRNA, as it was reported that the oncogenic transcription factor $\Delta Np63\alpha$ is an inducer of the miR-193a-5p's expression, thus contributing to the Cisplatin-chemoresistance [23]. These data could explain a previous study reporting that a stable p73 knock-down in breast cancer cell lines induce a higher Cisplatin chemoresistance in the cells which express Δ Np63 compared with these which do not [36].

In summary, we present here evidence for an original epigenetic regulatory mechanism placing the TAp73 β /miRNA-193a-5p axis as a major pathway contributing to the Cisplatin-sensitivity of the Bone Sarcomas. From a therapeutic standpoint, our study highlights the proof-of-concept that inhibiting the miR-193a-5p expression consequently sensitizes the Bone Sarcoma cells to the Cisplatin. Finally, this work sustains the relevant feasibility of using miRNAs-inhibitors in association with standard Cisplatin-treatment to improve the response of the young patients treated with this drug.

MATERIALS AND METHODS

Tumor cell lines and therapeutic agents

Seven human Ewing Sarcoma cell lines were used: the A673 TC32, SKES-1 and RDES cell lines, which were kindly provided by Dr. S. Burchill (Children's Hospital, Leeds, United Kingdom), the EW24 and TC71 cell lines, which were a gift from Dr. O. Delattre (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U830, Paris, France) and the IOR/BRZ one. Seven Osteosarcoma cell lines were studied: 143B, CAL-72, MNNG/HOS (thereafter called HOS), SaOS₂, SJSA-1, MG63 and U2OS.All these cells provide from the American Tissue Cell Collection (ATCC). The JHU-029 cells were a generous gift of David Sidransky, MD (Johns Hopkins University, USA) and are used as positive control because of their use in the previous study of Ory et al. [23]. HEK 293FT cells (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) are used to produce lentiviral particles. See supplementary methods for detailed cell culture conditions. The Cisplatin powder was provided by Sigma and solubilized in 0.9% NaCl solution and stored at -20oC.

Lentiviral and retroviral production

P73-shRNA lentiviral particles were produced by transfection of required viral plasmids (4 μ g of each: RSV-RRE, RGR, VSV-G and 4 μ g of TAp73-shRNA; TAp73si; or 4 μ g of GFP-shRNA; GFPsi) following the manufacturer's protocol (CalPhos Transfection Kit; Clontech) in HEK 293 FT cell line. The 143B, and the RDES cells were infected with HEK 293T supernatants (with GFPsi as a control or TAp73si) and selected by antibiotic resistance (puromycin, 1 μ g/mL for the 143B cells or 0.5 μ g/mL for the RDES ones) for several weeks. P73-shRNA targeted sequence is available upon request.

Transient transfection of pre-mi $R^{\rm TM}$ and anti-mi $R^{\rm TM}$

All the pre-miRTM and anti-miRTM were obtained from Ambion and transfected at a final concentration of 30 nM using the siPORTNeoFX Transfection Agent (Ambion) according to the manufacturer's protocol.

Transient transfection of TAp73β

The TAp73 β sequence was inserted in pcDNA3 vector (Invitrogen). 2 μ g of DNA were transfected using FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega) according to the manufacturer's protocol. These assays were all performed as described [23].

Cell viability assay and GI₅₀ calculation

Bone Sarcoma cell lines were plated in 96-wells plates in the appropriate medium with 10% FBS and treated with Cisplatin at indicated concentration during 48 hours and cell growth was measured using the WST-1 assay (Roche, Mannheim, Germany). At the end of the treatment time, the culture medium is removed and replaced by the WST-1 reagent diluted in fresh medium in a 1:10 proportion. The absorbance at 470 nm was measured on a 96-multiwell microplate reader (Victor² 1420; PerkinElmer Inc.) and normalized to the average reading of wells containing medium only. The GI₅₀ were calculated thanks to the GraphPad Prism 6 software.

2D clonogenic assay

Bone Sarcoma cells were seeded at a density of 1000 cells per well in 6-wells plate and treated with 3 μ M of Cisplatin or the corresponding amount of NaCl 0.9% for 48 hours. Culture medium was then replaced by fresh one and the cells were cultured for additional 6 days. The colonies were then washed in PBS, fixed with glutaraldehyde 10% and stained with Crystal Violet (1% in water). Pictures were taken and five areas/well were arbitrary chosen to represent the entire surface of each well. The stained surfaces/total surfaces of each area/well were calculated thanks to the ImageJ software.

Apoptotic-cell death assessment

The caspase 3/7 activity was assessed thanks to the apo-ONE® Homogeneous caspase-3/7 Assay kit (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions.

Total RNA extraction and quantitative reverse transcription-PCR

Total RNA was extracted from cultured-cells using the QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) and the miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was reversed transcribed using the ThermoScript RT-PCR System (Life Technologies). Realtime monitoring of PCR amplification was performed on CFX96 real-time PCR detector system (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) with SYBR PCR Master Mix buffer (Bio-Rad). Target gene expression was normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and β -2 microglobulin (B2M) levels in respective samples as an internal standard, and the comparative cycle threshold (Ct) method was used to calculate the relative amplification of target messenger RNAs. The primers sequences are described in the Supp. Table 2.

Quantitative reverse transcription-PCR for miRNAs

A specific RT was performed for each miRNA from 100 ng of total RNA, using specific stemloop RT primers (50 nM) and the MultiScribe Reverse transcriptase (Applied Biosystems). The RT conditions were as follows: 30 minutes at 16°C followed by 30 seconds at 20°C, 30 seconds at 42°C, 1 second at 50°C for 60 cycles, and finally 5 minutes at 85°C. The expression of each gene was normalized to the one of the small nuclear U6B RNA as a reference. The miRNA's RT-qPCR-primers' sequences are detailed in Supp. Table 3 and 4.

Western blotting analysis

Samples containing equal amounts of protein (depending on the antibody, 15-80 mg) from lysates of cultured Bone Sarcoma cell lines underwent electrophoresis on SDS-PAGE and were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The membranes were blocked in 3% BSA-PBS-0.05% Tween at room temperature for 1 hour and blots were probed overnight at 4°C with the primary antibodies. The features of the latter are summarized in the Supp. Table 5. Membranes were then saturated 1 hour with 5% milk-PBS-0.05% Tween (Régilait) and finally incubated for 1 hour with secondary antibodies at room temperature (Supp. Table 5). Specific proteins were detected using SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (ThermoScientific, Rockford, USA) and a G-Box (Syngene, Cambridge, UK) after washing. Pictures were analysed thanks to the ImageJ software.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest

Editorial note

This paper has been accepted based in part on peerreview conducted by another journal and the authors' response and revisions as well as expedited peer-review in Oncotarget.

REFERENCES

- Geller DS and Gorlick R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. Clin Adv Hematol Oncol. 2010; 8:705-718.
- 2. Marina N, Gebhardt M, Teot L and Gorlick R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. Oncologist. 2004; 9:422-441.
- Wadayama B, Toguchida J, Shimizu T, Ishizaki K, Sasaki MS, Kotoura Y and Yamamuro T. Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. Cancer Res. 1994; 54:3042-3048.
- Sandberg AA and Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. Cancer Genet Cytogenet. 2003; 145:1-30.
- Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA and Juergens H. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. Oncologist. 2006; 11:503-519.
- 6. Ewing J. Classics in oncology. Diffuse endothelioma

of bone. James Ewing. Proceedings of the New York Pathological Society, 1921. CA Cancer J Clin. 1972; 22:95-98.

- Riggi N, Cironi L, Provero P, Suva ML, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, Hoffmann F, Trumpp A and Stamenkovic I. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Cancer Res. 2005; 65:11459-11468.
- Kim J and Pelletier J. Molecular genetics of chromosome translocations involving EWS and related family members. Physiol Genomics. 1999; 1:127-138.
- Komuro H, Hayashi Y, Kawamura M, Hayashi K, Kaneko Y, Kamoshita S, Hanada R, Yamamoto K, Hongo T, Yamada M and et al. Mutations of the p53 gene are involved in Ewing's sarcomas but not in neuroblastomas. Cancer Res. 1993; 53:5284-5288.
- 10. Liebner DA. The indications and efficacy of conventional chemotherapy in primary and recurrent sarcoma. J Surg Oncol. 2015; 111:622-631.
- Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2014; 25 Suppl 3:iii113-123.
- Ozaki T, Sugimoto H, Nakamura M, Hiraoka K, Yoda H, Sang M, Fujiwara K and Nagase H. Runt-related transcription factor 2 attenuates the transcriptional activity as well as DNA damage-mediated induction of pro-apoptotic TAp73 to regulate chemosensitivity. FEBS J. 2015; 282:114-128.
- Ibrahim N, He L, Leong CO, Xing D, Karlan BY, Swisher EM, Rueda BR, Orsulic S and Ellisen LW. BRCA1associated epigenetic regulation of p73 mediates an effector pathway for chemosensitivity in ovarian carcinoma. Cancer Res. 2010; 70:7155-7165.
- 14. Liu K, Zhuang X and Mai Z. p73 expression is associated with cellular chemosensitivity in human non-small cell lung cancer cell lines. Oncol Lett. 2013; 5:583-587.
- Tomkova K, Tomka M and Zajac V. Contribution of p53, p63, and p73 to the developmental diseases and cancer. Neoplasma. 2008; 55:177-181.
- 16. Inoue K and Fry EA. Alterations of p63 and p73 in human cancers. Subcell Biochem. 2014; 85:17-40.
- 17. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR and Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. Nature. 1999; 398:708-713.
- Fontemaggi G, Kela I, Amariglio N, Rechavi G, Krishnamurthy J, Strano S, Sacchi A, Givol D and Blandino G. Identification of direct p73 target genes combining DNA microarray and chromatin immunoprecipitation analyses. J Biol Chem. 2002; 277:43359-43368.
- Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, Chalas E and Moll UM. DeltaNp73, a dominantnegative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is upregulated in human tumors. J Exp Med. 2002; 196:765-780.
- 20. Han S, Semba S, Abe T, Makino N, Furukawa T, Fukushige

S, Takahashi H, Sakurada A, Sato M, Shiiba K, Matsuno S, Nimura Y, Nakagawara A and Horii A. Infrequent somatic mutations of the p73 gene in various human cancers. Eur J Surg Oncol. 1999; 25:194-198.

- 21. Moll UM and Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. Molecular cancer research : MCR. 2004; 2:371-386.
- Hu X, Wu N, Xia P, Yu S, Sun F and Chen J. Correlation between low-level expression of the tumor suppressor gene TAp73 and the chemoresistance of human glioma stem cells. Cancer Chemother Pharmacol. 2012; 69:1205-1212.
- 23. Ory B, Ramsey MR, Wilson C, Vadysirisack DD, Forster N, Rocco JW, Rothenberg SM and Ellisen LW. A microRNAdependent program controls p53-independent survival and chemosensitivity in human and murine squamous cell carcinoma. J Clin Invest. 2011; 121:809-820.
- 24. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004; 116:281-297.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN and Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet. 2008; 9:102-114.
- 26. Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993; 75:843-854.
- Garzon R, Marcucci G and Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. Nat Rev Drug Discov. 2010; 9:775-789.
- Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, Knight RA, Green DR, Thompson C and Vousden KH. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. J Biol Chem. 2004; 279:8076-8083.
- Kommagani R, Whitlatch A, Leonard MK and Kadakia MP. p73 is essential for vitamin D-mediated osteoblastic differentiation. Cell Death Differ. 2010; 17:398-407.
- 30. Liang W, Xia H, Li J and Chunhua Zhao R. 5-Aza-2'deoxycytidine increases the sensitivity of human bone marrow mesenchymal stem cells to chemotherapeutic

agents by demethylation of p73. J Pediatr Hematol Oncol. 2012; 34:108-115.

- Tophkhane C, Yang SH, Jiang Y, Ma Z, Subramaniam D, Anant S, Yogosawa S, Sakai T, Liu WG, Edgerton S, Thor A and Yang X. p53 inactivation upregulates p73 expression through E2F-1 mediated transcription. PLoS ONE. 2012; 7:e43564.
- Zhang ZJ, Zhang H, Kang Y, Sheng PY, Ma YC, Yang ZB, Zhang ZQ, Fu M, He AS and Liao WM. miRNA expression profile during osteogenic differentiation of human adiposederived stem cells. J Cell Biochem. 2012; 113:888-898.
- Hu H, Zhang Y, Cai XH, Huang JF and Cai L. Changes in microRNA expression in the MG-63 osteosarcoma cell line compared with osteoblasts. Oncol Lett. 2012; 4:1037-1042.
- Agostini M, Niklison-Chirou MV, Catani MV, Knight RA, Melino G and Rufini A. TAp73 promotes anti-senescenceanabolism not proliferation. Aging (Albany NY). 2014; 6:921-930.
- Furuya K, Ozaki T, Hanamoto T, Hosoda M, Hayashi S, Barker PA, Takano K, Matsumoto M and Nakagawara A. Stabilization of p73 by nuclear IkappaB kinase-alpha mediates cisplatin-induced apoptosis. J Biol Chem. 2007; 282:18365-18378.
- Leong CO, Vidnovic N, DeYoung MP, Sgroi D and Ellisen LW. The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers. J Clin Invest. 2007; 117:1370-1380.
- Liu M, Zhang X, Hu CF, Xu Q, Zhu HX and Xu NZ. MicroRNA-mRNA functional pairs for cisplatin resistance in ovarian cancer cells. Chin J Cancer. 2014; 33:285-294.
- Ovcharenko D, Kelnar K, Johnson C, Leng N and Brown D. Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. Cancer Res. 2007; 67:10782-10788.

II.3.3. Complément de discussion à l'Article 6 :

Les patients atteints de Sarcomes Osseux sont fréquemment traités par le **Cisplatine** et les mécanismes moléculaires relayant les effets anti-tumoraux de cet agent ne sont toujours pas complètement élucidés à l'heure actuelle. Par ailleurs, un nombre important de patients développant malheureusement toujours des **résistances thérapeutiques** vis-à-vis de ce composé, les objectifs principaux de ce travail sont doubles. Ils visent ainsi dans un premier temps, à mieux définir les mécanismes moléculaires par lesquels le Cisplatine induit la mort cellulaire des Sarcomes Osseux, puis, dans un second temps, à mieux appréhender comment ces cellules parviennent à s'y soustraire. Ainsi, l'implication de l'isoforme **TAp73ß** dans la médiation de l'apoptose induite par cet agent a été considérée plus en détail. Nous avons par ailleurs pu mettre en évidence que l'inhibition de ce suppresseur de tumeurs par le **miR-193a-5p** constituait un des mécanismes employé par les cellules de Sarcome Osseux pour s'affranchir des effets du Cisplatine.

Cette étude a ainsi pu mettre en évidence que l'isoforme **TAp73** β et le **miR-193a-5p** étaient exprimés de façon différentielle dans les lignées de Sarcome Osseux testées, l'expression du miR-193a-5p étant réduite dans les Sarcomes d'Ewing comparativement aux Ostéosarcomes (**Fig. 1a, 1b et 1h**). L'hétérogénéité clinique de ces types de tumeurs se reflète également à travers les **différences de sensibilité** de ces lignées au **Cisplatine**, mises en évidence par des tests de viabilité cellulaire (**Fig. 1c, 1d, 1e**). Avec des IC₅₀ supérieures à 20 μ M, les lignées d'Ostéosarcome MG63 et SaOS₂ sont les plus résistantes à cet agent et sont par ailleurs celles qui présentent les niveaux d'expression du miR-193a-5p les plus élevés (**Fig. 1b et 1e**). De manière intéressante, nos résultats ont pu montrer que la sensibilité de ces lignées était **corrélée** avec le niveau d'expression du miR-193a-5p, renforçant l'hypothèse de son implication potentielle dans la chimiorésistance de ces cellules au Cisplatine (**Fig. 1e**).

Nous avons pu observer qu'un traitement de 24h par le Cisplatine à la concentration de 3 μ M dans les lignées SJSA-1 et RDES induisait une sous-expression du miR-193a-5p, ainsi qu'une surexpression de TAp73 β et de deux de ses gènes-cibles, p21 et MDM2 (**Fig. 2 et Supp Fig. 2**). Une étude avait déjà fait état des capacités du **Cisplatine** à induire l'expression de TAp73, dans la lignée de **cancer du colon** HCT116²⁶⁹. Quelques données sont disponibles quant aux origines d'une telle induction : il a en effet été décrit que les dommages à l'ADN induisaient une stabilisation et un recrutement du facteur **E2F1** au niveau des sites promoteurs des gènes liés à l'apoptose, dont *TP73*²⁷⁰. Ce mécanisme apparaîtrait toutefois dépendant de l'**acétylation d'E2F1**, nécessaire à son recrutement au promoteur P1 de *TP73*. Par ailleurs, nos résultats sont corroborés par une étude menée dans les lignées d'**adénocarcinome colique** SW480 et d'**Ostéosarcome** U2OS, celle-ci rapportant que l'expression de TAp73 β était induite par le **Cisplatine**, mais aussi par divers agents de chimiothérapie, tels que la **Camptothécine**, l'**Etoposide**, la **Doxorubicine** et le **Taxol**²⁷¹. Il a

par ailleurs été décrit que le **Tazarotène**, un rétinoïde synthétique, induisait également l'expression de TAp73 dans des **kératinocytes immortalisés**²⁷².

D'autre part, il est important de noter que l'augmentation de l'expression des gènescibles de TAp73ß (p21 et MDM2) que nous avons également pu observer (Fig. 2c, 2d et Supp Fig. 2c, 2d), atteste de la présence dans ces lignées d'une isoforme de p73 fonctionnelle. En effet, indépendamment de la régulation de l'expression de TAp73β par les miARNs, son expression et son activité sont modulées par de nombreux facteurs tels que les autres membres de la famille de TP53, dont p53 lui-même par exemple. Il est important de souligner que ceci n'a pas été pris en compte dans notre étude mais pourrait directement impacter les fonctions pro-apoptotiques de TAp73ß en réponse au Cisplatine. ll a notamment été démontré que six isoformes de p53 pouvaient s'associer physiquement à TAp73 β et moduler ses fonctions transactivatrices²⁷³. Les formes Δ 133p53 α , Δ 133p53 β et $\Delta 40p53\alpha$ interviendraient ainsi dans sa stabilisation, la forme p53 β augmenterait ses fonctions pro-apoptotiques, alors que les formes $\Delta 133p53\alpha$ et β les réduiraient. De plus, il semblerait que la phosphorylation de la tyrosine 99 de TAp73 par la kinase c-Abl (Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog) soit nécessaire aux fonctions pro-apoptotiques de ce facteur de transcription²⁷⁴. Ces données ont tout récemment été complétées par une étude menée dans l'Ostéosarcome, précisant qu'en phosphorylant la serine 48 du domaine TA de TAp73, la Polo-like kinase 2 (PLK2) abolissait les fonctions de cette isoforme, suite à sa surexpression induite par le Cisplatine²⁷⁵. Il a également été montré qu'en liant le DBD de TAp73β, ATF3 (Activating Transcription Factor 3) préviendrait son ubiquitinylation, jouant alors un rôle stabilisateur de cette isoforme²⁷⁶. Par ailleurs, TAp73β possède deux sites de clivage reconnus par les calpaïnes, des protéases à cystéines, permettant également de réguler sa demi-vie et donc son activité²⁷⁷. Il est d'ailleurs intéressant de noter que ces protéases sont impliquées dans la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome et que l'expression de la calpaïne-6 est augmentée dans la lignée d'Ostéosarcome U2OS résistante à la Doxorubicine^{278,279}. Ces données suggèrent qu'au-delà du statut mutationnel de p53, une analyse plus approfondie de la nature de ses isoformes ainsi que la quantification de c-Abl, PLK2, ATF3 et des calpaïnes dans les Sarcomes Osseux pourrait permettre de mieux définir l'activité fonctionnelle de TAp73ß dans ce modèle et ainsi, son implication dans la réponse au Cisplatine.

Une stratégie d'inhibition de l'expression de **TAp73** par **siARNs** nous a permis de mettre en évidence que ce facteur de transcription était un médiateur de la mort cellulaire par apoptose induite par le Cisplatine dans les Sarcomes Osseux (**Fig. 3b et Supp Fig. 3b**). Les mécanismes par lesquels TAp73β régule l'apoptose ne sont pas encore complètement élucidés, mais il a été montré dans un modèle de **carcinome hépatocellulaire**, que cette isoforme transactivait les gènes codant pour les **récepteurs de mort cellulaire** *CD95*, *TNF-RI*, *TRAIL-R1* et *TRAIL-R2* ainsi que celui codant pour la protéine adaptatrice de pro-caspase-8, **FADD** (**Fas-associated Death Domain**)²⁸⁰. De plus, la surexpression de TAp73β induit

l'expression de gènes **pro-apoptotiques** de la famille de **Bcl-2** dont *Bad*, *Bik*, *BNIP3* (*Bcl2/AdenovirusE1B 19kDa Interacting Protein 3*), *HRK* (*Harakiri*) et *Rad9*, contribuant à l'activation de la **voie mitochondriale** de l'apoptose ainsi que celle des **caspases** -1 à -4 et -6, -8 et -9. Nos résultats de dosage d'activité caspase permettent par ailleurs de compléter ces données, puisque dans notre modèle, l'inhibition de l'expression de TAp73 par siARNs a également contribué à augmenter l'activité de la **caspase 7** (**Fig. 3b et Supp Fig. 3b**). Par ailleurs, il a aussi été rapporté que l'apoptose induite par TAp73 dans des **cellules neuronales**, dépende de l'augmentation du niveau d'expression des gènes pro-apoptotiques *Bcl-X_s*, *Bcl-X_L*, *MDM2*, *APAF1* et *Bax*²⁷⁴. L'expression de ce dernier est également induite par TAp73β dans un modèle de **kératinocytes**²⁷². Corroborant nos résultats, le duplexe TAp73β/ATF3 est également retrouvé sur les régions promotrices de *Bax* et de *p21*, permettant l'activation de leur transcription dans un modèle de cancer cervical (**Fig. 2b**, **2c**)²⁷⁶.

Nos résultats ont également démontré qu'en plus de réduire l'activité apoptotique, l'inhibition de TAp73 dans les lignées 143B-TAp73si et RDES-TAp73si **améliorait** les **capacités clonogéniques** et la **chimiorésistance** de ces cellules au Cisplatine (**Fig. 3c, 3d et Supp Fig. 3c et 3d**). Toutefois, contrairement à ce que nous avons observé, Irwin et al., n'ont pas pu noter de différence de **clonogénicité** dans des cellules de **carcinome colique** sous-exprimant ou non TAp73, en absence de traitement de chimiothérapie²⁷¹. Par ailleurs, la stratégie inverse, visant à augmenter l'expression de TAp73 β dans la lignée MG63 (**Fig. 5a**), nous a permis de confirmer les propriétés de suppresseur de tumeurs de ce gène dans l'Ostéosarcome. De surcroît, l'effet de la surexpression des isoformes **TAp73\alpha** et **TAp73\beta** a déjà fait l'objet d'une étude dans le contexte de l'Ostéosarcome, celle-ci engendrant des signatures d'expression géniques particulières dans la lignée SaOS2²⁸¹. D'un point de vue mécanistique, ce modèle a ainsi permis de mettre en évidence que les séquences consensus de **TAp73\alpha** étaient associées à celles d'**AP-1** et permettaient le recrutement de **c-Jun**. L'absence de telles séquences à proximité de celles de **TAp73\beta** expliquerait alors la singularité du profil d'expression génique de ces deux isoformes de TAp73.

Comme le laissait supposer la surexpression du miR-193a-5p observée dans certaines des lignées de Sarcomes Osseux étudiées (**Fig. 1b et 1h**), la suite de notre étude a pu attester des fonctions oncogéniques de ce miARN dans notre modèle, en partie dépendantes de son ciblage direct de TAp73 β (**Fig. 5d et 5e**)²⁰³. L'équipe de Wang et al., a également pu observer une surexpression de ce miARN dans le **lymphome folliculaire**, même si aucun lien entre la surexpression et le rôle biologique de ce miARN n'ont pu être ici établis²⁸². A l'inverse, il a été rapporté que l'expression de ce miARN restait stable dans les **cancers rectaux**, en comparaison avec celle du stroma péri-tumoral, ce gène étant même utilisé comme référence de normalisation des RT-qPCR de miARNs réalisées dans ces modèles²⁸³.

La présente publication ne se positionne pas comme une étude pionnière quant aux implications du miR-193a-5p dans le cadre de l'**Ostéosarcome** : son rôle a en effet déjà été

considéré dans le contexte de la réponse de ce cancer aux traitements de chimiothérapie et plus particulièrement, de celle à l'Ifosfamide. A cet égard, Gougelet et al., on ainsi mis en évidence qu'il faisait partie d'un panel de miARNs dont la surexpression au sein de ces tumeurs permettait de discriminer les patients bons répondeurs à l'Ifosfamide²⁸⁴. Ces résultats vont ainsi à l'encontre de ceux que nous présentons dans notre travail, puisqu'à l'inverse, nous avons ici démontré que ce miARN était un facteur de la chimiorésistance au Cisplatine (Fig. 4h et Supp. Fig. 4h). Ceci est d'ailleurs illustré par le fait que sa surexpression ectopique dans les lignées RDES et SJSA-1 réduise l'activité apoptotique dépendante des caspases 3/7 et du clivage des PARPs (Fig. 4f et 4g et Supp. Fig. 4f et 4g). Mises en parallèle, les données de Gougelet et al., et les nôtres illustrent parfaitement la dualité des effets d'un même miARN quant à ses fonctions d'oncogène ou de suppresseur de tumeurs, alors dépendantes du contexte environnemental. De plus, elles témoignent encore une fois, que la grande diversité de leurs cibles soit un des facteurs clés dans la complexité de leurs mécanismes d'action. Dans des considérations d'ordre fonctionnel, ces résultats suggèrent aussi que TAp73β ne soit pas un médiateur de l'apoptose induite par l'Ifosfamide, aucune étude n'ayant d'ailleurs été rapportée à ce sujet. Par ailleurs, le rôle de suppresseur de tumeurs de ce miARN dans ce contexte, pourrait être expliqué par le fait que certaines de ses cibles potentielles appartiennent aux voies du TGF-B, des Wnts et des MAPKs, très souvent dérégulées dans les Sarcomes Osseux²⁸⁴. De la même façon et toujours dans une problématique de compréhension des mécanismes de résistance aux traitements antitumoraux, des travaux récents ont démontré que parmi les patients atteints de carcinome de l'œsophage, ceux qui présentaient des niveaux élevés de miR-193a-5p étaient meilleurs répondeurs à la radiothérapie²⁸⁵. Les auteurs attribuent ce lien au fait que le récepteur oncogénique ERBB2/Her2 soit une des cibles directes de ce miARN, lui conférant alors des propriétés de suppresseur de tumeurs et justifiant son emploi en tant que marqueur pronostic dans ce contexte. Ce rôle est encore soutenu par Yang et al., qui ont démontré que le facteur de transcription oncogénique Yin Yang1 (YY1) était aussi une de ses cibles directes dans le carcinome de l'endomètre²⁸⁶. Il a enfin été rapporté que l'expression ectopique du miR-193a-5p dans des cellules de cancer du sein inhibait le pouvoir clonogénique de ces cellules, ceci résultant de son ciblage direct des transcrits du gène NLN (neurolysine), justement impliqué dans la croissance cellulaire de ce type de cancer²⁸⁷.

Il est par ailleurs intéressant de souligner qu'indépendamment de son rôle dans la chimiorésistance de l'Ostéosarcome au Cisplatine, le **miR-193a-5p** s'opposerait à la dissémination métastatique de ce cancer par l'intermédiaire de son ciblage de la **sérine racémase (SRR)**, une enzyme impliquée dans le métabolisme protéique²⁸⁸. Cette étude a été menée dans la lignée MG63, cette lignée faisant justement partie de celles présentant les niveaux les plus élevés de miR-193a-5p (**Fig. 1b**). Il serait ainsi intéressant d'évaluer si une corrélation existe entre le niveau de ce miARN et le potentiel migratoire des Sarcomes Osseux. Quoi qu'il en soit, ces données illustrent encore une fois, que la multitude de cibles d'un même miARN lui permette de gouverner des mécanismes physiologiques différents.

Enfin, ce travail a pu démontrer que l'inhibition de l'expression du miR-193a-5p à l'aide d'inhibiteurs synthétiques (anti-miARNs) permettait de réduire les capacités clonogéniques des cellules de la lignée MG63, de même qu'elle augmentait leur activité apoptotique (Fig. 6f et 6g). L'association d'un tel anti-miARN avec un traitement par le Cisplatine permettant de re-sensibiliser ces cellules à cet agent (Fig. 6h), ces résultats apportent ainsi la preuve de concept que l'efficacité d'un traitement par le Cisplatine puisse être optimisée par l'inhibition de ce miARN. Une démarche similaire visant à exploiter les fonctions du miR-193a-5p dans un contexte de résistances thérapeutiques a par ailleurs déjà été employée dans des cellules de carcinome de l'œsophage²⁸⁵. Ce miARN présentant toutefois des propriétés de suppresseur de tumeurs dans ce modèle, une stratégie opposée à la nôtre a ici été suivie. Il a ainsi pu être montré que la surexpression artificielle de ce miARN améliorait la radiosensibilité de ces cellules in vitro et in vivo. On peut toutefois souligner qu'au cours de cette étude, la surexpression de ce miARN a été réalisée de façon stable dans les cellules de carcinome permettant de générer le modèle vivo. Cette stratégie ne permet donc pas de juger du pouvoir « sensibilisateur » de l'injection même de cette molécule in vivo, tout comme nous suggérons de le faire en perspective de notre travail. Quoi qu'il en soit, ces résultats mettent également en lumière que le miR-193a-5p puisse servir de biomarqueur prédictif de la réponse au Cisplatine chez des patients atteints de Sarcomes Osseux.

PARTIE III : PERSPECTIVES : IMPLICATION DES microARNs DANS LA RESISTANCE DE L'OSTEOSARCOME AUX INHIBITEURS DE PROTEINES A BET BROMODOMAINES :

III. Perspectives : Implication des microARNs dans la résistance de l'Ostéosarcome aux inhibiteurs de Protéines à BET Bromodomaines :

III.1. Introduction :

En dépit des innovations biomédicales de ces dernières années qui ont déjà grandement permis d'améliorer la prise en charge thérapeutique de l'Ostéosarcome, le développement de **résistances thérapeutiques** et **l'apparition de métastases pulmonaires** associées, réduisent encore trop les taux de survie de cette pathologie.

Les résultats des deux Articles présentés dans la <u>PARTIE I</u> de cette thèse ayant démontré les **propriétés anti-tumorales de l'inhibiteur de Protéines à BET Bromodomaines** JQ1 dans des modèles précliniques de Sarcomes Osseux, son emploi chez l'Homme pourrait ainsi être rapidement envisagé dans le futur (<u>cf. Article 1 et 2</u>). Cependant, compte tenu de la grande **plasticité** des cellules tumorales d'Ostéosarcome vis-à-vis de leur environnement et en particulier, de leurs facultés d'**adaptation au stress** induit par les traitements de chimiothérapie, il est malheureusement envisageable qu'elles puissent également mettre en place des mécanismes de **résistance à JQ1**.

De multiples mécanismes permettent aux cellules tumorales de se soustraire aux effets délétères des agents de chimiothérapie auxquelles elles sont soumises. Comme présenté dans la **PARTIE II** de cette thèse (*cf.* Articles 3 et 6), la dérégulation des miARNs fait partie intégrante de ces mécanismes et pourrait ainsi tout à fait être à l'origine de la chimiorésistance de l'Ostéosarcome à JQ1. En permettant l'identification de nouveaux miARNs, ce travail s'attachera donc à mieux appréhender dans quelle mesure ces petits régulateurs épigénétiques peuvent être impliqués dans la résistance de l'Ostéosarcome à JQ1. Par l'établissement de modèles cellulaires et animaux d'Ostéosarcomes résistants à cet agent, cette étude pionnière envisage ainsi d'anticiper de futurs mécanismes de résistance cliniques, se posant ainsi comme **perspective d'étude** quant aux effets prometteurs de JQ1 précédemment démontrés dans le contexte des Sarcomes Osseux (cf. Articles 1 et 2). A terme, elle pourrait permettre de considérer l'utilisation des miARNs identifiés comme marqueurs prédictifs de la réponse à JQ1 ou comme molécules potentialisatrices de l'effet de cette drogue. La dernière partie de ce travail s'inscrit donc dans une approche perspective quant aux travaux présentés dans cette thèse, unifiant les **PARTIES I et II** en établissant des liens entre les protéines à BET Bromodomaines, les miARNs et la chimiorésistance.

III.2. Matériel et Méthodes :

Culture cellulaire et traitement par JQ1 :

La lignée d'Ostéosarcome polyclonale humaine MNNG-HOS 1547 a été établie à partir de cellules tumorales prélevées chez une jeune patiente caucasienne de 13 ans, transformées avec 0,01 µg/mL de MNNG, une nitrosamine carcinogène. Cette lignée, fournie par l'American Tissue Cell Collection (ATCC) sert de lignée de référence dans l'étude ci-après et sera dénommée lignée « sensible » ou « naïve ». L'établissement du modèle *vitro* de résistance à JQ1 a été réalisé par traitement continu de cette lignée sensible à des concentrations de JQ1 progressivement augmentées au fil des mois, jusqu'à atteindre 20 µM finaux dans le milieu de culture. La lignée ainsi générée sera dénommée **MNNG-HOS JQ1R20** tout au long de la présente étude. Par ailleurs, des échantillons tumoraux issus de l'étude *vivo* ont été fraîchement prélevés au moment de l'euthanasie des souris, broyés et mis en culture dans les mêmes conditions que leur lignée parentale MNNG-HOS JQ1R20. Les conditions de culture de ces lignées ainsi que les modalités d'approvisionnement, de préparation et de stockage de JQ1 sont détaillées dans l'étude de Lamoureux et al.²⁸⁹. I-BET (Sigma) est dissous dans du diméthyle sulphoxide (DMSO, Sigma Aldrich) à la concentration de 50 mM, aliquoté et stocké à -20°C.

Extraction/dosage des ARN totaux, RT-qPCR :

Le détail de l'ensemble de ces protocoles figure dans la partie « Matériel et Méthodes » de l'étude précédente²⁹⁰. Les séquences des amorces sens et anti-sens utilisées sont les suivantes : ABCC1 : sens 5'-GGTCAGCCCAACTCTCTTGG-3' et anti-sens 5'-CACTAGGGCTACCAGCCAGA-3'; ABCC2 : sens 5'-TGCACAAGCAACTGCTGAAC-3' et anti-sens 5'-AGGCAGGGTGTCATCCACT-3'; ABCG2: sens 5'-GGTGCCATTTACTTTGGGC-3' et anti-sens 5'-ACAAAGAGTTCCACGGCTGA-3'; ALP : sens 5'-AACACCACCCAGGGGAAC-3' et anti-sens 5'-TTAGACACCCGTAACACTGG-3'; MDR1: sens 5'-TCTTGAAGGGGACCGCAATG-3' et anti-sens 5'-AGCGAAACATTGAAAATACACTGAC-3'; OC: sens 5'-GGCGTACCTGRARCAATGG-3' et antisens 5'-CTGACACTGCTCAACCGACT-3'; OPG : sens 5'-CAGCTCACAAGAACAGACTTTCC-3' et 5'-CTGTACGATTGGAGTGGAAGCT-3'; 5'anti-sens RANK : sens CAGATGCCCACAGAAGATGAATAC-3' et anti-sens 5'-CCAGGCTCAGTGAGGAACAG-3'. Les séquences déjà employées dans les études précédentes figurent dans les parties « Matériel et Méthodes » correspondantes²⁸⁹.

<u>Analyse du profil d'expression des miARNs par plaques TLDA (TaqMan[®] Low Density Arrays) :</u>

Le profil d'expression de 756 miARNs a été analysé par la Société Prestizia SAS (Theradiag Group, Clapiers, 34830), par plaques TLDA (TaqMan[®] Low Density Arrays, plaque A v2.1 et plaque B v3 « TaqMan[®] Array Human URNA A+B » et « TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix »), sur les ARNs totaux des lignées MNNG-HOS naïves et JQR20. Ces derniers ont été réverse-transcrits par ce prestataire à partir du kit « TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription kit » et des amorces Mégaplex « Megaplex RT primer human », pool A v2.1 et pool B v3.0. L'expression de l'ensemble de ces miARNs est normalisée sur celle du snARN U6, de RNU44 et RNU48.

RT-qPCR de miARNs par RT-qPCR Taqmann®:

Après extraction et dosage des ARNs totaux, le kit TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription kit (ThermoFisher Scientific) a été utilisé pour la transcription inverse du miARN-26b-5p, ainsi que les ARNs RNU6B et RNU44, servant ici de gènes de référence. Ce kit est employé selon les recommandations du fournisseur à partir de 10 ng d'ARN. Brièvement, pour une réaction, l'ARN est mis en présence de dNTPs à 100 mM, d'inhibiteurs de RNAses à 20 U/ μ L, de MultiScribe Reverse Transcriptase à 50 U/ μ L et de 3 μ L d'amorces de transcription inverse, dans le tampon correspondant (10X Reverse Transcription Buffer). Le mélange est d'abord incubé 5 minutes à 4°C, puis 30 minutes à 16°C, 30 minutes à 42°C et 5 minutes à 85°C pour permettre l'inactivation de l'enzyme. Le protocole de qPCR qui s'ensuit est réalisé grâce au kit TaqMan[®] miRNA Assays, suivant les recommandations du fournisseur. Ainsi, pour une réaction, 1 µL de TaqMan[®] Small RNA Assay (20X), spécifique du miARN à amplifier, est mis en présence de 10 µL de TaqMan[®] Universal PCR Master Mix II (2X, no UNG) et de 1,33 µL des ADNs complémentaires produits au cours de l'étape précédente de réverse transcription. Le signal fluorescent émis est mesuré par un thermocycleur couplé à un système de lecture optique (CFX96, Thermal Cycler, BioRad, USA) après une incubation de 10 minutes à 95°C, suivie de 40 cycles de deux étapes successives de 15 secondes à 95°C, suivis de 60 secondes à 60°C.

Extraction et dosage de protéines, Western Blotting :

Le détail de l'ensemble de ces protocoles figure dans la partie « Matériel et Méthodes » de l'étude précédente²⁹⁰. Les anticorps **anti-BRD2** et **anti-BRD4** utilisés sont produits chez le lapin et sont dilués au 1/2000^{ème} dans du PBS-Tween 0,05% (Bethyl; références : A302-583A 2 et A301-985A50 3, respectivement). L'anticorps de lapin **anti-GAPDH** est fournit par Cell Signaling (clone 14c10; référence 21 185) et est dilué de la même manière.

<u>Tests fonctionnels de clonogénicité, de viabilité et de migration en Chambres de Boyden</u> <u>après coloration au Crystal Violet :</u>

Le détail de l'ensemble de ces protocoles figure dans la partie « Matériel et Méthodes » de l'étude précédente²⁹⁰.

Vecteurs, anti-miARNs de synthèse et agent de transfection :

Les plasmides **BRD2-GFP** (pJTI-R4-DEST-CMV-N-EmGFP) et **BRD4-GFP** (pcDNA6.2/N-EmGFP-DEST) sont fournis par Addgene (références 65376 et 65378), le **pcDNA3** vide servant de vecteur contrôle. Les **anti-miARNs** Contrôle (Ct) et 26b-5p utilisés, correspondent aux « miRVanaTM miRNA inhibitors » fournis par Ambion (par Life Technologies). Ils sont transfectés à la concentration finale de 75 nM par puits, à l'aide du FuGENE[®] HD Transfection Reagent (Promega) selon les recommandations du fournisseur.

<u>Analyse du cycle cellulaire après marquage à l'iodure de propidium et analyses d'induction</u> <u>de la mort cellulaire par apoptose par dosage d'activité des caspases 3/7 :</u>

Le détail de l'ensemble de ces protocoles figure dans la partie « Matériel et Méthodes » de l'étude précédente²⁹⁰.

Etude de la différenciation ostéoblastique :

Mille cellules par puits ont été ensemencées dans des plaques 48 puits et cultivées dans du milieu DMEM, enrichi à 3% en sérum de veau fœtal (SVF), en présence de dihydrogène perphosphate de sodium (NaH₂PO₅) 1M et de dihydrogénophosphate de sodium (Na₂H₂PO₄) 1M, à 2,4 mM finaux dans les proportions de 2 :1. Les milieux de culture sont remplacés quatre jours et huit jours après ensemencement des cellules. Douze jours après ensemencement, ces dernières sont enfin fixées au paraformaldéhyde (PFA) 5% pendant 20 minutes, rincées à l'eau distillée, puis colorées pendant 10 minutes à température ambiante au Rouge Alizarine (40 mM, pH 7,4 ; Sigma), permettant de mettre en évidence la matrice minéralisée produite par les cellules ayant subi la différenciation ostéoblastique.

Génération du modèle vivo d'Ostéosarcome résistant à JQ1 :

Les modalités de commande, d'hébergement et la prise en charge quotidienne des souris, ainsi que les étapes de préparation, de stockage et d'injection de JQ1 respectent les mêmes conditions que celles détaillées dans la partie « Matériel et Méthodes » de l'étude précédente²⁹⁰. Le modèle d'Ostéosarcome résistant à JQ1 a été généré par injection paratibiale de 1,5.10⁶ cellules de la lignée JQ1R20. Les animaux ont ensuite reçu des injections intra-péritonéales de JQ1 à la concentration de 50 mg/kg, trois fois par semaine,

dès lors que les tumeurs étaient palpables (environ 100 mm³). Le maintien du modèle a ensuite été assuré par transplantations successives de fragments tumoraux, quand les volumes des tumeurs atteignaient environ 1500 mm³. Brièvement, des fragments de 1 mm³ environ ont été prélevés à l'aide d'un scalpel sur les tumeurs des souris donneuses au moment de leur euthanasie. Les souris receveuses anesthésiées ont ensuite été transplantées en position paratibiale avec ces fragments, après incision cutanée et musculaire, puis lésion mécanique du périoste par grattage. Une analgésie postopératoire ainsi qu'un contrôle visuel des animaux ont été réalisés après l'intervention, afin de s'assurer de leur bien-être.

III.3. Résultats :

III.3.1. Etablissement et caractérisation morphologique et fonctionnelle de la lignée MNNG-HOS JQ1R20, résistante à l'inhibiteur de BET Bromodomaines JQ1 :

Le point de départ de cette étude a été l'établissement de la lignée d'Ostéosarcome **MNNG-HOS JQ1R20** résistante à JQ1, à partir de la lignée **MNNG-HOS naïve**, par mise en culture de ces cellules en présence de JQ1 à des concentrations progressivement augmentées au fil des mois, jusqu'à atteindre 20 µM. La lignée JQ1R20 est ainsi capable de résister à des doses bien supérieures à celles supportées par la lignée sensible dont elle est issue. Sur le plan morphologique, on peut noter une différence phénotypique entre les deux lignées, les cellules de celle d'origine présentant un **aspect plus bombé et plus luisant** en microscopie optique, les cellules de la lignée JQ1R20 semblant plus « **filamenteuses** » et **étalées (Fig. 1A**).

L'acquisition de la résistance de ces cellules a été caractérisée d'un point de vue fonctionnel par l'étude de leur réponse à JQ1 en termes de viabilité, d'induction d'apoptose et de capacités clonogéniques. Des tests de viabilité au Crystal Violet révèlent en effet que cette lignée est moins sensible à JQ1 que la lignée HOS dont elle est issue, son IC₅₀ étant de 73,27 μ M, celui des MNNG-HOS naïves étant de 1,49 μ M (**Fig. 1B panel de gauche**). L'effet de l'énantiomère inactif JQ1(-) sur la viabilité de ces cellules a également été testé et conformément aux résultats attendus, il n'impacte pas la viabilité cellulaire (**Fig. 1B panel de droite**). Concernant l'induction de mort cellulaire par apoptose, nos résultats prouvent qu'un traitement de 48h de JQ1 à 1 μ M n'induit pas d'activité des caspases 3/7 dans la lignée résistante, contrairement à la lignée HOS d'origine, dans laquelle ce protocole de traitement l'augmente d'environ trois fois par rapport au contrôle non traité (**Fig. 1C**). On peut également noter un effet de l'énantiomère inactif JQ1(-) pour cette concentration et ce temps de traitement, probablement non spécifique, puisque cette dose n'impactait pas la viabilité cellulaire (**Fig. 1B panel de gauche**).

De la même manière, les capacités clonogéniques de cette lignée ne sont pas affectées par JQ1(+), alors que la lignée sensible forme presque quatre fois moins de clones que le contrôle non traité, dans ces conditions de traitement (**Fig. 1D**). La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a également été évaluée après traitement par JQ1 et marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. Nos analyses de cytométrie en flux ont ainsi révélées qu'un traitement de 2 µM de JQ1 pendant 48h induisait un blocage du cycle en phase G1, uniquement observable dans la lignée sensible (**Fig. 1E**). Le potentiel migratoire de cette lignée a également été évalué par des tests de migration en Chambres de Boyden, la migration étant alors orientée par un gradient de SVF. On peut ainsi dénoter que les cellules MNNG-HOS JQ1R20 ont une plus faible propension à la migration
que la lignée d'origine, leurs capacités migratoires étant réduites de 60% environ comparativement aux cellules naïves (Fig. 1F).

Les cellules d'Ostéosarcome dérivant des ostéoblastes, les capacités de différenciation ostéoblastique ainsi que le profil d'expression de gènes caractéristiques de la lignée ostéoblastique ont été évalués et comparés entre les cellules naïves et résistantes. Les résultats de nos tests de minéralisation induite par le NaH₂PO₅ et le Na₂H₂PO₄ ont montré que la lignée MNNG-HOS JQ1R20 présentait une meilleure capacité à former de la matrice minérale que les cellules naïves (**Fig. 1G**). Ceci étant le reflet d'une meilleure propension de ces cellules à s'engager dans la voie de différenciation ostéoblastique, l'expression de RANK, de l'ostéocalcine (OCN), de la phosphatase alcaline (ALP) et de l'ostéoprotégérine (OPG), des gènes impliqués dans la mise en place de ce processus, a été analysée par RT-qPCR. On peut ainsi noter que les cellules JQ1R20 surexpriment RANK, l'ostéocalcine et l'ALP de plus de 5 fois ; 4,5 fois et 3 fois respectivement, comparé aux cellules naïves (**Fig. 1H**). Aucune différence d'expression de l'OPG n'est toutefois observée.

Afin de mieux définir la nature de la résistance des cellules JQ1R20, nous avons cherché à savoir si cette dernière était liée à l'acquisition du phénotype de « Multidrug Resistance » (MDR), caractérisé par une surexpression de gènes codant pour des pompes à efflux, refoulant les agents de chimiothérapie à l'extérieur de la cellule. L'expression de certaines de ces pompes, à savoir, ABCC1 (ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1), ABCC2 (ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2), ABCG2 (ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2) et MDR-1 (Multi Drug Resistance 1) a donc été évaluée dans nos deux lignées. On note ainsi une diminution de l'expression d'un facteur 2 d'ABCC1 dans les cellules résistantes comparé aux cellules sensibles, alors qu'à l'inverse, ABCC2, ABCG2 et MDR-1 voient leur expression augmentée (**Fig.1I**).

Afin de valider fonctionnellement que l'augmentation de l'expression de ces pompes soit une des origines de l'acquisition de la résistance, la viabilité cellulaire de la lignée JQ1R20 a été évaluée après traitement de 72 heures par le Cisplatine, la Doxorubicine et le Mafosfamide (ou Ifosfamide), trois agents couramment employés dans le traitement de l'Ostéosarcome, ainsi qu'après traitement avec I-BET, un autre inhibiteur de BET Bromodomaines. Nos résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence de sensibilité au Cisplatine, à la Doxorubicine ni au Mafosfamide entre les cellules naïves et résistantes (**Fig. 1J**). En revanche, la viabilité de lignée JQ1R20 n'est pas affectée par un traitement par le I-BET, même employé à des doses de 100 μ M, alors que l'IC₅₀ de la lignée MNNG-HOS naïve à l'égard de ce composé est de 10 μ M. Ces résultats démontrent ainsi que l'augmentation de l'expression des pompes à efflux dans la lignée résistante n'est pas un facteur suffisant pour permettre la mise en place d'un phénotype MDR fonctionnel. En revanche, l'absence évidente de sensibilité de la lignée JQ1R20 à l'égard de I-BET suggère plutôt que la cause de la résistance soit spécifique à la classe pharmacologique des inhibiteurs de BET Bromodomaines. Ceci laisse supposer que l'origine de ce(s) mécanisme(s) puisse impliquer soit, la dérégulation des BET Bromodomaines eux–mêmes ou celle de leurs gènes-cibles ; ou bien, celle d'effecteurs moléculaires régulant des voies métaboliques redondantes à celles contrôlées par les BET Bromodomaines.

L'ensemble de ces résultats atteste que la lignée MNNG-HOS JQ1R20 présente des caractéristiques de résistance spécifiques aux inhibiteurs de protéines à BET Bromodomaines tels que JQ1, potentiellement liées à son profil ostéoblastique plus marqué que les cellules tumorales de la lignée HOS dont elle dérive.

Figure 1 :



Figure 1 | Caractérisation de la lignée d'Ostéosarcome humaine MNNG-HOS JQ1R20 résistante à JQ1.

(A) Caractérisation phénotypique de la lignée MNNG-HOS JQ1R20. Images de microscopie optique des lignées MNNG-HOS naïves (haut) et résistantes JQ1R20 (bas). Grossissement x100. (B) Test de viabilité après coloration au Crystal Violet. Les cellules MNNG-HOS naïves et résistantes ont été traitées pendant 72h avec les doses indiquées de JQ1(+) (panel de gauche) ou JQ1(-) (panel de droite). Les barres d'erreurs représentent les écart-types de triplicats. Les IC₅₀ de ces lignées ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 et sont illustrées dans le tableau, les intervalles de confiance à 95% étant également indiquées. (C) Les lignées MNNG-HOS naïves et résistantes ont été traitées pendant 48h avec 1 µM de JQ1(+), JQ1(-) ou le volume correspondant de DMSO. L'induction de mort par apoptose a été évaluée par dosage de l'activité des caspases 3/7 et rapporté à 1 µg de protéine. Les barres d'erreurs représentent les écart-types de triplicats. Des tests statistiques T de Student non appariés ont été réalisés pour comparer la significativité des différentes conditions entre elles. (D) Test de clonogénicité après traitement des cellules selon les modalités décrites en (C). A droite, des images représentatives des puits sont représentées. (E) Analyse de la répartition des cellules MNNG-HOS naïves et JQ1R20 dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les cellules ont été traitées avec 2 μ M de JQ1(+), JQ1(-) ou le volume équivalent de DMSO pendant 48h, fixées, puis marquées à l'iodure de propidium. (F) Les capacités migratoires des cellules sensibles et résistantes ont été comparées par test de migration en Chambres de Boyden. Les cellules sont ensemencées dans la partie supérieure de la Chambre, dans du milieu de culture enrichi à 5% de SVF, la partie inférieure étant quant à elle, concentrée à 10% de SVF afin de stimuler la migration. Vingt-quatre heures après ensemencement, les cellules ayant migré sur la partie inférieure de la Chambre sont fixées puis colorées au Crystal Violet. Les histogrammes représentent la moyenne des ratios de la surface colorée sur la surface totale des Chambres, calculés à partir du logiciel ImageJ. Les barres d'erreur illustrent les écart-types de 5 zones arbitrairement choisies, représentatives de la surface des Chambres, cette expérimentation ayant été réalisée en duplicat. Des images représentatives des puits sont représentées. (G) La différenciation ostéoblastique a été induite dans les lignées MNNG-HOS naïves et JQ1R20 par culture en milieu DMEM à 3% de SVF et supplémenté ou non (Ct) en $NaH_2PO_5/Na_2H_2PO_4$ dans des proportions de 1:2, à une concentration finale de 2,4 mM. Douze jours après ensemencement, les cellules sont fixées puis colorées au Rouge Alizarine. L'expérience a été réalisée en duplicat et des images représentatives des puits sont représentées. (H) L'expression de gènes caractéristiques du profil ostéoblastique (RANK, l'ostéocalcine (OCN), la phosphatase alkaline (ALP) et l'ostéoprotégérine (OPG)) a été évaluée par RT-qPCR et comparée entre les lignées MNNG-HOS naïves et résistantes. Leurs expressions sont normalisées sur celles de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et de la β-2microglobuline (B2M), utilisées ici comme gènes de référence. Les barres d'erreur représentent la déviation standard pour un triplicat. (I) L'expression des pompes à efflux ABCC1, ABCC2, ABCG2 et MDR-1 a été évaluée par RT-qPCR et comparée entre les lignées MNNG-HOS naïves et résistantes. Leurs expressions sont normalisées sur celles de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et de la β-2microglobuline (B2M), utilisées ici comme gènes de référence. Les barres d'erreur représentent la déviation standard d'un triplicat. (J) Test de viabilité après coloration au Crystal Violet. Les cellules MNNG-HOS naïves et résistantes ont été traitées pendant 72h avec les concentrations indiquées de Cisplatine (dilutions au demi; concentration la plus forte : 25 μM), Doxorubicine (dilutions au dixième; concentration la plus forte : 10 µM), Mafosfamide (dilutions au cinquième; concentration la plus forte : 100 µg/mL) ou I-BET (dilutions au demi; concentration la plus forte : 100 μM). Les barres d'erreur représentent les écart-types de triplicats.

III.3.2. La surexpression de BRD2 et BRD4 par la lignée MNNG-HOS JQ1R20 est en partie à l'origine de sa résistance à JQ1 :

Les résistances aux agents de chimiothérapie peuvent avoir de nombreuses origines et parmi celles-ci, il est fréquent que les cellules tumorales surexpriment les cibles directes/indirectes des drogues utilisées pour les éliminer. Compte tenu que JQ1 cible directement les protéines à BET Bromodomaines, BRD2, BRD3 et BRD4 et que nous avons précédemment identifié C-Myc et RUNX2 comme étant deux oncogènes drivers ciblés de façon indirecte par JQ1 dans l'Ostéosarcome, l'expression de ces gènes a été évaluée dans les lignées sensibles et résistantes. Nos analyses révèlent qu'au niveau transcriptionnel, la lignée JQ1R20 exprime 2,6 fois plus BRD2 et 1,3 fois plus BRD4 que la lignée MNNG-HOS naïve, mais semble en revanche présenter une légère diminution de l'expression de BRD3 (Fig. 2A). La surexpression de BRD2 et BRD4 a également pu être confirmée au niveau protéique, par analyse par Western Blot (Fig. 2B). Concernant les cibles indirectes de JQ1, on peut noter une surexpression de C-Myc de plus de deux fois dans la lignée résistante, ainsi qu'une sous-expression d'un facteur 2 de RUNX2 dans cette même lignée, comparativement à la lignée sensible (Fig. 2C). Ces résultats soulèvent l'hypothèse que cette adaptation d'expression génique puisse éventuellement constituer un des mécanismes à l'origine de la chimiorésistance de la lignée JQ1R20.

Afin d'évaluer la précocité de la mise en place d'un tel mécanisme d'adaptation des cellules d'Ostéosarcome au stress induit par JQ1, le niveau d'expression de BRD2 et BRD4 été évalué par RT-qPCR dans la lignée MNNG-HOS naïve, suite à une cinétique de traitement par JQ1, employé à la concentration de 0,5 μ M. Une augmentation du niveau d'expression de BRD2 de l'ordre de 50% est ainsi observée dès 15h de traitement, alors qu'une telle cinétique de traitement ne semble pas influer l'expression de BRD4 au niveau transcriptionnel (**Fig. 2D**). Au niveau protéique, l'augmentation du niveau d'expression de BRD2 corrèle également avec les résultats précédents (**Fig. 2E**). Une augmentation du niveau d'expression de BRD4 dépendante du temps de traitement semble par ailleurs être retrouvée ici, contrairement à ce qui avait été observé au niveau des transcrits de BRD4. De plus, nos résultats tendent également à montrer que l'augmentation de l'expression de BRD2 et BRD4 soit dépendante de la dose de JQ1 employée (**Fig. 2F et 2G**), jusqu'à atteindre un plateau pour des concentrations de plus de 5 μ M.

Afin de confirmer que l'augmentation de l'expression de BRD2 et de BRD4 par les cellules JQ1R20 soit une des causes de leur chimiorésistance, des transfections transitoires de ces gènes ont été réalisées dans la ligné MNNG-HOS naïve et des tests fonctionnels de viabilité et de clonogénicité ont ensuite été menés. L'efficacité de transfection a dans un premier temps été validée au niveau transcriptionnel : l'expression des transcrits de BRD2 étant ainsi augmentée de plus de 400 fois et celle de BRD4 de plus de 2500 fois, 48 heures post-transfection (**Fig. 2H**). La surexpression de BRD2 a également pu être confirmée au

niveau protéique (**Fig. 2H**). Vingt-quatre heures après transfection, les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes de JQ1 pendant 72h et la viabilité cellulaire a été évaluée par coloration au Crystal Violet (**Fig. 2I**). Il a ainsi pu être mis en évidence que la surexpression ectopique de BRD2, mais pas celle de BRD4, induisait une chimiorésistance à JQ1. Dans un second temps, l'effet de l'augmentation de l'expression de BRD2 et de BRD4 sur les capacités clonogéniques des cellules a été évalué, après traitement par JQ1 (**Fig. 2J**). Nous avons ainsi pu noter que la surexpression de ces gènes permettait aux cellules de former significativement plus de colonies après 48h de traitement avec 1 µM de JQ1.

L'ensemble de ces résultats tend ainsi à démontrer que la surexpression de BRD2 et BRD4 dans la lignée JQ1R20 pourrait constituer un des mécanismes employés par ces cellules pour se soustraire aux effets anti-tumoraux de JQ1. Par ailleurs, la ou les origine(s) d'une telle dérégulation reste(nt) encore à découvrir et il n'est pas impossible que des voies épigénétiques impliquant les miARNs en soient la cause.





.

0 10-9

-BRD4

10-7

Log[JQ1(+)] (M)

10-6

10-4

10-5

10-8











Figure 2 | La surexpression de BRD2 et BRD4 par la lignée MNNG-HOS JQ1R20 est en partie à l'origine de sa résistance à JQ1 :

(A) L'expression de BRD2, BRD3, BRD4, (C) C-Myc et RUNX2 a été évaluée par RT-qPCR et comparée entre les lignées MNNG-HOS naïves et résistantes. Les barres d'erreur représentent la déviation standard pour un triplicat. (B) L'expression de BRD2 et BRD4 a été évaluée par Western Blot dans les lignées MNNG-HOS sensibles et JQ1R20. (D) L'expression de BRD2 et BRD4 a été évaluée par RT-qPCR dans la lignée d'Ostéosarcome MNNG-HOS naïve traitée ou non par JQ1(+) à la concentration de 0,5 µM pendant 15, 24, 48 ou 72 heures. L'expression de ces gènes dans le contrôle non traité est assimilée à 1. (E) L'expression de BRD2 et BRD4 a été évaluée dans les mêmes conditions qu'en (D) avec ou sans traitement par JQ1(+), ainsi qu'après traitement avec l'énantiomère inactif JQ1(-). (F) L'expression de BRD2 et BRD4 a été évaluée par RT-qPCR dans la lignée d'Ostéosarcome MNNG-HOS naïve traitée ou non par JQ1(+) pendant 24 heures, à des concentrations croissantes de 0,5 ; 1 ; 5 ou 10 µM. L'expression de ces gènes dans le contrôle non traité est assimilée à 1. (G) L'expression de BRD2 et BRD4 a été évaluée dans les mêmes conditions qu'en (F) avec ou sans traitement par JQ1(+) ainsi qu'après traitement avec l'énantiomère inactif JQ1(-). (H) L'expression de BRD2 et BRD4 a été évaluée au niveau transcriptionnel, 48h après transfection par le vecteur vide pcDNA3, ou les vecteurs -BRD2 et -BRD4 (panels de gauche). Les barres d'erreur représentent la déviation standard pour un triplicat. L'expression de BRD2 a été évaluée par Western Blot dans les mêmes conditions (panel de droite). (I) Test de viabilité après coloration au Crystal Violet. Les cellules MNNG-HOS naïves ont été transfectées par le vecteur vide pcDNA3 ou les vecteurs -BRD2 ou -BRD4, puis traitées pendant 72h avec les doses indiquées de JQ1(+), 24h post-transfection. (J) Test de clonogénicité réalisé sur les cellules de la lignée MNNG-HOS naïves, 24h post-transfection, dans les conditions décrites en (I), après 48h de traitement par 1 μ M de JQ1(+), JQ1(-) ou le volume équivalent de DMSO. Dans toutes les expérimentations de RT-qPCR, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la β-2microglobuline (B2M) sont utilisées comme gènes de référence. Dans tous les Western Blots présentés ici, la GAPDH sert de contrôle interne de chargement.

III.3.3. La lignée MNNG-HOS JQ1R20 présente un profil d'expression de miARNs différent de celui de la lignée MNNG-HOS naïve et sous-exprime le miR-26b-5p :

Afin d'évaluer l'implication des miARNs dans la dérégulation des protéines à BET Bromodomaines dans la lignée JQ1R20, un screening à haut débit de l'expression de 759 miARNs a été réalisé dans cette lignée, par qPCR TLDA (TaqMan® Low Density Array). Le profil d'expression obtenu a été comparé avec celui des cellules de la lignée MNNG-HOS naïve, analysé de la même manière (Fig. 3A), le snARN U6 et les ARNs RNU44 et RNU48 servant d'ARNs de référence de normalisation. Seules les variations d'expression d'un facteur 2 ou plus ont été considérées comme significatives, ce seuil ayant été établi de façon arbitraire. Les résultats de cette analyse ont ainsi montré que l'expression de 306 miARNs était doublée ou réduite d'au moins 50% dans la lignée MNNG-HOS JQ1R20 par rapport à la lignée naïve. Tenant compte du fait que la lignée JQ1R20 surexprime BRD2 et BRD4 (Fig. 2A et 2B), la suite de cette étude s'est intéressée uniquement aux miARNs dont l'expression était diminuée d'au moins deux fois dans cette lignée (222 miARNs concernés). Cette démarche part du postulat que la réduction du niveau d'expression de ces miARNs dans cette lignée conduise à relâcher la pression que ces derniers exercent en temps normal sur leurs gènes-cibles. Ces gènes-cibles peuvent alors en conséquence être surexprimés, comme c'est le cas de BRD2 et BRD4 dans notre modèle.

Cette première analyse a ensuite visé à identifier, parmi les 222 miARNs sousexprimés dans la lignée JQ1R20, ceux qui pouvaient représenter des candidats éventuels quant à l'origine de la chimiorésistance de ces cellules. Des études in silico ont ainsi été réalisées dans le but de déterminer, au sein de ce panel, des miARNs ciblant potentiellement BRD2 et BRD4. Ces analyses ont été menées par l'intermédiaire de l'algorithme de prédiction de couples miARN/ARNm, « DIANA miR » (http://www.diana.imis.athena-innovation.gr). Cet algorithme emploie les homologies de séquences entre miARNs et ARNm pour déterminer les probabilités qu'un couple soit effectif. Ainsi, le miR-26b-5p, sous-exprimé d'environ 10 fois dans la lignée JQ1R20 par rapport à la lignée sensible, a non seulement été identifié comme potentiel répresseur de BRD2, mais aussi de BRD4, en faisant alors un bon candidat quant à l'origine épigénétique de la résistance à JQ1 (Fig. 3B). Des analyses par RT-qPCR spécifiques des miARNs, employant la technologie TaqMan®, ont par la suite permis de confirmer que les cellules JQ1R20 résistantes présentaient bien une diminution de l'expression de ce miARN de l'ordre de deux fois (Fig. 3C). Ces résultats valident donc bien ceux obtenus par qPCR TLDA, même si la sous-expression relative du miR-26b-5p semble moins prononcée dans ce cas.



Figure 3 |La lignée MNNG-HOS JQ1R20 présente un profil d'expression de miARNs différent de celui de la lignée MNNG-HOS naïve et sous-exprime le miR-26b-5p:

(A) Tableau récapitulatif des étapes successives de la démarche de sélection des miARNs à analyser, dans une optique d'identification de ceux impliqués dans la chimiorésistance de la lignée JQ1R20 vis-à-vis de JQ1 (panel haut). L'expression de 759 miARNs a été analysée par gPCR TLDA (TagMan[®] Low Density Array) dans les lignées MNNG-HOS JQR20 et naïves (panel bas). Le sn ARN U6 et les ARNs RNU44 et RNU48 sont utilisés comme gènes de référence. Les histogrammes représentent les variations d'expression de 306 miARNs dans la lignée JQ1R20, normalisées sur celles de la lignée naïve. Seuls les miARNs dont l'expression varie de plus de deux fois entre les deux lignées sont représentés ici, le seuil de significativité dans la variation d'expression entre les deux lignées ayant arbitrairement été établi à 2. (B) Expression relative du miR-26b-5p dans la lignée MNNG-HOS JQ1R20 comparée à celle de la lignée naïve, d'après l'analyse décrite en (A) (panel haut). Représentation schématique du modèle hypothétique de régulation de BRD2 et BRD4 par le miR-26b-5p, établi d'après analyses in silico (panel bas). (C) L'expression du miR-26b-5p a été évaluée par RT-qPCR employant la technologie TaqMan® et comparée entre les lignées MNNG-HOS naïves et résistantes. Les barres d'erreur représentent la déviation standard pour un triplicat. Les gènes U6B et RNU44 sont utilisés comme référence ici.

III.3.4. La sous-expression artificielle du miR-26b-5p dans la lignée MNNG-HOS naïve induit une augmentation du niveau d'expression de BRD2 et BRD4 et augmente sa chimiorésistance à JQ1 :

Afin d'éprouver les prédictions in silico et d'évaluer si BRD2 et BRD4 sont bien des cibles du miR-26b-5p, une stratégie visant à diminuer artificiellement l'expression de ce miARN a été envisagée. Une augmentation consécutive du niveau d'expression de BRD2 et BRD4 est ainsi attendue et tendrait à confirmer les analyses bioinformatiques. Des transfections transitoires à l'aide de l'anti-miR-26b-5p (un inhibiteur spécifique du miR-26b-5p) ou d'un anti-miR Contrôle (Ct) ont ainsi été réalisées dans la lignée MNNG-HOS sensible. L'efficacité de la transfection a pu être validée par RT-qPCR, une diminution de l'expression du miARN d'un facteur 2 ayant alors été obtenue (Fig. 4A). L'expression de BRD2, BRD4, ainsi que celle de C-Myc et RUNX2, deux gènes dont l'expression est induite par les protéines à BET Bromodomaines, a ensuite été analysée au niveau transcriptionnel (Fig. 4B et 4C). Alors que nos résultats montrent une légère augmentation de l'expression des transcrits de BRD2 et de C-Myc suite à la sous-expression du miR-26b-5p, une telle modulation n'a en revanche pas présenté d'effet concernant celle de BRD4 et RUNX2. Au niveau protéigue toutefois, une nette induction de l'expression de BRD2, BRD4 et RUNX2 a pu être observée dans ces conditions (Fig. 4D). Même si la fixation directe de ce miARN sur les transcrits de BRD2 et BRD4 reste encore à démontrer (par la technique du gène-rapporteur), ces résultats suggèrent que ces gènes pourraient bien constituer d'authentiques cibles du miR-26b-5p. Par ailleurs, au vu des différences d'expression transcriptionnelles et protéiques obtenues pour un même gène (Fig. 4B, 4C et 4D), nous pouvons supposer ici que, si le miR-26b-5p se fixe bien directement sur les transcrits de BRD2 et BRD4, son mécanisme d'inhibition relèverait préférentiellement d'un blocage de la machinerie traductionnelle que d'une dégradation de ses transcrits-cibles.

Afin d'évaluer si la diminution de l'expression du miR-26b-5p est bien à l'origine du mécanisme de chimiorésistance à JQ1 de la lignés JQ1R20, l'impact fonctionnel de l'anti-miR-26b-5p sur la viabilité cellulaire des cellules MNNG-HOS naïves a ensuite été évalué. Ces cellules ont ainsi été soumises à un traitement par JQ1 à des concentrations croissantes, 24h après avoir été transfectées par l'anti-miR-26b-5p ou un anti-miR Contrôle (Ct). Nous avons pu noter que la diminution de l'expression du miARN contribuait à augmenter la chimiorésistance à JQ1 (**Fig. 4E**), de la même façon que l'augmentation ectopique de l'expression de BRD2 dans cette même lignée sensible le permettait (**Fig. 2I**). Une telle augmentation de la chimiorésistance à JQ1 s'illustre également par une augmentation significative des capacités clonogéniques des cellules traitées par JQ1(+) et JQ1(-) (**Fig. 4F**). Des tests de dosage d'activité caspase 3/7 ont par ailleurs révélé que la réduction de l'expression du miR-26b-5p induisait une moindre activité apoptotique de ces cellules en présence de JQ1 (**Fig. 4G**).

L'ensemble de ces résultats semble donc soutenir que le miR-26b-5p soit favorable à la chimiosensibilité des cellules d'Ostéosarcome de la lignée MNNG-HOS à JQ1. Son inhibition transitoire permettant non seulement d'augmenter la viabilité cellulaire et les capacités clonogéniques de ces cellules, mais aussi de réduire significativement leur réponse apoptotique en présence de JQ1, ce miARN apparaîtrait ainsi comme un suppresseur de tumeurs dans ce contexte.



Figure 4 |La sous-expression artificielle du miR-26b-5p dans la lignée MNNG-HOS naïve rehausse son niveau d'expression de BRD2 et BRD4 et augmente sa chimiorésistance à JQ1 :

(A) L'expression du miR-26b-5p a été évaluée par RT-qPCR employant la technologie TaqMan[®], dans la lignée MNNG-HOS naïve, 48h après transfection par l'anti-miR-26b-5p ou l'anti-miR Contrôle (Ct). Les gènes U6B et RNU44 sont utilisés comme référence ici, les barres d'erreur représentent la déviation standard pour un triplicat. (B) L'expression de BRD2, BRD4, (C) C-Myc et RUNX2 a été évaluée par RTqPCR dans la lignée MNNG-HOS naïve dans les mêmes conditions que décrites en (A). Les barres d'erreur représentent la déviation standard pour un triplicat et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ainsi que la β-2microglobuline (B2M) sont utilisées comme gènes de référence. (D) L'expression de BRD2, BRD4 et RUNX2 a été évaluée par Western Blot dans les mêmes conditions que décrites en (A). La GAPDH sert de contrôle interne de chargement. (E) Test de viabilité après coloration au Crystal Violet. Les cellules MNNG-HOS naïves ont été transfectées avec les anti-miRs Ct ou -26b-5p, puis traitées pendant 72h avec les concentrations indiquées de JQ1(+), 24h posttransfection. (F) Test de clonogénicité réalisé sur les cellules de la lignée MNNG-HOS naïves transfectées par les anti-miRs Ct ou -26b-5p. Les cellules ont été traitées pendant 48h avec 0,5 μM de JQ1(+), JQ1(-) ou le volume équivalent de DMSO, 24h post-transfection. Les cellules ont ensuite été fixées puis colorées au Crystal Violet lorsque des clones étaient macroscopiquement observables. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de la moyenne de la surface colorée/surface totale, de 3 zones par puits, arbitrairement choisies pour l'analyse. Une même condition de traitement a été réalisée en triplicat. (G) La lignée MNNG-HOS naïve transfectée par l'anti-miR Ct ou -26b-5p a été traitée pendant 48h avec 4 μ M de JQ1(+) ou le volume correspondant de DMSO, 48h post-transfection. L'induction de mort par apoptose a été évaluée par dosage de l'activité des caspases 3/7 et rapportée à 1 μ g de protéine. Les barres d'erreur représentent les écart-types de triplicats. Des tests statistiques T de Student non appariés ont été réalisés pour comparer la significativité des différentes conditions entre elles.

III.3.5. Perspectives : Etablissement d'un modèle murin d'Ostéosarcome résistant à JQ1 :

Cette étude a permis d'établir et de caractériser d'un point de vue fonctionnel, une lignée d'Ostéosarcome humaine résistante à l'inhibiteur de BET Bromodomaines JQ1 (**Fig. 1**). Nos analyses ont par ailleurs contribué à mieux comprendre l'origine moléculaire de la chimiorésistance de ces cellules vis-à-vis de JQ1 : la surexpression des cibles directes de ce composé, BRD2 et BRD4 constituerait un des mécanismes mis en place par ces cellules pour résister à JQ1 (**Fig. 2A et 2B**). De plus, nous avons également pu démontrer que le miR-26b-5p, sous-exprimé par la lignée MNNG-HOS JQ1R20, pourrait cibler de façon directe les transcrits de BRD2 et BRD4, expliquant ainsi l'origine de la surexpression de ces gènes conduisant à la chimiorésistance à JQ1 (**Fig. 3**).

Toutefois, cette étude est toujours en cours à l'heure actuelle et ces données préliminaires méritent encore d'être complétées. En particulier et comme évoqué précédemment, la fixation directe du miR-26b-5p sur BRD2 et/ou BRD4 n'a pas encore été démontrée. La nature d'une telle fixation pourra être déterminée par des techniques de gène-rapporteur utilisant un vecteur codant pour le gène de la luciférase dont la partie 3'UTR sera remplacée par celles de BRD2 ou de BRD4. Ce vecteur sera transfecté conjointement au pré-miR-26b-5p ou à un pré-miR Contrôle et l'intensité de la bioluminescence émise par la luciférase en présence de son substrat sera mesurée. Celle-ci sera alors proportionnelle au nombre de transcrits du gène de la luciférase *in cellulo*, elle-même directement dépendante de la présence du miR-26b-5p, si ce dernier se fixe effectivement de façon directe aux parties 3'UTR de BRD2 ou de BRD4. Le cas échéant, des mutations de ces parties 3'UTR au niveau des sites de fixation du miARN devraient permettre d'abroger la dégradation des transcrits de la luciférase par le miARN, ceci se traduisant alors par une augmentation de l'intensité de la bioluminescence émise.

Par ailleurs, nos expérimentations de modulation du niveau d'expression du miR-26b-5p dans la ligné MNNG-HOS naïve pourront être validées par la stratégie inverse (**Fig. 4**). Ainsi, des tests fonctionnels visant cette fois à augmenter artificiellement l'expression du miR-26b-5p dans la lignée JQ1R20 (à l'aide de pré-miARNs synthétiques) seront envisagés, une re-sensibilisation des cellules à JQ1 étant attendue dans ce cas. Dans des perspectives d'application cliniques de ce miARN, la preuve de concept de son efficacité à pallier la chimiorésistance à JQ1 doit d'abord être établie dans des modèles précliniques d'Ostéosarcome, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, avant d'être considérée dans un contexte clinique de résistance thérapeutique. Si les cellules tumorales des patients surexpriment en effet BRD2 et BRD4, la diminution de leur expression par l'emploi du miR-26b-5p comme agent chimio-sensibilisateur pourrait ainsi permettre de s'affranchir d'une éventuelle chimiorésistance à JQ1. Ces perspectives requièrent donc l'établissement d'un modèle *vivo* d'Ostéosarcome résistant à JQ1, actuellement toujours en cours au laboratoire, ceci constituant finalement la toute dernière partie présentée dans ce travail de thèse.

Dans le but d'étudier les mécanismes de résistance à JQ1 précédemment mis en évidence in vitro, dans un modèle animal, nous avons établi un modèle murin d'Ostéosarcome humain résistant à JQ1 à partir de la lignée MNNG-HOS JQ1R20. Ce modèle a ainsi été généré par injection paratibiale de 1,5 million de cellules de cette lignée dans des souris athymiques. Les cellules JQ1R20 subissant toutefois une pression continuelle de 20 µM de JQ1 dans le milieu de culture, la question du maintien de la résistance de ces cellules in vivo s'est naturellement posée, dans un contexte de modèle animal intégré. Afin de juger des capacités adaptatives des cellules de la lignée JQ1R20 et d'évaluer la réversibilité de la mise en place de leurs mécanismes de résistance acquise à JQ1, une fraction de ces cellules a été isolée et sa culture in vitro a été poursuivie en l'absence de JQ1, pendant six mois. Le maintien de la résistance de telles cellules (dénommées MNNG-HOS JQ1R20 NT; Non Traitées) en l'absence de traitement a été évalué par test de viabilité au Crystal Violet, après traitement par des concentrations croissantes de JQ1. Il a ainsi pu être mis en évidence que ces cellules présentaient toujours une chimiorésistance à cet agent en comparaison de celles de la lignée sensible (Fig. 5A). On peut noter que la lignée JQ1R20 NT est toutefois légèrement plus sensible que la lignée JQ1R20 pour des concentrations supérieures à 3,12 μМ.

Compte tenu de ces résultats, la stratégie de maintien de la résistance des cellules JQ1R20 in vivo a consisté à traiter les animaux par JQ1 à une fréquence beaucoup moins importante que pour un protocole de traitement à visée curative. Alors que dans ce cas, JQ1 était administré deux fois par jour à la dose de 50 mg/kg par injection intra-péritonéale (cf. Articles 1 et 2), nous avons choisi ici de ne traiter ces souris que trois fois par semaine seulement, aux mêmes doses et par la même voie d'administration (Fig. 5B). La croissance tumorale a été suivie au cours du temps jusqu'à atteindre un volume critique de 1500 mm³, seuil auquel les animaux ont été euthanasiés. Le maintien du modèle a ensuite été assuré par transplantations en site osseux (paratibial) de fragments tumoraux prélevés chez les souris sacrifiées, à chaque génération. A chaque transplantation, les cellules tumorales des souris « donneuses » ont également été mises en culture afin d'évaluer in vitro, la conservation de leur potentiel de chimiorésistance à JQ1 (Fig. 5B). Des tests de viabilité ont ainsi permis de mettre en évidence que les cellules tumorales JQ1R20 initialement injectées et remises en culture (génération n), mais aussi celles de la génération n+1, issues de la fragments tumoraux de la génération n, conservaient une transplantation de chimiorésistance à JQ1 (Fig. 5C).

Les niveaux d'expression de BRD2, BRD4, C-Myc, RUNX2 (**Fig. 5D**) et celui du miR-26b-5p (**Fig. 5E**) ont également été évalués dans les cellules remises en culture à chaque génération. Il semblerait ainsi que le mécanisme de résistance initialement mis en place par les cellules de la lignée JQ1R20 ne soit que partiellement conservé dans les cellules issues des tumeurs des générations n et n+1. En effet, alors que les cellules de génération n présentent toujours une surexpression de BRD2, celle-ci étant même plus prononcée que dans les cellules JQ1R20, les cellules de génération n+1 expriment ce gène à un niveau semblable à celui de la lignée naïve (Fig. 5D). Curieusement, alors que les cellules de génération n présentent une sous-expression de BRD4 par rapport aux lignées MNNG-HOS JQ1R20 et MNNG-HOS naïves, celles de la génération n+1 ré-expriment ce gène à un niveau similaire à celui des lignées naïves et JQ1R20. Concernant C-Myc et RUNX2, les deux générations (n et n+1) présentent des profils d'expression identiques entre elles, mais néanmoins opposés à ceux de la lignée JQ1R20, C-Myc étant sous-exprimé et RUNX2 étant surexprimé. Toutefois, le niveau d'expression du miR-26b-5p est toujours diminué dans ces cellules comparé à la lignée naïve et apparaît même être plus réduit que dans la lignée JQ1R20 (Fig. 5E). Afin d'évaluer la stabilité du modèle, le même type d'analyse est par la suite envisagé, sur au moins quatre générations de souris successivement transplantées. Ces résultats nécessitent par ailleurs d'être confirmés au niveau protéique mais tendent à montrer qu'a priori, l'expression des acteurs moléculaires impliqués dans le mécanisme de chimiorésistance des cellules JQ1R20 ne soit pas stable au cours des transplantations. Ces premières analyses ne permettent donc pas, pour l'instant, d'envisager l'utilisation de ce modèle comme base fiable quant à l'étude des mécanismes de chimiorésistance à JQ1 impliquant BRD2 et BRD4, dans le contexte de l'Ostéosarcome.

Toutefois, l'expression du miR-26b-5p restant tout de même très diminuée dans les cellules de génération *n* et *n*+1 comparé à la lignée sensible, il est possible que ce miARN ait une implication réelle dans la mise en place du mécanisme de chimiorésistance à JQ1, indépendamment de BRD2 et BRD4. A terme, et si les expérimentations *in vitro* précédemment suggérées apportent la preuve qu'une hausse artificielle du niveau d'expression du miR-26b-5p (à l'aide de pré-miARNs) puisse sensibiliser la lignée JQ1R20 à cet agent, l'utilisation de ce modèle murin sera tout de même envisagée. Elle permettrait peut être ainsi d'apporter la preuve de concept des fonctions « chimio-sensibilisatrices » de ce miARN *in vivo* et le régime de traitement curatif de JQ1 employé dans notre modèle d'Ostéosarcome sensible, à savoir, une administration intra-péritonéale biquotidienne de JQ1 à 50 mg/kg, pourrait alors être complété par l'injection intra-tumorale du pré-miR-26b-5p²⁸⁹. L'effet de ce traitement sur les paramètres de croissance tumorale et de survie à long terme sera ainsi modélisé et des analyses d'histologie et d'immunohistochimie évalueront son impact sur l'organisation cellulaire des tumeurs ainsi que sur celle des tissus osseux l'environnant.

Finalement, en répondant à des problématiques d'ordre fondamental, cette étude de la mise en place de résistances aux inhibiteurs de BET Bromodomaines dans l'Ostéosarcome, permettra non seulement de mieux appréhender l'implication des miARNs dans les processus de régulation épigénétique propres à cette pathologie, mais également d'envisager une possible transposition de leurs mécanismes d'action dans d'autres cancers. Enfin, dans une démarche thérapeutique, cette étude pourrait également mettre en lumière une potentielle utilisation du miR-26b-5p comme nouveau marqueur prédictif de la réponse au traitement par un inhibiteur de protéines à BET Bromodomaines, en faisant alors un outil intéressant pour les cliniciens. De plus, ce travail pourrait également permettre d'apporter la preuve de concept de l'utilisation de ce miARN comme nouvelle molécule « chimio-sensibilisatrice», servant de traitement complémentaire à l'utilisation de molécules telles que JQ1. Toutes ces stratégies sont d'une grande importance dans le contexte actuel et ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'amélioration de la prise en charge des résistances thérapeutiques de l'Ostéosarcome, dans lequel encore trop peu d'alternatives cliniques sont disponibles.



Figure 5 |Etablissement d'un modèle murin de résistance à JQ1 par injection paratibiale de la lignée JQ1R20 et maintien du modèle par transplantations successives de fragments tumoraux :

(A) Test de viabilité après coloration au Crystal Violet. Les cellules MNNG-HOS naïves, JQ1R20 et JQ1R20 non traitées sur le long terme (NT) ont été traitées pendant 72h avec les concentrations indiquées de JQ1(+). Les barres d'erreur représentent les écart-types de triplicats. (B) Représentation schématique des différentes étapes du protocole suivi pour l'établissement du modèle *vivo* de résistance de l'Ostéosarcome à JQ1. IP : Intrapéritonéale. (C) Test de viabilité après coloration au Crystal Violet. Les cellules MNNG-HOS naïves, JQ1R20 et celles issues de la mise en culture des cellules tumorales des souris de génération *n* (**panel de gauche**) et *n+1* (**panel de droite**) ont été traitées pendant 72h avec les concentrations indiquées de JQ1(+). Les barres d'erreurs représentent les écart-types de triplicats. (D) L'expression de BRD2, BRD4, C-Myc et RUNX2 a été évaluée par RTqPCR dans les cellules tumorales issues des souris de générations *n* (*n*) et *n+1* (*n+1*) et comparée avec celle de ces mêmes gènes dans les lignées MNNG-HOS naïves (Nvs) et résistantes (JQ1R20). Les barres d'erreur représentent la déviation standard pour un triplicat et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ainsi que la β-2microglobuline (B2M) sont utilisées comme gènes de référence. (E) L'expression du miR-26b-5p a été évaluée par RT-qPCR dans les mêmes conditions que décrites en (D). Le gène *U6B* est utilisé comme référence ici, les barres d'erreur représentent la déviation standard pour un triplicat et n guy décrites en (D). Le gène *U6B* est utilisé comme référence ici, les barres d'erreur représentent la déviation standard pour un triplicat et ne decrites en (D). Le gène *U6B* est utilisé comme référence ici, les barres d'erreur représentent la déviation standard pour un triplicat.

III.4. Discussion & Conclusion :

En conclusion, cette étude a permis l'établissement et la caractérisation sur les plans fonctionnels et moléculaires, de la lignée d'Ostéosarcome humaine JQ1R20, résistante à l'inhibiteur de BET Bromodomaines JQ1. Cette lignée supporte la pression continue d'un traitement par JQ1 à la concentration de 20 µM dans le milieu de culture (**Fig. 1B**), sa résistance acquise se traduisant par une moindre sensibilité à cet agent en termes de viabilité cellulaire, de capacités clonogéniques et d'induction de mort cellulaire par apoptose ainsi que par un potentiel migratoire réduit (**Fig. 1B, 1C, 1D et 1F**). Ces cellules arborent par ailleurs un phénotype de type ostéoblastique plus prononcé que celui de la lignée MNNG-HOS d'origine, caractérisé à la fois par une surexpression de RANK, de l'OCN et de l'ALP mais aussi par une plus grande propension à la différenciation ostéoblastique (**Fig. 1G et 1H**). De plus, alors qu'elles conservent une sensibilité aux agents de chimiothérapie couramment employés dans le cadre de l'Ostéosarcome (Cisplatine, Mafosfamide et Doxorubicine), ces cellules sont également capables de résister à I-BET, un autre inhibiteur spécifique des protéines à BET Bromodomaines (**Fig. 1J**).

Sur le plan moléculaire, ces cellules surexpriment BRD2 et BRD4, ce mécanisme pouvant alors constituer une des origines de leur résistance aux inhibiteurs de BET Bromodomaines (**Fig. 2A et 2B**). Par ailleurs, notre étude apporte la preuve qu'une telle adaptation soit bien causée par JQ1, ce dernier induisant également une surexpression de ces gènes dans la lignée MNNG-HOS sensible, de manière dépendante du temps et de la concentration employée (**Fig. 2D, 2E, 2F et 2G**). Ces résultats suggèrent toutefois que le niveau d'expression de BRD2 et de BRD4 soit également évalué dans la lignée résistante soumise à des concentrations croissantes de JQ1, ce qui permettrait de confirmer que ce mécanisme résulte bien de l'adaptation des cellules au stress induit par JQ1.

De plus, notre screening de l'expression de 759 miARNs a révélé une sous-expression du miR-26b-5p dans la lignée JQ1R20 comparativement à la lignée MNNG-HOS d'origine, BRD2 et BRD4 constituant justement deux cibles potentielles de ce miARN (**Fig. 3**). Fonctionnellement, l'inhibition de ce miARN dans la lignée sensible contribue à augmenter l'expression de BRD2 et de BRD4 (**Fig. 4B et 4D**) et accroît également la chimiorésistance de ces cellules à JQ1, évaluée en termes de viabilité cellulaire, de clonogénicité et d'activité apoptotique (**Fig. 4E, 4F et 4G**). Des techniques de gène-rapporteur doivent cependant être menées afin de confirmer le ciblage direct des transcrits de ces gènes par le miR-26b-5p.

Ce travail a également initié l'établissement d'un modèle murin de xénogreffe de cellules JQ1R20 dans des animaux athymiques, son maintien étant assuré par transplantations successives de fragments tumoraux en site osseux, au cours des générations (**Fig. 5B**). Même si le développement de ce modèle n'est encore qu'à ses prémices à l'heure actuelle, nous avons pu mettre en évidence que les cellules issues des tumeurs des deux premières générations de souris conservaient la chimiorésistance à JQ1 *in vitro* (**Fig. 5C**), possiblement en raison de la diminution de leur niveau d'expression du miR-

26b-5p (Fig. 5E), la surexpression de BRD2 et BRD4 n'étant toutefois pas stable au cours des générations (Fig. 5D).

L'ensemble de ces résultats suggère que notre modèle d'Ostéosarcome résistant à JQ1 constitue une base de travail innovante, permettant une meilleure compréhension des mécanismes d'adaptation des cellules d'Ostéosarcome aux stress induits par les traitements de chimiothérapie. Par ailleurs, le screening haut débit de l'expression des miARNs réalisé dans la lignée JQ1R20 permettra une étude plus approfondie des mécanismes épigénétiques impliquant ces petits ARNs dans la chimiorésistance de l'Ostéosarcome aux inhibiteurs de BET Bromodomaines. De plus, ce travail se positionne à un carrefour stratégique compte tenu du contexte scientifique actuel : un nombre grandissant d'études s'étant en effet intéressé aux mécanismes de **résistance** des cellules tumorales vis-à-vis des inhibiteurs de **BET Bromodomaines** au cours des derniers mois. Même si ces travaux concernent des modèles de cancers variés et prêtent de multiples origines à ces mécanismes, aucun ne concerne l'Ostéosarcome. Par ailleurs, une des originalités du travail que nous proposons ici, réside dans l'intérêt porté aux miARNs dans la mise en place de ce type de résistance, ces derniers n'ayant jamais fait l'objet d'étude dans ce contexte non plus.

Les seules données de la littérature traitant du lien entre l'inhibition des BET Bromodomaines et les miARNs concernent une étude menée dans un modèle de cellules hématopoïétiques murines²⁹¹. Ce travail rapporte que l'induction de l'**apoptose** en réponse à JQ1 soit dans ce cas en partie relayée par l'effet inhibiteur de JQ1 sur l'expression des miARNs du cluster **miR-17-92**, agissant comme des répresseurs transcriptionnels du facteur **pro-apoptotique BIM**. La seule autre étude disponible a été conduite dans un modèle de lymphome B et rapporte que **C-Myc** permette le recrutement d'**EZH2** au niveau du promoteur du **miR-26a**, réprimant ainsi la transcription de ce miARN aux effets suppresseur de tumeurs²⁹². Ces auteurs montrent par ailleurs qu'un traitement combiné de ces cellules par JQ1 et le DZNep, un inhibiteur d'EZH2, permet de ralentir la progression tumorale de ce cancer. Il est d'ailleurs intéressant de noter que notre analyse par qPCR TLDA révèle également une **sous-expression** de l'ordre de **70%** de ce miARN dans la lignée JQ1R20 comparé aux cellules sensibles (**data non montrées**).

La caractérisation moléculaire de notre lignée résistante JQ1R20 révélant une **surexpression** des protéines à BET Bromodomaines **BRD2** et **BRD4**, nous avons logiquement focalisé notre analyse sur ce mécanisme adaptatif, mais il est intéressant de noter que plusieurs études rapportent d'autres types de dérégulations de l'expression génique dans d'autres modèles cellulaires résistants à JQ1. Il a ainsi été rapporté que des cellules de **cancer pancréatique** résistantes aux inhibiteurs de BET Bromodomaines, surexprimaient **Gli2**, un des effecteurs de la voie Sonic-Hedgehog (HH)²⁹³. Cette étude précise par ailleurs que ce gène permet l'induction de l'expression de **C-Myc** par fixation directe au niveau de son promoteur. Ces cellules résistantes surexpriment également **FOSL1** et **HMGA2**, deux gènes dont l'expression est dépendante des protéines à BET Bromodomaines²⁹³. Par ailleurs,

l'étude de Rathert et al., conduite dans un modèle de leucémie myéloïde aigue résistante à JQ1, a pu montrer que la suppression du complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) par ces cellules, restaurait en conséquence l'expression de gènes-cibles de JQ1 tels que C-**Myc**, ce mécanisme constituant ainsi l'origine de la résistance à cet agent²⁹⁴. Ce groupe a par ailleurs pu démontrer que la suppression de PRC2 induisait l'activation de la signalisation des Wnts (Wingless-Type MMTV Integration Site Family), permettant une compensation des effets de JQ1 dans ce modèle. Il est intéressant de souligner que nous avons également pu observer une augmentation du niveau d'expression de certains effecteurs de la voie Wnt dans notre modèle, tels que Wnt6 (data non montrées). Toutefois, malgré les résultats de ce groupe ainsi que les données préliminaires de notre étude (Fig.2C), la surexpression de C-Myc ne semble pas toujours être associée avec une augmentation de la chimiorésistance à JQ1, comme cela a pu être démontré dans des modèles de cancers du sein triple-négatifs résistants à JQ1²⁹⁵. La cause de la résistance de ces cellules ne serait pas non plus liée à une dérégulation de la voie JAK2/STAT3 (Janus Kinase 2/ Signal Transducer and Activator of Transcription 3), pourtant impliquée dans la médiation des effets anti-tumoraux de cet agent dans ce cancer, ni même à une quelconque mutation ou surexpression des pompes à efflux telle que MDR-1. Il est intéressant de mettre cette étude en parallèle de la nôtre, puisqu'a contrario, notre lignée d'Ostéosarcome MNNG-HOS JQ1R20, présente une surexpression des pompes à efflux comme MDR-1, ABCC2 et ABCG2 (Fig.11). Toutefois, l'augmentation du niveau d'expression de ces pompes dans notre modèle ne permet pas la mise en place d'un phénotype de résistance de type MDR « fonctionnel », les cellules étant toujours sensibles à d'autres agents de chimiothérapie (Fig. 1J). Tout récemment, une approche par spectrométrie de masse a également permis de mettre en évidence que les résistances à JQ1 développées dans des modèles de carcinomes de l'ovaire BRD4dépendant, étaient dues à une reprogrammation adaptative de l'ensemble du kinome, induisant alors l'activation de kinases favorables à la survie cellulaire²⁹⁶.

Quoi qu'il en soit, compte tenu que BRD2 et BRD4 sont des cibles directes de JQ1 et que la surexpression de ces protéines dans notre lignée JQ1R20 semble être une des origines de la chimiorésistance de l'Ostéosarcome à JQ1 (**Fig. 21 et 2J**), il est d'un enjeu capital de mieux comprendre les mécanismes qui régulent leur **expression** et/ou leur **activité**. Dans le cancer du sein, il a ainsi été démontré que la chimiorésistance à JQ1 était liée à une augmentation indirecte de l'activité transcriptionnelle de BRD4, due à son **hyperphosphorylation**²⁹⁵. Cette dernière résulterait dans ce cas d'une diminution de l'activité de **PP2A** (**Protein Phosphatase 2A**), la principale phosphatase à sérine de BRD4, favorisant alors son association avec le facteur transcriptionnel **MED1** (**Mediator Complex Subunit 1**). Cette étude illustre ici la mise en place d'un mécanisme de chimiorésistance impliquant une régulation post-traductionnelle de l'activité de BRD4. Dans ce contexte, il est ainsi important de noter qu'un contrôle précoce de l'expression de ce gène au niveau transcriptionnel pourrait permettre de pallier la chimiorésistance à JQ1 induite par des mécanismes posttraductionnels compensatoires, contrôlant l'activité de cette protéine. Dans ce sens, une meilleure caractérisation des miARNs impliqués dans la modulation de l'expression de ce gène semble capitale et pourrait constituer une des clés de voûte de la chimiorésistance à JQ1. A ces fins, notre étude portant sur le **miR-26b-5p** semble particulièrement encourageante.

De plus en plus d'études alimentent les connaissances actuelles concernant l'implication du miR-26b-5p dans le cancer. Son rôle de suppresseur de tumeurs a ainsi été récemment rapporté dans le mélanome ou dans le cancer de la vessie, dans lesquels il est sous-exprimé^{297,298}. Sa surexpression artificielle dans des cellules issues de cancer de la vessie inhibe d'ailleurs leurs capacités migratoires et invasives. Quelques cibles directes de ce miARN ont déjà été identifiées, telles que PLOD2 (Procollagène-Lysine, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygénase 2), une enzyme impliquée dans les processus de dégradation de la matrice extracellulaire ou encore EZH2^{297,299}. Les propriétés anti-tumorales de ce miARN sont également soutenue par l'étude de Wang et al., menée dans un modèle de carcinome hépatocellulaire, qui rapporte son rôle inhibiteur de la TEM induite par Twist1 (Twist-related Protein 1), ainsi que ses fonctions anti-invasives et anti-migratoires³⁰⁰. Ce groupe a pu montrer que son ciblage direct de **Smad1**, un des effecteurs de la voie du TGF-β, contribuait à ses fonctions dans ce modèle. D'autre part, en induisant une diminution de l'expression de Snail, de la MMP2 ainsi que de la VE-Cadhérine (Vascular Endothelial Cadherin), il a été montré que ce miARN agissait en réprimant également la vascularisation tumorale, même si aucune fixation directe des transcrits de ces gènes n'a pu être démontrée³⁰¹. Par ailleurs, dans un contexte thérapeutique, ce miARN est fréquemment retrouvé dans les profils d'expression de biomarqueurs sériques **pronostics** de l'évolution de nombreuses pathologies. Par exemple, la diminution de son niveau d'expression dans le sérum de patients souffrant d'insuffisance cardiaque aiguë est corrélée avec un risque de mortalité accru³⁰². Il fait également partie d'un panel de miARNs sériques utiles au diagnostic de la cirrhose biliaire primaire, caractérise les prédispositions aux lésions rénales aiguës et son expression discrimine également les patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge, une maladie due à des défauts de vascularisation de l'œil³⁰³⁻³⁰⁵.

A contrario, le miR-26b-5p présenterait également un rôle oncogénique, mis en évidence dans des cellules murines dérivées de spermatocytes³⁰⁶. Les auteurs de cette étude ont en effet démontré que la **surexpression artificielle** de ce miARN dans ces cellules s'opposait au blocage du cycle cellulaire en phase **G**₀/**G**₁, induit par une exposition à des ondes électromagnétiques très basses fréquences. Ces résultats contredisent les nôtres, puisqu'à l'inverse, nous avons pu démontrer que les cellules JQ1R20, **sous-exprimant** ce miARN comparativement à la ligné MNNG-HOS naïve, présentaient également un **moindre** blocage en phase G₁ du cycle cellulaire, suite à un traitement par JQ1 (**Fig. 1E**). Par ailleurs, il a également été rapporté que ce miARN inhibait l'expression de la **cycline D2** au niveau transcriptionnel et protéique³⁰⁶.

Il a enfin été démontré que le *Trametes robiniophila murris* (Huaier), un champignon couramment employé en médecine traditionnelle chinoise, connu pour ses propriétés anti-

tumorales, induisait la **surexpression** du miR-26b-5p dans des cellules **d'adénocarcinome pulmonaire**, conduisant à l'inhibition de la prolifération cellulaire ainsi qu'à l'induction de la mort cellulaire par apoptose²⁹⁹. Cette étude renforce notre présomption que l'augmentation artificielle de l'expression de ce miARN dans la lignée JQ1R20 puisse peut être permettre de contrer la chimiorésistance de ces cellules à JQ1. Quoi qu'il en soit, cette étude nécessite d'être poursuivie et approfondie, afin d'élucider les implications réelles du miR-26b-5p dans la chimiorésistance de l'Ostéosarcome à JQ1.

DISCUSSION & CONCLUSION GENERALE

En conclusion générale de l'ensemble de ces travaux de thèse, nous avons pu mettre en évidence que les régulations épigénétiques impliquant les protéines à BET Bromodomaines et les miARNs participaient à la progression tumorale des Sarcomes Osseux ainsi qu'aux mécanismes d'échappement, caractérisés par la dissémination métastatique et la chimiorésistance. Cette étude a ainsi pu démontrer que ces facteurs épigénétiques contrôlaient l'expression de certains oncogènes, tels qu'EWS-Fli1 dans le Sarcome d'Ewing (<u>cf. Article 2</u>) et C-Met dans l'Ostéosarcome (<u>cf. Article 5</u>), ainsi que celle de gènes suppresseurs de tumeurs tels que l'isoforme TAp73β (<u>cf. Article 6</u>), aux niveaux pré- et post-transcriptionnels. Toute modulation de l'expression ou de l'activité de ces médiateurs constitue ainsi un véritable levier, sur lequel il est possible d'agir dans une démarche d'optimisation de la prise en charge thérapeutique de ces pathologies.

Nous avons pu démontrer dans ce travail les conséquences fonctionnelles de la modulation de l'expression des **protéines à BET Bromodomaines** et des **miARNs** dans le contexte des Sarcomes Osseux, cette modulation d'expression pouvant aussi bien être induite par des **traitements exogènes (1)** ou résulter de mécanismes **adaptatifs endogènes** nécessaires à la progression tumorale (**2**).

Ainsi, dans le premier cas (1), nous avons pu montrer que l'inhibition fonctionnelle des protéines à BET Bromodomaines induite par JQ1 ralentissait la progression tumorale du Sarcome d'Ewing, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (*cf.* Article 2). Nous avons également pu mettre en évidence que le miR-193a-5p était à l'origine d'un mécanisme endogène de chimiorésistance au Cisplatine et que son inhibition *in vitro* par l'intermédiaire d'un **anti-miR** permettait de re-sensibiliser les Sarcomes Osseux à cet agent (*cf.* Article 6). Nous avons enfin pu démontrer que la perte d'expression du miR-26b-5p et l'augmentation de celle de BRD2 et BRD4, induites par un traitement par JQ1, constituaient une explication possible à la chimiorésistance acquise de l'Ostéosarcome aux inhibiteurs de BET Bromodomaines (<u>PARTIE III</u>).

Dans le cas où les modulations de l'expression des facteurs épigénétiques soient causées par une adaptation des cellules tumorales à leur environnement, indépendamment de tout traitement (2), nous avons pu mettre en évidence que l'augmentation de l'expression de C-Met, consécutive à la perte de celle des miR-198 et -206, favorisait la dissémination métastatique de l'Ostéosarcome (<u>cf. Article 5</u>). Nous avons également pu démontrer dans ce contexte que l'augmentation artificielle de l'expression de ces miARNs permettait de contrer ce mécanisme aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

En levant le voile sur l'implication de certains mécanismes **épigénétiques** dans la biologie des Sarcomes Osseux, ce travail de thèse s'inscrit donc finalement dans une dynamique de **Recherche Fondamentale**, mais propose également des stratégies **thérapeutiques innovantes** visant à s'opposer à la progression tumorale de ces cancers.

Les mécanismes de chimiorésistance, qu'ils soient innés ou acquis au cours des traitements, contribuent toujours grandement à l'échec des thérapies anti-tumorales actuelles. Notre étude de l'implication du miR-193a-5p dans la chimiorésistance des Sarcomes Osseux au Cisplatine a pu démontrer que l'expression endogène de ce miARN était à l'origine des **résistances innées** de ce type de cancer à cet agent (<u>cf. Article 6</u>). Cette analyse n'ayant toutefois pas considéré les modulations d'expression de ce miARN au cours du traitement, il n'est pas exclu que ce facteur soit aussi impliqué dans un mécanisme de chimiorésistance acquise. Notre étude traitant de l'implication du miR-26b-5p dans la chimiorésistance de l'Ostéosarcome à JQ1, a en revanche pu mettre en évidence que ces cellules présentaient une réelle rapidité d'adaptation au stress induit par ce composé, développant en quelques mois à peine un mécanisme de chimiorésistance acquise, caractérisé par la perte d'expression du miR-26b-5p et l'augmentation de celle de BRD2 et BRD4 notamment (cf. PARTIE III). Ce type de chimiorésistance ayant été obtenu par augmentation progressive de la concentration en JQ1 au cours du temps, il illustre parfaitement la situation clinique de nombreux patients atteints de Sarcomes Osseux, pour lesquels, un échappement tumoral survient en dépit de l'augmentation des doses de chimiothérapie employées. Par ailleurs, les seuils de toxicité et les effets secondaires de ces agents ne permettent plus d'augmenter encore leurs concentrations pour se prémunir de la chimiorésistance, ceci constituant toujours un frein important à l'efficacité des protocoles de traitement actuels. A cet égard, les thérapies combinées visant à associer plusieurs composés chimiothérapeutiques sont une des stratégies cliniques les plus couramment employées pour essayer de s'affranchir au mieux des résistances tumorales. D'ailleurs, les traitements combinés employant des composés inhibiteurs de facteurs épigénétiques ont démontré des effets intéressants dans le cadre d'Ostéosarcomes chimiorésistants : une étude américaine a ainsi récemment montré que la lignée d'Ostéosarcome HOSDXR150, présentant un phénotype MDR, était plus sensible à un traitement combinant un inhibiteur de HDACs (Trichostatin A) et un inhibiteur de DNMTs (5-Aza-dC), que par chacun des composés utilisés séparément³⁰⁷. Compte tenu de l'originalité de la stratégie de développement d'inhibiteurs de protéines à BET Bromodomaines tels que JQ1, la suite de cette discussion ne traitera que des perspectives d'étude relatives à l'optimisation de cette drogue épigénétique, celles concernant le Cisplatine ne seront pas abordées ici.

Ainsi, en dépit des effets **antinéoplasiques** de **JQ1** mis en évidence dans nos **modèles précliniques** de Sarcomes Osseux (*cf.* **Article 1 et 2**), il semble raisonnable de n'envisager son utilisation que dans le cadre de thérapies combinées. Plusieurs études rapportent d'ailleurs que ses effets contre des cellules chimiorésistantes puissent aussi être optimisés par une telle stratégie. Sa synergie avec deux inhibiteurs de **tyrosine kinase FLT3 (FLT3-TKI)**, le **Pronatinib** et l'**AC220**, a ainsi pu être démontrée dans des modèles de leucémies myéloïdes aiguës résistantes à l'AC220³⁰⁸. Par ailleurs, son association avec un inhibiteur d'histone désacétylases, le **Panobiostat**, a aussi présenté une synergie en termes d'induction d'apoptose, dans des modèles cellulaires résistantes aux **FLT3-TKI**³⁰⁸. De plus, la combinaison de JQ1 avec des **inhibiteurs de Bcl-XL** tels que l'**ABT737** ou des inhibiteurs des

kinases CK2, qui participent activement à la phosphorylation de BRD4, ont permis de pallier la résistance à JQ1 dans un modèle de cancer du sein²⁹⁵. Au cours de notre étude, nous n'avons pas testé si l'association de JQ1 avec d'autres molécules de chimiothérapie couramment employées dans l'Ostéosarcome pouvait permettre de contrer la résistance à cet agent. Dans cette optique toutefois, l'emploi du **pré-miR-26b-5p** pourrait constituer une stratégie prometteuse.

Toujours dans l'optique de pallier d'éventuels mécanismes de chimiorésistance, des modifications chimiques covalentes de JQ1, visant à l'associer physiquement avec d'autres agents thérapeutiques, pourraient encore permettre d'optimiser ces thérapies combinées. L'emploi de la technologie PROTAC (Proteolysis Targeting Chimeras) a tout récemment permis d'associer JQ1 à des inhibiteurs d'ubiquitine ligase E3, par l'intermédiaire de « linkers » flexibles³⁰⁹. Il a ainsi été démontré que **dBET1**, le composé chimérique issu de la conjugaison de JQ1 avec la Thalidomide, une molécule de la famille des phtalimides fixant la protéine Cerebion (CRBN) au sein du complexe de l'ubiquitine ligase E3, induisait une ubiquitinylation sélective et une dégradation par le protéasome des protéines à BET Bromodomaines. Ce composé, testé dans des modèles vitro et vivo de leucémies, induit ainsi la dégradation complète de BRD4, associée à une meilleure réponse apoptotique, comparativement à celle obtenue par l'emploi de JQ1 seul³⁰⁹. On peut par ailleurs noter que les effets de composés issus de la liaison de JQ1 avec les inhibiteurs des ligases VHL-1 et VHL-2 (Von Hippel-Lindau 1 & 2) par l'intermédiaire de linkers en polyéthylène glycol de longueurs variables ont également été appréhendés dans les cancers cervicaux et l'Ostéosarcome³¹⁰. De manière intéressante, ces composés se sont avérés plus efficaces dans l'inhibition de l'expression de BRD4 que dans celle de BRD2 et BRD3.

Par ailleurs, il a été démontré que certains agents présentant des propriétés de **blocage d'activité kinase** s'avéraient également être des inhibiteurs de **BET Bromodomaines** : le **Dinaciclib**, un inhibiteur de kinases cyclines-dépendantes, interagirait ainsi avec la poche de reconnaissance des lysines acétylées de **BRDT**³¹¹. De la même manière, deux inhibiteurs d'activité PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase), le LY29002 et le LY303511, présenteraient également des capacités de liaison aux Bromodomaines. De plus, le **BI-2536**, un inhibiteur de la kinase PLK1, ainsi que le **TG-101209** et le **TG-101348**, deux inhibiteurs de la kinase JAK2, présentent tous trois des affinités de l'ordre du nanomolaire pour le domaine **BD1** de **BRD4**³⁶. Il y a deux ans, le **DUAL946** a également été développé ; ce composé présentant la particularité de combiner des fonctions inhibitrices de deux types de facteurs épigénétiques : les **protéines lectrices** à **BET Bromodomaines** et les **enzymes « effaceur » HDACs**³⁶.

Une des limitations de notre étude sur les protéines à BET Bromodomaines réside dans le fait que celle-ci ne se soit intéressée qu'à l'inhibiteur JQ1, alors que de nombreuses autres molécules ont été développées ces dernières années, certaines présentant même une meilleure sélectivité vis-à-vis des domaines BDs. Par exemple, alors que JQ1 et I-BET ne discriminent pas les domaines BD1 et BD2, le MS436 permet, quant à lui, un ciblage spécifique du domaine BD1 de BRD4, sa sélectivité étant dix fois plus élevée pour ce domaine que pour le domaine BD2³¹². A l'inverse, le RVX-208 présente, quant à lui, une meilleure sélectivité pour le domaine BD2 de BRD2 par rapport au BD1³¹³. Par ailleurs, JQ1 étant un des tout premiers inhibiteurs de BET Bromodomaines identifiés, les essais cliniques actuels ne concernent malheureusement pas ce composé, mais des molécules développées plus récemment. L'objectif de la PARTIE III de ce travail étant justement d'anticiper les éventuelles résistances thérapeutiques qui pourraient survenir des suites de son emploi en clinique, cette finalité suppose alors la conservation des mécanismes qui en sont l'origine, vis-à-vis de ces nouveaux inhibiteurs de BET Bromodomaines. Même si nous devons rester très prudents quant à la possibilité d'une transposition du mécanisme de chimiorésistance de l'Ostéosarcome à JQ1 vis-à-vis des autres inhibiteurs de BET Bromodomaines en cours d'essais cliniques, il est important de souligner que les cellules JQ1R20 résistantes à JQ1 sont aussi capables de résister à I-BET (cf. PARTIE III, Fig. 1J). Ceci laisse ainsi présumer que ce mécanisme soit également applicable à ces composés, suggérant donc la possibilité d'une stratégie palliative commune.

D'après la base de données <u>http://www.clinicaltrials.gov</u>, le **GSK526762** (GlaxoSmithKline) a été le premier inhibiteur de BET Bromodomaines administré chez l'Homme. L'essai de **phase I** concernant ce composé a débuté en mars 2012 et n'est toujours pas terminé à l'heure actuelle : il vise à déterminer l'innocuité ainsi que la dose administrable de ce composé, chez des patients atteints de carcinomes. L'essai de **phase I** du **BAY1238097** (Bayer) a quant à lui, pris fin en Janvier 2016, les résultats de cette étude n'étant malheureusement pas encore disponibles. D'autres molécules inhibitrices de BET Bromodomaines sont actuellement en cours d'essais cliniques de **phase I** ou **II**, aussi bien chez des patients atteints de cancers que de diabète ou de maladies cardio-vasculaires. On peut par exemple citer l'**INCB054329** (Incyte Corporation), l'**OTX015/MK-8628** (Oncoethix GmbH), le **CPI-0610** (Constellation Pharmaceuticals), le **BMS-986158** (Bristol-Myers Squibb), le **ZEN-003694** (Zenith Epigenetics), le **TEN-010** (Tensha Therapeutics) ou encore le **RVX000222** (Resverlogix Corp), ce dernier étant même en essai clinique de **phase III**. Comme nous l'avons précédemment évoqué, les miARNs constituent un véritable réseau de régulateurs post-transcriptionnels, au fonctionnement très complexe. Leurs effets conjoints permettent en effet un contrôle très fin de l'expression de gènes impliqués dans divers processus biologiques et physiologiques, dont la chimiorésistance et la dissémination métastatique. Ces mécanismes étant à l'origine de l'échappement tumoral des Sarcomes Osseux, une meilleure compréhension des facteurs qui y contribuent est toujours un enjeu crucial de la Recherche en Cancérologie. A cet égard, en mettant en évidence l'implication des miR-193a-5p, -198, -206 et -26b-5p dans ces processus (*cf.* Article 5, 6 et PARTIE III), notre étude a non seulement permis de mieux appréhender le rôle de ces facteurs dans la biologie fondamentale des Sarcomes Osseux, mais aussi d'ouvrir de nouvelles perspectives d'utilisation de ces molécules, comme marqueurs prédictifs de la réponse au Cisplatine ou aux inhibiteurs de BET Bromodomaines tels que JQ1 ou bien, comme agents chimiosensibilisateurs à ces traitements.

Dans une approche thérapeutique, trois grandes stratégies de blocage des miARNs existent aujourd'hui; elles visent ainsi à employer soit des « éponges » à miARNs (1), des oligonucléotides anti-sens (2) ou bien, de petites molécules inhibitrices (3)³¹⁴. Les « éponges à miARNs » (1) sont des ARNm contenant de multiples sites de fixation artificiels pour les miARNs, ceci leur permettant de les séquestrer en agissant comme des leurres³¹⁵. Actuellement, leur utilisation a uniquement fait l'objet d'études précliniques encourageantes chez des animaux transgéniques exprimant ces leurres dans les organes dans lesquels les miARNs sont à inhiber³¹⁶. De petites molécules inhibitrices des miARNs (2) ont également été identifiées, telles que l'Azobenzène par exemple, qui s'oppose à l'expression du miR-21³¹⁷. Toutefois, leur emploi est encore restreint par des EC₅₀ (Concentration efficace médiane : la concentration d'effecteur permettant d'obtenir 50% de la réponse maximum) de l'ordre du micromolaire, ainsi que par le manque de connaissances concernant leurs cibles directes. L'utilisation d'oligonucléotides anti-sens modifiés chimiquement (anti-miARNs) (3), demeure aujourd'hui la stratégie d'inhibition des miARNs la plus étudiée. Elle permet en effet un blocage spécifique et efficace des fonctions des miARNs endogènes in vivo mais est encore confrontée à certaines limitations dans une optique d'utilisation clinique. La spécificité de ciblage de l'anti-miARN directement au niveau des organes concernés constitue en effet un des principaux freins à leur emploi ; les formulations chimiques permettant de véhiculer ces oligonucléotides synthétiques devant favoriser au maximum leur pénétration dans les cellules. Par ailleurs, des progrès restent à faire afin d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de ces composés, ainsi que leur stabilité dans le sérum, riche en nucléases. De plus, les concentrations à administrer sont souvent élevées pour obtenir un effet pharmacologique (environ 80 mg/kg), augmentant alors les risques d'effets non spécifiques indésirables.

Diverses modifications chimiques stabilisent ces composés, telles que l'ajout de groupements **2'-O-Méthyl (2'-OMe)** ou le remplacement de certains atomes d'**oxygène** non-pontant du squelette de phosphate par des atomes de **soufre**, permettant la formation de

ponts phosphorothioates. Des groupements 2'-O-Méthyoxyethyl (2'-MOE), 2'-Fluoro (2'-F) ou les modifications dites Locked Nucleic Acid (LNA), sont également employées pour augmenter l'affinité des anti-miARNs vis-à-vis de leurs cibles. Les groupements N,N-diethyl-4-4(4-nitronaphtalen-1-ylazo)-phénylamines (ZEN) permettent quant à eux de s'affranchir de leurs effets toxiques *in vitro*³¹⁸. Certains autres groupements chimiques permettent d'améliorer la distribution tissulaire de ces oligonucléotides au niveau de certains organes, l'ajout de cholestérols aux extrémités 3' permettant par exemple un ciblage du foie, des reins et de l'intestin, alors que les groupements α -tocophérols (dérivés de la vitamine E) ou les CpGs, dirigent ces oligonucléotides vers le foie et les cellules immunitaires, respectivement. Par ailleurs, l'association des anti-miARNs avec des liposomes, des nanoparticules ou des anticorps sont autant d'autres voies d'administration également en cours d'étude à l'heure actuelle.

Même si l'emploi des miARNs en clinique humaine n'en est encore qu'à ses prémices, plusieurs groupes pharmaceutiques ont d'ores et déjà initié des essais thérapeutiques visant à évaluer leur possible utilisation comme traitement curatif. En développant la technologie LNA, permettant une stabilisation chimique des acides nucléiques, Santaris-Pharma est le premier laboratoire à avoir mis au point le Miravirsen (SPC3649), un inhibiteur du miARN miR-122, nécessaire à la réplication du virus de l'hépatite C hépatique, (http://www.roche.com). Des essais cliniques de phase II sont actuellement en cours et visent à déterminer son intérêt thérapeutique, utilisé en association avec les traitements classiques de l'hépatite C, le Télaprévir et la Ribavirine, chez des patients non répondeurs aux Interférons α peggylés/Ribavirine. L'utilisation des miARNs comme traitement antitumoral est également une piste suivie par d'autres groupes pharmaceutiques tels miRNAs *Therapeutics* par exemple, qui a développé le **MRX34**, une formulation d'ARN synthétique double-brin, mimant les fonctions du miARN suppresseur de tumeur, miR-34, encapsulé dans des nanoparticules liposomales (http://www.mirnatherapeutics.com). Initié en 2013, l'essai thérapeutique de phase I de ce composé, utilisé en monothérapie, a pu montrer des résultats encourageants, le MRX34 induisant des réponses partielles chez des patients atteints de mélanomes, de carcinomes rénaux et hépatocellulaires. Les résultats de notre étude portant sur le miR-193a-5p, suggèrent que son inhibition par l'emploi d'anti-miARNs développés à partir des technologies détaillées ci-dessus puisse peut-être, dans le futur, permettre de pallier la résistance des Sarcomes Osseux au Cisplatine (cf. Article 6). A l'inverse, la stratégie visant à augmenter le niveau d'expression des miR-198 et -206, ou -26b-5p pourraient permettre de contrer la dissémination métastatique ou la chimiorésistance à JQ1, respectivement (cf. Article 5 et PARTIE III).

Cependant, de la même manière que les traitements combinés présentent une efficacité supérieure à celle des monothérapies, le ciblage d'un seul miARN à la fois n'est pas optimal dans ce contexte. Un même **ARNm** présentant en effet de **multiples sites** de fixation pour des **miARNs différents**, il apparaît évident que la redondance des effets des miARNs soit un facteur interférant largement avec les stratégies visant leur inhibition. Quoi qu'il en

soit, de nombreuses études restent encore à faire dans ce domaine aux perspectives d'application cliniques prometteuses.

Par ailleurs, compte tenu de la stabilité des miARNs endogènes dans les fluides corporels, de meilleurs espoirs à courts termes sont à fonder, à mon sens, dans leur emploi comme biomarqueurs à visée diagnostique ou prédictive de l'évolution d'une maladie ou de la réponse à un traitement. Par ailleurs, la stabilité de ces composés comparativement à celle des ARNm, rend leur emploi comme biomarqueurs d'autant plus intéressant qu'il faciliterait toutes les étapes pratiques de collecte et de conservation/stockage des fluides biologiques prélevés chez les patients. Des groupes pharmaceutiques tels que Rosetta Genomics[™] se sont ainsi tournés vers un emploi de ces molécules comme outil de diagnostic du cancer (http://www.rosettagx.com). Plus particulièrement, cette firme a commercialisé des kits de détection de miARNs permettant la discrimination du sous-type histologique des cancers du poumon ou du foie par exemple. D'autres types de kits permettent également de déterminer l'origine primaire d'une tumeur dont seules les métastases sont détectables ou encore de présumer de l'origine cancéreuse ou non de nodules thyroïdiens. Faisant lien avec les miARNs d'intérêt dans cette thèse (cf. Article 5 et PARTIE III), le dosage sanguin du miR-206 fait actuellement l'objet d'un essai clinique rétrospectif visant à diagnostiquer les Rhabdomyosarcomes (<u>http://www.clinicaltrials.gov</u>, essai clinique n°NCT01433237). Un second essai clinique de phase I, initié en 2015 par le Centre Hospitalier Universitaire de Saint Etienne, a également inclus ce miARN dans un panel, dont les variations d'expression plasmatique permettraient de diagnostiquer les faiblesses musculaires consécutives à des chocs septiques (IAMW; ICU Acquired Muscle Weakness), pouvant être mortelles chez des patients admis dans les unités de soins intensifs (essai clinique n°NCT02464371). De plus, l'évaluation du potentiel du miR-26b-5p comme biomarqueur prédictif de la survenue de leukoencéphalopathies inhérentes aux traitements par radiothérapie est également en cours chez des patients atteints de cancers cérébraux (essai clinique n°NCT02544178).

Pour conclure, l'ensemble de ces travaux de thèse a permis d'apporter quelques éléments de réponse quant à l'implication des protéines à **BET Bromodomaines** et celle des **miARNs** dans les **régulations épigénétiques** participant à la **progression tumorale** et à l'**échappement** des **Sarcomes Osseux**. Le développement et l'optimisation de nouvelles molécules inhibitrices de BET Bromodomaines ainsi que les perspectives de leur association avec d'autres traitements de chimiothérapie, sont autant de pistes prometteuses quant à l'amélioration de la prise en charge thérapeutique de ces pathologies. De plus, l'avènement des nouvelles techniques de stabilisation des inhibiteurs de miARNs et l'identification de ces petits régulateurs comme nouveaux **biomarqueurs prédictifs** de la réponse aux traitements ainsi que de la progression tumorale, constituent également des perspectives pleines d'espoir quant à la guérison des jeunes patients atteints de Sarcomes Osseux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Waddington, C. H. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* **41**, 10-13, doi:10.1093/ije/dyr184 (2012).
- 2 Holliday, R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* **238**, 163-170 (1987).
- 3 Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S. & Maleszka, R. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* **319**, 1827-1830, doi:10.1126/science.1153069 (2008).
- 4 Pieau, C. [Effects of raised and lowered incubation temperatures on the sexual differentiation in the embryos of Emys orbicularis L. (Chelonien)]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **286**, 121-124 (1978).
- 5 Venegas, D. *et al.* Dimorphic DNA methylation during temperature-dependent sex determination in the sea turtle Lepidochelys olivacea. *Gen Comp Endocrinol* **236**, 35-41, doi:10.1016/j.ygcen.2016.06.026 (2016).
- 6 Lukacs, D. [Walter Flemming, discoverer of chromatin and mitotic cell division]. *Orv Hetil* **122**, 349-350 (1981).
- 7 Luger, K. & Hansen, J. C. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 188-196, doi:10.1016/j.sbi.2005.03.006 (2005).
- 8 Olins, D. E. & Olins, A. L. Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 809-814, doi:10.1038/nrm1225 (2003).
- 9 Woodcock, C. L. & Ghosh, R. P. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000596, doi:10.1101/cshperspect.a000596 (2010).
- 10 Kornberg, R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871 (1974).
- 11 Huang, H., Sabari, B. R., Garcia, B. A., Allis, C. D. & Zhao, Y. SnapShot: histone modifications. *Cell* **159**, 458-458 e451, doi:10.1016/j.cell.2014.09.037 (2014).
- 12 Redon, C. *et al.* Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 162-169 (2002).
- 13 Biterge, B. & Schneider, R. Histone variants: key players of chromatin. *Cell Tissue Res* **356**, 457-466, doi:10.1007/s00441-014-1862-4 (2014).
- 14 Hargreaves, D. C. & Crabtree, G. R. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* **21**, 396-420, doi:10.1038/cr.2011.32 (2011).
- 15 Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21, doi:10.1101/gad.947102 (2002).
- 16 Goll, M. G. *et al.* Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311**, 395-398, doi:10.1126/science.1120976 (2006).
- 17 Bestor, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**, 2395-2402 (2000).
- 18 Panning, B. & Jaenisch, R. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence Xlinked genes. *Genes Dev* **10**, 1991-2002 (1996).
- 19 Deaton, A. M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* **25**, 1010-1022, doi:10.1101/gad.2037511 (2011).
- 20 Ehrlich, M. *et al.* Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* **10**, 2709-2721 (1982).
- 21 Baylin, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **2 Suppl 1**, S4-11, doi:10.1038/ncponc0354 (2005).
- 22 Gnyszka, A., Jastrzebski, Z. & Flis, S. DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer. *Anticancer Res* **33**, 2989-2996 (2013).
- 23 Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**, 381-395, doi:10.1038/cr.2011.22 (2011).
- 24 Zhang, Y. & Reinberg, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**, 2343-2360, doi:10.1101/gad.927301 (2001).

- 25 Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D. & Patel, D. J. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1025-1040, doi:10.1038/nsmb1338 (2007).
- 26 Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080, doi:10.1126/science.1063127 (2001).
- 27 Morera, L., Lubbert, M. & Jung, M. Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. *Clin Epigenetics* **8**, 57, doi:10.1186/s13148-016-0223-4 (2016).
- 28 Brownell, J. E. & Allis, C. D. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 176-184 (1996).
- 29 Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**, 81-120, doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.81 (2001).
- 30 Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T. L. & Wang, G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* **20**, 3898-3941, doi:10.3390/molecules20033898 (2015).
- 31 Barnes, P. J., Adcock, I. M. & Ito, K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* **25**, 552-563, doi:10.1183/09031936.05.00117504 (2005).
- 32 Lau, O. D. *et al.* HATs off: selective synthetic inhibitors of the histone acetyltransferases p300 and PCAF. *Mol Cell* **5**, 589-595 (2000).
- 33 Briggs, S. D. *et al.* Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* **418**, 498, doi:10.1038/nature00970 (2002).
- 34 Tamkun, J. W. *et al.* brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* **68**, 561-572 (1992).
- 35 Dhalluin, C. *et al.* Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**, 491-496, doi:10.1038/20974 (1999).
- 36 Sanchez, R., Meslamani, J. & Zhou, M. M. The bromodomain: from epigenome reader to druggable target. *Biochim Biophys Acta* **1839**, 676-685, doi:10.1016/j.bbagrm.2014.03.011 (2014).
- 37 Owen, D. J. *et al.* The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J* **19**, 6141-6149, doi:10.1093/emboj/19.22.6141 (2000).
- 38 Charlop-Powers, Z., Zeng, L., Zhang, Q. & Zhou, M. M. Structural insights into selective histone H3 recognition by the human Polybromo bromodomain 2. *Cell Res* **20**, 529-538, doi:10.1038/cr.2010.43 (2010).
- 39 Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H. & Nakatani, Y. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319-324, doi:10.1038/382319a0 (1996).
- 40 Gregory, G. D. *et al.* Mammalian ASH1L is a histone methyltransferase that occupies the transcribed region of active genes. *Mol Cell Biol* **27**, 8466-8479, doi:10.1128/MCB.00993-07 (2007).
- 41 Herquel, B., Ouararhni, K. & Davidson, I. The TIF1alpha-related TRIM cofactors couple chromatin modifications to transcriptional regulation, signaling and tumor suppression. *Transcription* **2**, 231-236, doi:10.4161/trns.2.5.17725 (2011).
- 42 Sanchez, R. & Zhou, M. M. The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**, 659-665 (2009).
- 43 Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P. & Bork, P. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* **28**, 231-234 (2000).
- 44 Borah, J. C. *et al.* A small molecule binding to the coactivator CREB-binding protein blocks apoptosis in cardiomyocytes. *Chem Biol* **18**, 531-541, doi:10.1016/j.chembiol.2010.12.021 (2011).

- 45 Ferri, E., Petosa, C. & McKenna, C. E. Bromodomains: Structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochem Pharmacol* **106**, 1-18, doi:10.1016/j.bcp.2015.12.005 (2016).
- 46 Jones, M. H., Numata, M. & Shimane, M. Identification and characterization of BRDT: A testisspecific gene related to the bromodomain genes RING3 and Drosophila fsh. *Genomics* **45**, 529-534, doi:10.1006/geno.1997.5000 (1997).
- 47 Ladurner, A. G., Inouye, C., Jain, R. & Tjian, R. Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell* **11**, 365-376 (2003).
- 48 Digan, M. E. *et al.* Genetic and molecular analysis of fs(1)h, a maternal effect homeotic gene in Drosophila. *Dev Biol* **114**, 161-169 (1986).
- 49 Gyuris, A. *et al.* The chromatin-targeting protein Brd2 is required for neural tube closure and embryogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 413-421, doi:10.1016/j.bbagrm.2009.03.005 (2009).
- 50 Houzelstein, D. *et al.* Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4. *Mol Cell Biol* **22**, 3794-3802 (2002).
- 51 Berkovits, B. D. & Wolgemuth, D. J. The role of the double bromodomain-containing BET genes during mammalian spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol* **102**, 293-326, doi:10.1016/B978-0-12-416024-8.00011-8 (2013).
- 52 Lamonica, J. M. *et al.* Bromodomain protein Brd3 associates with acetylated GATA1 to promote its chromatin occupancy at erythroid target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E159-168, doi:10.1073/pnas.1102140108 (2011).
- 53 Moriniere, J. *et al.* Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**, 664-668, doi:10.1038/nature08397 (2009).
- 54 Filippakopoulos, P. *et al.* Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell* **149**, 214-231, doi:10.1016/j.cell.2012.02.013 (2012).
- 55 Nishiyama, A., Dey, A., Miyazaki, J. & Ozato, K. Brd4 is required for recovery from antimicrotubule drug-induced mitotic arrest: preservation of acetylated chromatin. *Mol Biol Cell* **17**, 814-823, doi:10.1091/mbc.E05-08-0729 (2006).
- 56 Henriques, T. *et al.* Stable pausing by RNA polymerase II provides an opportunity to target and integrate regulatory signals. *Mol Cell* **52**, 517-528, doi:10.1016/j.molcel.2013.10.001 (2013).
- 57 Wu, S. Y., Lee, A. Y., Lai, H. T., Zhang, H. & Chiang, C. M. Phospho switch triggers Brd4 chromatin binding and activator recruitment for gene-specific targeting. *Mol Cell* **49**, 843-857, doi:10.1016/j.molcel.2012.12.006 (2013).
- 58 Garcia-Gutierrez, P., Mundi, M. & Garcia-Dominguez, M. Association of bromodomain BET proteins with chromatin requires dimerization through the conserved motif B. *J Cell Sci* **125**, 3671-3680, doi:10.1242/jcs.105841 (2012).
- 59 Rahman, S. *et al.* The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Mol Cell Biol* **31**, 2641-2652, doi:10.1128/MCB.01341-10 (2011).
- 60 Bonora, G., Plath, K. & Denholtz, M. A mechanistic link between gene regulation and genome architecture in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev* **27**, 92-101, doi:10.1016/j.gde.2014.05.002 (2014).
- 61 Schweiger, M. R., You, J. & Howley, P. M. Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol* **80**, 4276-4285, doi:10.1128/JVI.80.9.4276-4285.2006 (2006).
- 62 Segura, M. F. *et al.* BRD4 sustains melanoma proliferation and represents a new target for epigenetic therapy. *Cancer Res* **73**, 6264-6276, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0122-T (2013).
- 63 French, C. A. *et al.* BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. *Cancer Res* **63**, 304-307 (2003).
- 54 Jung, M., Gelato, K. A., Fernandez-Montalvan, A., Siegel, S. & Haendler, B. Targeting BET bromodomains for cancer treatment. *Epigenomics* **7**, 487-501, doi:10.2217/epi.14.91 (2015).

- 65 Feng, Q. *et al.* An epigenomic approach to therapy for tamoxifen-resistant breast cancer. *Cell Res* **24**, 809-819, doi:10.1038/cr.2014.71 (2014).
- 66 Asangani, I. A. *et al.* Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castrationresistant prostate cancer. *Nature* **510**, 278-282, doi:10.1038/nature13229 (2014).
- 67 Zou, Z. *et al.* Brd4 maintains constitutively active NF-kappaB in cancer cells by binding to acetylated RelA. *Oncogene* **33**, 2395-2404, doi:10.1038/onc.2013.179 (2014).
- 68 Floyd, S. R. *et al.* The bromodomain protein Brd4 insulates chromatin from DNA damage signalling. *Nature* **498**, 246-250, doi:10.1038/nature12147 (2013).
- 69 Shi, J. *et al.* Disrupting the interaction of BRD4 with diacetylated Twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer. *Cancer Cell* **25**, 210-225, doi:10.1016/j.ccr.2014.01.028 (2014).
- 70 Hussong, M. *et al.* The bromodomain protein BRD4 regulates the KEAP1/NRF2-dependent oxidative stress response. *Cell Death Dis* **5**, e1195, doi:10.1038/cddis.2014.157 (2014).
- 71 Mattick, J. S. & Makunin, I. V. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**, R121-132, doi:10.1093/hmg/ddi101 (2005).
- 72 Dennis, C. The brave new world of RNA. *Nature* **418**, 122-124, doi:10.1038/418122a (2002).
- 73 Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279-289, doi:10.1105/tpc.2.4.279 (1990).
- 74 Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature* **391**, 806-811, doi:10.1038/35888 (1998).
- 75 Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, 188-200 (2001).
- 76 Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366, doi:10.1038/35053110 (2001).
- 77 Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature* **404**, 293-296, doi:10.1038/35005107 (2000).
- 78 Szittya, G. & Burgyan, J. RNA interference-mediated intrinsic antiviral immunity in plants. *Curr Top Microbiol Immunol* **371**, 153-181, doi:10.1007/978-3-642-37765-5_6 (2013).
- 79 Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642-655, doi:10.1016/j.cell.2009.01.035 (2009).
- 80 Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**, 843-854 (1993).
- 81 Boehm, M. & Slack, F. A developmental timing microRNA and its target regulate life span in C. elegans. *Science* **310**, 1954-1957, doi:10.1126/science.1115596 (2005).
- 82 Reinhart, B. J. *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Nature* **403**, 901-906, doi:10.1038/35002607 (2000).
- 83 Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297 (2004).
- 84 Zeng, Y., Yi, R. & Cullen, B. R. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9779-9784, doi:10.1073/pnas.1630797100 (2003).
- 85 van Rooij, E. The art of microRNA research. *Circ Res* **108**, 219-234, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227496 (2011).
- 86 Morlando, M. *et al.* Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 902-909 (2008).
- 87 Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. & Bradley, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14**, 1902-1910, doi:10.1101/gr.2722704 (2004).
- 88 Hui, J. H. *et al.* Structure, evolution and function of the bi-directionally transcribed iab-4/iab-8 microRNA locus in arthropods. *Nucleic Acids Res* **41**, 3352-3361, doi:10.1093/nar/gks1445 (2013).
- 89 Barik, S. An intronic microRNA silences genes that are functionally antagonistic to its host gene. *Nucleic Acids Res* **36**, 5232-5241, doi:10.1093/nar/gkn513 (2008).
- 90 Lutter, D., Marr, C., Krumsiek, J., Lang, E. W. & Theis, F. J. Intronic microRNAs support their host genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects. *BMC Genomics* **11**, 224, doi:10.1186/1471-2164-11-224 (2010).
- 91 Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S. & Kim, V. N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* **21**, 4663-4670 (2002).
- 92 Cai, X., Hagedorn, C. H. & Cullen, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**, 1957-1966, doi:10.1261/rna.7135204 (2004).
- 93 Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-419, doi:10.1038/nature01957 (2003).
- 94 Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F. & Hannon, G. J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231-235, doi:10.1038/nature03049 (2004).
- 95 Han, J. *et al.* Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* **125**, 887-901, doi:10.1016/j.cell.2006.03.043 (2006).
- 96 Zeng, Y., Yi, R. & Cullen, B. R. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J* **24**, 138-148, doi:10.1038/sj.emboj.7600491 (2005).
- 97 Grimson, A. *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* **27**, 91-105, doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017 (2007).
- 98 Guo, L. & Lu, Z. The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PLoS ONE* **5**, e11387, doi:10.1371/journal.pone.0011387 (2010).
- 99 Rana, T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 23-36, doi:10.1038/nrm2085 (2007).
- 100 Brodersen, P. *et al.* Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**, 1185-1190, doi:10.1126/science.1159151 (2008).
- 101 Glimcher, M. J. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instr Course Lect* **36**, 49-69 (1987).
- 102 Ruoslahti, E. Integrins. *J Clin Invest* **87**, 1-5, doi:10.1172/JCl114957 (1991).
- 103 Horton, M. A. Interactions of connective tissue cells with the extracellular matrix. *Bone* **17**, 51S-53S (1995).
- 104 Owen, M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* **10**, 63-76 (1988).
- 105 Chambers, T. J. & Fuller, K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci* **76**, 155-165 (1985).
- 106 Aarden, E. M., Burger, E. H. & Nijweide, P. J. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* **55**, 287-299, doi:10.1002/jcb.240550304 (1994).
- 107 Poole, K. E. *et al.* Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J* **19**, 1842-1844, doi:10.1096/fj.05-4221fje (2005).
- 108 Blair, H. C., Kahn, A. J., Crouch, E. C., Jeffrey, J. J. & Teitelbaum, S. L. Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J Cell Biol* **102**, 1164-1172 (1986).
- 109 Cirmanova, V., Bayer, M., Starka, L. & Zajickova, K. The effect of leptin on bone: an evolving concept of action. *Physiol Res* **57 Suppl 1**, S143-151 (2008).
- 110 Martin, T. J. & Sims, N. A. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev Endocr Metab Disord* **16**, 131-139, doi:10.1007/s11154-014-9308-6 (2015).

- 111 Nakagawa, N. *et al.* RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 395-400, doi:10.1006/bbrc.1998.9788 (1998).
- 112 Hald, J. D. *et al.* Skeletal phenotypes in adult patients with osteogenesis imperfectacorrelations with COL1A1/COL1A2 genotype and collagen structure. *Osteoporos Int*, doi:10.1007/s00198-016-3653-0 (2016).
- 113 Furthner, D. *et al.* Osteopetrosis due to homozygous chloride channel CICN7 mutation mimicking metabolic disease with haematological and neurological impairment. *Klin Padiatr* **222**, 180-183, doi:10.1055/s-0029-1233492 (2010).
- 114 Hingorani, P. *et al.* Current state of pediatric sarcoma biology and opportunities for future discovery: A report from the sarcoma translational research workshop. *Cancer Genet*, doi:10.1016/j.cancergen.2016.03.004 (2016).
- 115 Capasso, L. L. Antiquity of cancer. *Int J Cancer* **113**, 2-13, doi:10.1002/ijc.20610 (2005).
- 116 van den Berg, H., Kroon, H. M., Slaar, A. & Hogendoorn, P. Incidence of biopsy-proven bone tumors in children: a report based on the Dutch pathology registration "PALGA". *J Pediatr Orthop* **28**, 29-35, doi:10.1097/BPO.0b013e3181558cb5 (2008).
- 117 Parkin, D. M., Stiller, C. A., Draper, G. J. & Bieber, C. A. The international incidence of childhood cancer. *Int J Cancer* **42**, 511-520 (1988).
- 118 Lee, R. J., Arshi, A., Schwartz, H. C. & Christensen, R. E. Characteristics and prognostic factors of osteosarcoma of the jaws: a retrospective cohort study. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 141, 470-477, doi:10.1001/jamaoto.2015.0340 (2015).
- 119 Bernstein, M. *et al.* Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* **11**, 503-519, doi:10.1634/theoncologist.11-5-503 (2006).
- 120 Widhe, B. & Widhe, T. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* **82**, 667-674 (2000).
- 121 Liebner, D. A. The indications and efficacy of conventional chemotherapy in primary and recurrent sarcoma. *J Surg Oncol* **111**, 622-631, doi:10.1002/jso.23866 (2015).
- 122 Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **25 Suppl 3**, iii113-123, doi:10.1093/annonc/mdu256 (2014).
- 123 Collins, D. H. Paget's disease of bone; incidence and subclinical forms. *Lancet* **271**, 51-57 (1956).
- 124 Keel, S. B., Jaffe, K. A., Petur Nielsen, G. & Rosenberg, A. E. Orthopaedic implant-related sarcoma: a study of twelve cases. *Mod Pathol* **14**, 969-977, doi:10.1038/modpathol.3880420 (2001).
- 125 Wadhwa, N. Osteosarcoma: Diagnostic dilemmas in histopathology and prognostic factors. *Indian J Orthop* **48**, 247-254, doi:10.4103/0019-5413.132497 (2014).
- 126 Chen, X. *et al.* Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Rep* **7**, 104-112, doi:10.1016/j.celrep.2014.03.003 (2014).
- 127 McBride, K. A. *et al.* Li-Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol* **11**, 260-271, doi:10.1038/nrclinonc.2014.41 (2014).
- 128 Mirabello, L. *et al.* Germline TP53 variants and susceptibility to osteosarcoma. *J Natl Cancer Inst* **107**, doi:10.1093/jnci/djv101 (2015).
- 129 Zhang, Y. *et al.* Different expression of alternative lengthening of telomere (ALT)-associated proteins/mRNAs in osteosarcoma cell lines. *Oncol Lett* **2**, 1327-1332, doi:10.3892/ol.2011.403 (2011).
- 130 Perry, J. A. *et al.* Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E5564-5573, doi:10.1073/pnas.1419260111 (2014).
- 131 Kovac, M. *et al.* Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nat Commun* **6**, 8940, doi:10.1038/ncomms9940 (2015).
- 132 Savage, S. A. *et al.* Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for osteosarcoma. *Nat Genet* **45**, 799-803, doi:10.1038/ng.2645 (2013).

- 133 Mirabello, L. *et al.* A Genome-Wide Scan Identifies Variants in NFIB Associated with Metastasis in Patients with Osteosarcoma. *Cancer Discov* **5**, 920-931, doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0125 (2015).
- 134 Hattinger, C. M. *et al.* Advances in emerging drugs for osteosarcoma. *Expert Opin Emerg Drugs* **20**, 495-514, doi:10.1517/14728214.2015.1051965 (2015).
- 135 Wang, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 430-440, doi:10.1038/nrm831 (2002).
- 136 Valcovici, M., Andrica, F., Serban, C. & Dragan, S. Cardiotoxicity of anthracycline therapy: current perspectives. *Arch Med Sci* **12**, 428-435, doi:10.5114/aoms.2016.59270 (2016).
- 137 Hayes, D. M. *et al.* High dose cis-platinum diammine dichloride: amelioration of renal toxicity by mannitol diuresis. *Cancer* **39**, 1372-1381 (1977).
- 138 Fan, X. L., Cai, G. P., Zhu, L. L. & Ding, G. M. Efficacy and safety of ifosfamide-based chemotherapy for osteosarcoma: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther* **9**, 5925-5932, doi:10.2147/DDDT.S91217 (2015).
- 139 Ajithkumar, T., Parkinson, C., Shamshad, F. & Murray, P. Ifosfamide encephalopathy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **19**, 108-114 (2007).
- 140 Ewing, J. The Classic: Diffuse endothelioma of bone. Proceedings of the New York Pathological Society. 1921;12:17. *Clin Orthop Relat Res* **450**, 25-27, doi:10.1097/01.blo.0000229311.36007.c7 (2006).
- 141 Taylor, M. *et al.* [Ewing's tumor]. *Arch Pediatr* **12**, 1383-1391, doi:10.1016/j.arcped.2005.05.014 (2005).
- 142 Kovar, H. *et al.* Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Oncogene* **5**, 1067-1070 (1990).
- 143 Qian, X. *et al.* Molecular diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by RT-PCR and fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* **14**, 23-28 (2005).
- 144 Riggi, N. *et al.* EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* **68**, 2176-2185, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1761 (2008).
- 145 Cavazzana, A. O., Miser, J. S., Jefferson, J. & Triche, T. J. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol* **127**, 507-518 (1987).
- 146 Staege, M. S. *et al.* DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* **64**, 8213-8221, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-4059 (2004).
- 147 Riggi, N. & Stamenkovic, I. The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* **254**, 1-10, doi:10.1016/j.canlet.2006.12.009 (2007).
- 148 Sankar, S. & Lessnick, S. L. Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma. *Cancer Genet* **204**, 351-365, doi:10.1016/j.cancergen.2011.07.008 (2011).
- 149 Aurias, A., Rimbaut, C., Buffe, D., Dubousset, J. & Mazabraud, A. [Translocation of chromosome 22 in Ewing's sarcoma]. *C R Seances Acad Sci III* **296**, 1105-1107 (1983).
- 150 Delattre, O. *et al.* The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* **331**, 294-299, doi:10.1056/NEJM199408043310503 (1994).
- 151 Lawrence, M. S. *et al.* Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* **505**, 495-501, doi:10.1038/nature12912 (2014).
- 152 Kovar, H. Downstream EWS/FLI1 upstream Ewing's sarcoma. *Genome Med* **2**, 8, doi:10.1186/gm129 (2010).
- 153 Thompson, A. D., Teitell, M. A., Arvand, A. & Denny, C. T. Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells. *Oncogene* **18**, 5506-5513, doi:10.1038/sj.onc.1202928 (1999).
- 154 Kauer, M. *et al.* A molecular function map of Ewing's sarcoma. *PLoS ONE* **4**, e5415, doi:10.1371/journal.pone.0005415 (2009).

- 155 Gonzalez, I., Vicent, S., de Alava, E. & Lecanda, F. EWS/FLI-1 oncoprotein subtypes impose different requirements for transformation and metastatic activity in a murine model. *J Mol Med (Berl)* **85**, 1015-1029, doi:10.1007/s00109-007-0202-5 (2007).
- 156 Zucman, J. *et al.* Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* **12**, 4481-4487 (1993).
- 157 Messahel, B., Hing, S., Nash, R., Jeffrey, I. & Pritchard-Jones, K. Clinical features of molecular pathology of solid tumours in childhood. *Lancet Oncol* **6**, 421-430, doi:10.1016/S1470-2045(05)70209-6 (2005).
- 158 Lin, P. P. *et al.* Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* **59**, 1428-1432 (1999).
- 159 May, W. A. *et al.* The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* **13**, 7393-7398 (1993).
- 160 Athanasiou, M. *et al.* Increased expression of the ETS-related transcription factor FLI-1/ERGB correlates with and can induce the megakaryocytic phenotype. *Cell Growth Differ* **7**, 1525-1534 (1996).
- 161 Ben-David, Y., Giddens, E. B. & Bernstein, A. Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1332-1336 (1990).
- 162 Scheiber, M. N. *et al.* FLI1 expression is correlated with breast cancer cellular growth, migration, and invasion and altered gene expression. *Neoplasia* **16**, 801-813, doi:10.1016/j.neo.2014.08.007 (2014).
- 163 Rao, V. N., Ohno, T., Prasad, D. D., Bhattacharya, G. & Reddy, E. S. Analysis of the DNAbinding and transcriptional activation functions of human Fli-1 protein. *Oncogene* **8**, 2167-2173 (1993).
- 164 Liang, H. *et al.* Solution structure of the ets domain of Fli-1 when bound to DNA. *Nat Struct Biol* **1**, 871-875 (1994).
- 165 Lesault, I., Quang, C. T., Frampton, J. & Ghysdael, J. Direct regulation of BCL-2 by FLI-1 is involved in the survival of FLI-1-transformed erythroblasts. *EMBO J* **21**, 694-703 (2002).
- 166 Truong, A. H., Cervi, D., Lee, J. & Ben-David, Y. Direct transcriptional regulation of MDM2 by Fli-1. *Oncogene* **24**, 962-969, doi:10.1038/sj.onc.1208323 (2005).
- 167 Arvand, A., Welford, S. M., Teitell, M. A. & Denny, C. T. The COOH-terminal domain of FLI-1 is necessary for full tumorigenesis and transcriptional modulation by EWS/FLI-1. *Cancer Res* **61**, 5311-5317 (2001).
- 168 Azuma, M., Embree, L. J., Sabaawy, H. & Hickstein, D. D. Ewing sarcoma protein ewsr1 maintains mitotic integrity and proneural cell survival in the zebrafish embryo. *PLoS ONE* **2**, e979, doi:10.1371/journal.pone.0000979 (2007).
- 169 Ohno, T. *et al.* The EWS gene, involved in Ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small round cell tumors, codes for an RNA binding protein with novel regulatory domains. *Oncogene* **9**, 3087-3097 (1994).
- 170 Lee, J., Rhee, B. K., Bae, G. Y., Han, Y. M. & Kim, J. Stimulation of Oct-4 activity by Ewing's sarcoma protein. *Stem Cells* **23**, 738-751, doi:10.1634/stemcells.2004-0375 (2005).
- 171 Rossow, K. L. & Janknecht, R. The Ewing's sarcoma gene product functions as a transcriptional activator. *Cancer Res* **61**, 2690-2695 (2001).
- 172 Zhang, D., Paley, A. J. & Childs, G. The transcriptional repressor ZFM1 interacts with and modulates the ability of EWS to activate transcription. *J Biol Chem* **273**, 18086-18091 (1998).
- 173 Garcia-Aragoncillo, E. *et al.* DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells. *Oncogene* **27**, 6034-6043, doi:10.1038/onc.2008.203 (2008).
- 174 Zwerner, J. P. *et al.* The EWS/FLI1 oncogenic transcription factor deregulates GLI1. *Oncogene* 27, 3282-3291, doi:10.1038/sj.onc.1210991 (2008).

- 175 Janknecht, R. EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene* **363**, 1-14, doi:10.1016/j.gene.2005.08.007 (2005).
- 176 Fuchs, B., Inwards, C. Y. & Janknecht, R. Upregulation of the matrix metalloproteinase-1 gene by the Ewing's sarcoma associated EWS-ER81 and EWS-Fli-1 oncoproteins, c-Jun and p300. *FEBS Lett* **553**, 104-108 (2003).
- 177 Christensen, L. *et al.* FOXM1 is an oncogenic mediator in Ewing Sarcoma. *PLoS ONE* **8**, e54556, doi:10.1371/journal.pone.0054556 (2013).
- 178 Nagano, A. *et al.* EWS/Fli-1 chimeric fusion gene upregulates vascular endothelial growth factor-A. *Int J Cancer* **126**, 2790-2798, doi:10.1002/ijc.24781 (2010).
- Yang, L., Hu, H. M., Zielinska-Kwiatkowska, A. & Chansky, H. A. FOXO1 is a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein in Ewing's sarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 402, 129-134, doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.129 (2010).
- 180 Mackintosh, C., Madoz-Gurpide, J., Ordonez, J. L., Osuna, D. & Herrero-Martin, D. The molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Cancer Biol Ther* **9**, 655-667 (2010).
- 181 Zhou, X. J. & Rahmani, R. Preclinical and clinical pharmacology of vinca alkaloids. *Drugs* **44 Suppl 4**, 1-16; discussion 66-19 (1992).
- 182 Lohani, N., Singh, H. N. & Moganty, R. R. Structural aspects of the interaction of anticancer drug Actinomycin-D to the GC rich region of hmgb1 gene. *Int J Biol Macromol* **87**, 433-442, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.060 (2016).
- 183 Jaffe, N., Paed, D., Traggis, D., Salian, S. & Cassady, J. R. Improved outlook for Ewing's sarcoma with combination chemotherapy (vincristine, actinomycin D and cyclophosphamide) and radiation therapy. *Cancer* **38**, 1925-1930 (1976).
- 184 Grier, H. E. *et al.* Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med* **348**, 694-701, doi:10.1056/NEJMoa020890 (2003).
- 185 Le Deley, M. C. *et al.* Cyclophosphamide compared with ifosfamide in consolidation treatment of standard-risk Ewing sarcoma: results of the randomized noninferiority Euro-EWING99-R1 trial. *J Clin Oncol* **32**, 2440-2448, doi:10.1200/JCO.2013.54.4833 (2014).
- 186 Levrero, M. *et al.* The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* **113 (Pt 10)**, 1661-1670 (2000).
- 187 Nicolai, S. *et al.* DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging (Albany NY)* **7**, 1050-1065, doi:10.18632/aging.100858 (2015).
- 188 Tomkova, K., Tomka, M. & Zajac, V. Contribution of p53, p63, and p73 to the developmental diseases and cancer. *Neoplasma* **55**, 177-181 (2008).
- 189 Yang, A. *et al.* p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714-718, doi:10.1038/19539 (1999).
- 190 Han, S. *et al.* Infrequent somatic mutations of the p73 gene in various human cancers. *Eur J Surg Oncol* **25**, 194-198, doi:10.1053/ejso.1998.0626 (1999).
- 191 Kaghad, M. *et al.* Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**, 809-819 (1997).
- 192 Yang, A. *et al.* p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**, 99-103, doi:10.1038/35003607 (2000).
- 193 Murray-Zmijewski, F., Lane, D. P. & Bourdon, J. C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* **13**, 962-972, doi:10.1038/sj.cdd.4401914 (2006).
- 194 Fontemaggi, G. *et al.* Identification of direct p73 target genes combining DNA microarray and chromatin immunoprecipitation analyses. *J Biol Chem* **277**, 43359-43368, doi:10.1074/jbc.M205573200 (2002).
- 195 Zaika, A. I. *et al.* DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is upregulated in human tumors. *J Exp Med* **196**, 765-780 (2002).
- 196 Moll, U. M. The Role of p63 and p73 in tumor formation and progression: coming of age toward clinical usefulness. Commentary re: F. Koga et al., Impaired p63 expression associates

with poor prognosis and uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder. Clin. Cancer Res., 9: 5501-5507, 2003, and P. Puig et al., p73 Expression in human normal and tumor tissues: loss of p73alpha expression is associated with tumor progression in bladder Cancer. Clin. Cancer Res., 9: 5642-5651, 2003. *Clin Cancer Res* **9**, 5437-5441 (2003).

- 197 Luh, L. M. *et al.* Analysis of the oligomeric state and transactivation potential of TAp73alpha. *Cell Death Differ* **20**, 1008-1016, doi:10.1038/cdd.2013.23 (2013).
- 198 Yang, A. *et al.* p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* **2**, 305-316 (1998).
- 199 Serber, Z. *et al.* A C-terminal inhibitory domain controls the activity of p63 by an intramolecular mechanism. *Mol Cell Biol* **22**, 8601-8611 (2002).
- 200 Chi, S. W., Ayed, A. & Arrowsmith, C. H. Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *EMBO J* **18**, 4438-4445, doi:10.1093/emboj/18.16.4438 (1999).
- 201 Hibi, K. *et al.* AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5462-5467 (2000).
- Rocco, J. W., Leong, C. O., Kuperwasser, N., DeYoung, M. P. & Ellisen, L. W. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 9, 45-56, doi:10.1016/j.ccr.2005.12.013 (2006).
- 203 Ory, B. *et al.* A microRNA-dependent program controls p53-independent survival and chemosensitivity in human and murine squamous cell carcinoma. *J Clin Invest* **121**, 809-820, doi:10.1172/JCI43897 (2011).
- 204 Filippakopoulos, P. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* **468**, 1067-1073, doi:10.1038/nature09504 (2010).
- 205 Delmore, J. E. *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* **146**, 904-917, doi:10.1016/j.cell.2011.08.017 (2011).
- 206 Qiu, H. *et al.* JQ1 suppresses tumor growth through downregulating LDHA in ovarian cancer. *Oncotarget* **6**, 6915-6930, doi:10.18632/oncotarget.3126 (2015).
- 207 da Motta, L. L. *et al.* The BET inhibitor JQ1 selectively impairs tumour response to hypoxia and downregulates CA9 and angiogenesis in triple negative breast cancer. *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2016.184 (2016).
- 208 Xie, X., Ye, Z., Yang, D. & Tao, H. Effects of combined c-myc and Bmi-1 siRNAs on the growth and chemosensitivity of MG-63 osteosarcoma cells. *Mol Med Rep* **8**, 168-172, doi:10.3892/mmr.2013.1484 (2013).
- 209 Han, G., Wang, Y. & Bi, W. C-Myc overexpression promotes osteosarcoma cell invasion via activation of MEK-ERK pathway. *Oncol Res* **20**, 149-156 (2012).
- 210 Alghamdi, S. *et al.* BET protein inhibitor JQ1 inhibits growth and modulates WNT signaling in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* **7**, 22, doi:10.1186/s13287-016-0278-3 (2016).
- 211 Rao, P. H. *et al.* Coamplification of Myc/Pvt1 and homozygous deletion of Nlrp1 locus are frequent genetics changes in mouse osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* **54**, 796-808, doi:10.1002/gcc.22291 (2015).
- Li, N. et al. RUNX2 and Osteosarcoma. Anticancer Agents Med Chem 15, 881-887 (2015).
- 213 Hu, K. *et al.* Targeting the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C)- bromodomain containing 7 (BRD7) pathway for human osteosarcoma. *Oncotarget* **5**, 3088-3100, doi:10.18632/oncotarget.1816 (2014).
- 214 Xue, Z. *et al.* Up-Regulation of MiR-300 Promotes Proliferation and Invasion of Osteosarcoma by Targeting BRD7. *PLoS ONE* **10**, e0127682, doi:10.1371/journal.pone.0127682 (2015).
- 215 Baker, E. K. *et al.* BET inhibitors induce apoptosis through a MYC independent mechanism and synergise with CDK inhibitors to kill osteosarcoma cells. *Sci Rep* **5**, 10120, doi:10.1038/srep10120 (2015).
- 216 Lee, D. H. *et al.* Synergistic effect of JQ1 and rapamycin for treatment of human osteosarcoma. *Int J Cancer* **136**, 2055-2064, doi:10.1002/ijc.29269 (2015).

- 217 Meng, S. *et al.* BET Inhibitor JQ1 Blocks Inflammation and Bone Destruction. *J Dent Res* **93**, 657-662, doi:10.1177/0022034514534261 (2014).
- Loven, J. *et al.* Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* 153, 320-334, doi:10.1016/j.cell.2013.03.036 (2013).
- 219 Esiashvili, N., Goodman, M. & Marcus, R. B., Jr. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol* **30**, 425-430, doi:10.1097/MPH.0b013e31816e22f3 (2008).
- 220 Hensel, T. *et al.* Targeting the EWS-ETS transcriptional program by BET bromodomain inhibition in Ewing sarcoma. *Oncotarget* **7**, 1451-1463, doi:10.18632/oncotarget.6385 (2016).
- 221 Loganathan, S. N. *et al.* BET bromodomain inhibitors suppress EWS-FLI1-dependent transcription and the IGF1 autocrine mechanism in Ewing sarcoma. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.9762 (2016).
- 222 Bid, H. K. *et al.* The Bromodomain BET Inhibitor JQ1 Suppresses Tumor Angiogenesis in Models of Childhood Sarcoma. *Mol Cancer Ther* **15**, 1018-1028, doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0567 (2016).
- 223 Celia-Terrassa, T. & Kang, Y. Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes Dev* **30**, 892-908, doi:10.1101/gad.277681.116 (2016).
- 224 Zheng, H. & Kang, Y. Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene* **33**, 1755-1763, doi:10.1038/onc.2013.128 (2014).
- 225 Edge, S. B. & Compton, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* **17**, 1471-1474, doi:10.1245/s10434-010-0985-4 (2010).
- 226 Pastan, I. & Gottesman, M. Multiple-drug resistance in human cancer. *N Engl J Med* **316**, 1388-1393, doi:10.1056/NEJM198705283162207 (1987).
- 227 Richard, V., Nair, M. G., Santhosh Kumar, T. R. & Pillai, M. R. Side population cells as prototype of chemoresistant, tumor-initiating cells. *Biomed Res Int* **2013**, 517237, doi:10.1155/2013/517237 (2013).
- 228 Kopczynska, E. Role of microRNAs in the resistance of prostate cancer to docetaxel and paclitaxel. *Contemp Oncol (Pozn)* **19**, 423-427, doi:10.5114/wo.2015.56648 (2015).
- Jing, P., Zou, J., Zhang, J. & Jiang, X. DeltaNp63 promotes UMUC3 cell invasiveness and migration through claudin1 in vitro. *Mol Med Rep* 7, 1026-1030, doi:10.3892/mmr.2013.1271 (2013).
- 230 Boldrup, L., Coates, P. J., Gu, X. & Nylander, K. DeltaNp63 isoforms regulate CD44 and keratins 4, 6, 14 and 19 in squamous cell carcinoma of head and neck. *J Pathol* **213**, 384-391, doi:10.1002/path.2237 (2007).
- 231 Chen, J. *et al.* The up-regulation of cysteine-rich protein 61 induced by transforming growth factor beta enhances osteosarcoma cell migration. *Mol Cell Biochem* **384**, 269-277, doi:10.1007/s11010-013-1807-3 (2013).
- 232 Portela, R. F. *et al.* Pro-tumorigenic effects of transforming growth factor beta 1 in canine osteosarcoma. *J Vet Intern Med* **28**, 894-904, doi:10.1111/jvim.12348 (2014).
- 233 Ichikawa, T., Suenaga, Y., Koda, T., Ozaki, T. & Nakagawara, A. DeltaNp63/BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 994-1000, doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.128 (2008).
- 234 Bornachea, O. *et al.* The downregulation of DeltaNp63 in p53-deficient mouse epidermal tumors favors metastatic behavior. *Oncotarget* **6**, 24230-24245, doi:10.18632/oncotarget.4353 (2015).
- 235 Cam, M. *et al.* DeltaNp63 mediates cellular survival and metastasis in canine osteosarcoma. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.10406 (2016).
- 236 Bid, H. K. *et al.* DeltaNp63 promotes pediatric neuroblastoma and osteosarcoma by regulating tumor angiogenesis. *Cancer Res* **74**, 320-329, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0894 (2014).

- 237 Ram Kumar, R. M., Betz, M. M., Robl, B., Born, W. & Fuchs, B. DeltaNp63alpha enhances the oncogenic phenotype of osteosarcoma cells by inducing the expression of GLI2. *BMC Cancer* 14, 559, doi:10.1186/1471-2407-14-559 (2014).
- 238 Rosenfeldt, H. M. *et al.* Sphingosine-1-phosphate stimulates contraction of human airway smooth muscle cells. *FASEB J* **17**, 1789-1799, doi:10.1096/fj.02-0836com (2003).
- 239 Lena, A. M. *et al.* miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ* **15**, 1187-1195, doi:10.1038/cdd.2008.69 (2008).
- 240 Yuan, Y. *et al.* MicroRNA-203 inhibits cell proliferation by repressing DeltaNp63 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* **11**, 57, doi:10.1186/1471-2407-11-57 (2011).
- 241 Liang, S. *et al.* MicroRNA-140 regulates cell growth and invasion in pancreatic duct adenocarcinoma by targeting iASPP. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **48**, 174-181, doi:10.1093/abbs/gmv127 (2016).
- 242 Kim, K. H. *et al.* DeltaNp63 intronic miR-944 is implicated in the DeltaNp63-mediated induction of epidermal differentiation. *Nucleic Acids Res* **43**, 7462-7479, doi:10.1093/nar/gkv735 (2015).
- 243 Puppo, M. *et al.* miRNA-Mediated KHSRP Silencing Rewires Distinct Post-transcriptional Programs during TGF-beta-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Rep*, doi:10.1016/j.celrep.2016.06.055 (2016).
- 244 Ferracini, R. *et al.* The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* **10**, 739-749 (1995).
- 245 Entz-Werle, N. *et al.* Involvement of MET/TWIST/APC combination or the potential role of ossification factors in pediatric high-grade osteosarcoma oncogenesis. *Neoplasia* **9**, 678-688 (2007).
- 246 Fleuren, E. D. *et al.* Expression and clinical relevance of MET and ALK in Ewing sarcomas. *Int J Cancer* **133**, 427-436, doi:10.1002/ijc.28047 (2013).
- 247 Patane, S. *et al.* MET overexpression turns human primary osteoblasts into osteosarcomas. *Cancer Res* **66**, 4750-4757, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4422 (2006).
- 248 De Maria, R. *et al.* met oncogene activation qualifies spontaneous canine osteosarcoma as a suitable pre-clinical model of human osteosarcoma. *J Pathol* **218**, 399-408, doi:10.1002/path.2549 (2009).
- 249 Fieten, H. *et al.* Expression of hepatocyte growth factor and the proto-oncogenic receptor c-Met in canine osteosarcoma. *Vet Pathol* **46**, 869-877, doi:10.1354/vp.08-VP-0155-F-FL (2009).
- 250 Xin, M. *et al.* miR-22 inhibits tumor growth and metastasis by targeting ATP citrate lyase: evidence in osteosarcoma, prostate cancer, cervical cancer and lung cancer. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.10020 (2016).
- 251 Berlanga, P. *et al.* miR-200c and phospho-AKT as prognostic factors and mediators of osteosarcoma progression and lung metastasis. *Mol Oncol*, doi:10.1016/j.molonc.2016.04.004 (2016).
- 252 Chen, J. *et al.* MicroRNA-130a promotes the metastasis and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma by targeting PTEN. *Oncol Rep* **35**, 3285-3292, doi:10.3892/or.2016.4719 (2016).
- 253 Qu, F. *et al.* MicroRNA-26a induces osteosarcoma cell growth and metastasis via the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncol Lett* **11**, 1592-1596, doi:10.3892/ol.2015.4073 (2016).
- 254 Tian, X. & Zhang, X. A Single Nucleotide Polymorphism (rs1056629) in 3'-UTR of MMP-9 is Responsible for a Decreased Risk of Metastatic Osteosarcoma by Compromising its Interaction with microRNA-491-5p. *Cell Physiol Biochem* **38**, 1415-1424, doi:10.1159/000443084 (2016).
- 255 Yan, K. *et al.* MicroRNA-34a inhibits the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells both in vitro and in vivo. *PLoS ONE* **7**, e33778, doi:10.1371/journal.pone.0033778 (2012).

- 256 Tan, S., Li, R., Ding, K., Lobie, P. E. & Zhu, T. miR-198 inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting the HGF/c-MET pathway. *FEBS Lett* **585**, 2229-2234, doi:10.1016/j.febslet.2011.05.042 (2011).
- 257 Wang, M. *et al.* MiR-198 represses tumor growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fucosyl transferase 8. *Sci Rep* **4**, 6145, doi:10.1038/srep06145 (2014).
- 258 Zhang, S., Zhao, Y. & Wang, L. MicroRNA-198 inhibited tumorous behaviors of human osteosarcoma through directly targeting ROCK1. *Biochem Biophys Res Commun* **472**, 557-565, doi:10.1016/j.bbrc.2016.03.040 (2016).
- 259 Yin, K. *et al.* MiR-206 suppresses epithelial mesenchymal transition by targeting TGF-beta signaling in estrogen receptor positive breast cancer cells. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.8233 (2016).
- Chen, Q. Y. *et al.* MiR-206 inhibits HGF-induced epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in non-small cell lung cancer via c-Met /PI3k/ Akt/mTOR pathway. *Oncotarget* 7, 18247-18261, doi:10.18632/oncotarget.7570 (2016).
- 261 Bao, Y. P. *et al.* Roles of microRNA-206 in osteosarcoma pathogenesis and progression. *Asian Pac J Cancer Prev* **14**, 3751-3755 (2013).
- 262 Zhang, C., Yao, C., Li, H., Wang, G. & He, X. Serum levels of microRNA-133b and microRNA-206 expression predict prognosis in patients with osteosarcoma. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 4194-4203 (2014).
- Zhao, H. *et al.* MiR-133b is down-regulated in human osteosarcoma and inhibits osteosarcoma cells proliferation, migration and invasion, and promotes apoptosis. *PLoS ONE* 8, e83571, doi:10.1371/journal.pone.0083571 (2013).
- 264 Cantiani, L. *et al.* Caveolin-1 reduces osteosarcoma metastases by inhibiting c-Src activity and met signaling. *Cancer Res* **67**, 7675-7685, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4697 (2007).
- 265 Sampson, E. R. *et al.* The orally bioavailable met inhibitor PF-2341066 inhibits osteosarcoma growth and osteolysis/matrix production in a xenograft model. *J Bone Miner Res* **26**, 1283-1294, doi:10.1002/jbmr.336 (2011).
- 266 Wang, K., Zhuang, Y., Liu, C. & Li, Y. Inhibition of c-Met activation sensitizes osteosarcoma cells to cisplatin via suppression of the PI3K-Akt signaling. *Arch Biochem Biophys* **526**, 38-43, doi:10.1016/j.abb.2012.07.003 (2012).
- 267 Tsunashima, Y., Kondo, A., Matsuda, T. & Togari, A. Hydrocortisone inhibits cellular proliferation by downregulating hepatocyte growth factor synthesis in human osteoblasts. *Biol Pharm Bull* **34**, 700-703 (2011).
- 268 Liu, K., Zhuang, X. & Mai, Z. p73 expression is associated with cellular chemosensitivity in human non-small cell lung cancer cell lines. *Oncol Lett* **5**, 583-587, doi:10.3892/ol.2012.1035 (2013).
- 269 Gong, J. G. *et al.* The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatininduced DNA damage. *Nature* **399**, 806-809, doi:10.1038/21690 (1999).
- 270 Pediconi, N. *et al.* Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **5**, 552-558, doi:10.1038/ncb998 (2003).
- 271 Irwin, M. S. *et al.* Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* **3**, 403-410 (2003).
- 272 Papoutsaki, M. *et al.* The p73 gene is an anti-tumoral target of the RARbeta/gamma-selective retinoid tazarotene. *J Invest Dermatol* **123**, 1162-1168, doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23498.x (2004).
- 273 Zoric, A., Horvat, A. & Slade, N. Differential effects of diverse p53 isoforms on TAp73 transcriptional activity and apoptosis. *Carcinogenesis* **34**, 522-529, doi:10.1093/carcin/bgs370 (2013).
- 274 Cancino, G. I. *et al.* STI571 prevents apoptosis, tau phosphorylation and behavioural impairments induced by Alzheimer's beta-amyloid deposits. *Brain* **131**, 2425-2442, doi:10.1093/brain/awn125 (2008).
- 275 Hu, Z. B. *et al.* PLK2 phosphorylates and inhibits enriched TAp73 in human osteosarcoma cells. *Cancer Med* **5**, 74-87, doi:10.1002/cam4.558 (2016).

- 276 Oh, Y. K. *et al.* Role of activating transcription factor 3 on TAp73 stability and apoptosis in paclitaxel-treated cervical cancer cells. *Mol Cancer Res* **6**, 1232-1249, doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0297 (2008).
- 277 Munarriz, E. *et al.* Calpain cleavage regulates the protein stability of p73. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 954-960, doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.188 (2005).
- 278 Fan, D. G. *et al.* Silencing of calpain expression reduces the metastatic potential of human osteosarcoma cells. *Cell Biol Int* **33**, 1263-1267, doi:10.1016/j.cellbi.2009.08.014 (2009).
- 279 Marion, A. *et al.* Calpain-6 is an endothelin-1 signaling dependent protective factor in chemoresistant osteosarcoma. *Int J Cancer* **130**, 2514-2525, doi:10.1002/ijc.26246 (2012).
- 280 Muller, M. *et al.* TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ* **12**, 1564-1577, doi:10.1038/sj.cdd.4401774 (2005).
- 281 Koeppel, M. *et al.* Crosstalk between c-Jun and TAp73alpha/beta contributes to the apoptosis-survival balance. *Nucleic Acids Res* **39**, 6069-6085, doi:10.1093/nar/gkr028 (2011).
- 282 Wang, W. *et al.* MicroRNA profiling of follicular lymphoma identifies microRNAs related to cell proliferation and tumor response. *Haematologica* **97**, 586-594, doi:10.3324/haematol.2011.048132 (2012).
- 283 Eriksen, A. H. *et al.* MicroRNA Expression Profiling to Identify and Validate Reference Genes for the Relative Quantification of microRNA in Rectal Cancer. *PLoS ONE* **11**, e0150593, doi:10.1371/journal.pone.0150593 (2016).
- 284 Gougelet, A. *et al.* Micro-RNA profiles in osteosarcoma as a predictive tool for ifosfamide response. *Int J Cancer* **129**, 680-690, doi:10.1002/ijc.25715 (2011).
- 285 Lin, C. H. *et al.* MiR-193a-5p/ERBB2 act as concurrent chemoradiation therapy response indicator of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.9444 (2016).
- 286 Yang, Y. *et al.* A novel miR-193a-5p-YY1-APC regulatory axis in human endometrioid endometrial adenocarcinoma. *Oncogene* **32**, 3432-3442, doi:10.1038/onc.2012.360 (2013).
- Tsai, K. W. *et al.* Arm Selection Preference of MicroRNA-193a Varies in Breast Cancer. *Sci Rep* 6, 28176, doi:10.1038/srep28176 (2016).
- 288 Pu, Y. *et al.* MiR-193a-3p and miR-193a-5p suppress the metastasis of human osteosarcoma cells by down-regulating Rab27B and SRR, respectively. *Clin Exp Metastasis* **33**, 359-372, doi:10.1007/s10585-016-9783-0 (2016).
- 289 Lamoureux, F. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomain epigenetic signalling interferes with the bone-associated tumour vicious cycle. *Nat Commun* **5**, 3511, doi:10.1038/ncomms4511 (2014).
- 290 Jacques, C. *et al.* Targeting the epigenetic readers in Ewing Sarcoma inhibits the oncogenic transcription factor EWS/Fli1. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.8214 (2016).
- 291 Xu, Z. *et al.* BET inhibition represses miR17-92 to drive BIM-initiated apoptosis of normal and transformed hematopoietic cells. *Leukemia* **30**, 1531-1541, doi:10.1038/leu.2016.52 (2016).
- 292 Zhao, X. *et al.* Disruption of the MYC-miRNA-EZH2 loop to suppress aggressive B-cell lymphoma survival and clonogenicity. *Leukemia* **27**, 2341-2350, doi:10.1038/leu.2013.94 (2013).
- 293 Kumar, K. *et al.* GLI2-dependent c-MYC upregulation mediates resistance of pancreatic cancer cells to the BET bromodomain inhibitor JQ1. *Sci Rep* **5**, 9489, doi:10.1038/srep09489 (2015).
- 294 Rathert, P. *et al.* Transcriptional plasticity promotes primary and acquired resistance to BET inhibition. *Nature* **525**, 543-547, doi:10.1038/nature14898 (2015).
- 295 Shu, S. *et al.* Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer. *Nature* **529**, 413-417, doi:10.1038/nature16508 (2016).
- 296 Kurimchak, A. M. *et al.* Resistance to BET Bromodomain Inhibitors Is Mediated by Kinome Reprogramming in Ovarian Cancer. *Cell Rep*, doi:10.1016/j.celrep.2016.06.091 (2016).

- 297 Miyamoto, K. *et al.* Tumour-suppressive miRNA-26a-5p and miR-26b-5p inhibit cell aggressiveness by regulating PLOD2 in bladder cancer. *Br J Cancer*, doi:10.1038/bjc.2016.179 (2016).
- 298 Kozubek, J. *et al.* In-depth characterization of microRNA transcriptome in melanoma. *PLoS ONE* **8**, e72699, doi:10.1371/journal.pone.0072699 (2013).
- 299 Wu, T. *et al.* Huaier suppresses proliferation and induces apoptosis in human pulmonary cancer cells via upregulation of miR-26b-5p. *FEBS Lett* **588**, 2107-2114, doi:10.1016/j.febslet.2014.04.044 (2014).
- 300 Wang, Y. *et al.* Twist1-related miR-26b-5p suppresses epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion by targeting SMAD1 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.8328 (2016).
- 301 Wang, Y. *et al.* Regulation of proliferation, angiogenesis and apoptosis in hepatocellular carcinoma by miR-26b-5p. *Tumour Biol*, doi:10.1007/s13277-016-4964-7 (2016).
- 302 Ovchinnikova, E. S. *et al.* Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail* **18**, 414-423, doi:10.1002/ejhf.332 (2016).
- 303 Aguado-Fraile, E. *et al.* A Pilot Study Identifying a Set of microRNAs As Precise Diagnostic Biomarkers of Acute Kidney Injury. *PLoS ONE* **10**, e0127175, doi:10.1371/journal.pone.0127175 (2015).
- 304 Tan, Y. *et al.* Serum microRNAs as potential biomarkers of primary biliary cirrhosis. *PLoS ONE* **9**, e111424, doi:10.1371/journal.pone.0111424 (2014).
- 305 Ertekin, S. *et al.* Evaluation of circulating miRNAs in wet age-related macular degeneration. *Mol Vis* **20**, 1057-1066 (2014).
- Liu, Y. *et al.* Overexpression of miR-26b-5p regulates the cell cycle by targeting CCND2 in GC-2 cells under exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. *Cell Cycle* 15, 357-367, doi:10.1080/15384101.2015.1120924 (2016).
- 307 Capobianco, E. *et al.* Separate and combined effects of DNMT and HDAC inhibitors in treating human multi-drug resistant osteosarcoma HosDXR150 cell line. *PLoS ONE* **9**, e95596, doi:10.1371/journal.pone.0095596 (2014).
- 308 Fiskus, W. *et al.* BET protein antagonist JQ1 is synergistically lethal with FLT3 tyrosine kinase inhibitor (TKI) and overcomes resistance to FLT3-TKI in AML cells expressing FLT-ITD. *Mol Cancer Ther* **13**, 2315-2327, doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0258 (2014).
- 309 Winter, G. E. *et al.* DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science* **348**, 1376-1381, doi:10.1126/science.aab1433 (2015).
- 310 Zengerle, M., Chan, K. H. & Ciulli, A. Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. *ACS Chem Biol* **10**, 1770-1777, doi:10.1021/acschembio.5b00216 (2015).
- 311 Martin, M. P., Olesen, S. H., Georg, G. I. & Schonbrunn, E. Cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib interacts with the acetyl-lysine recognition site of bromodomains. *ACS Chem Biol* **8**, 2360-2365, doi:10.1021/cb4003283 (2013).
- 312 Zhang, G. *et al.* Structure-guided design of potent diazobenzene inhibitors for the BET bromodomains. *J Med Chem* **56**, 9251-9264, doi:10.1021/jm401334s (2013).
- 313 Picaud, S. *et al.* RVX-208, an inhibitor of BET transcriptional regulators with selectivity for the second bromodomain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 19754-19759, doi:10.1073/pnas.1310658110 (2013).
- Li, Z. & Rana, T. M. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 622-638, doi:10.1038/nrd4359 (2014).
- 315 Ebert, M. S., Neilson, J. R. & Sharp, P. A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* **4**, 721-726, doi:10.1038/nmeth1079 (2007).
- 316 Ebert, M. S. & Sharp, P. A. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA* **16**, 2043-2050, doi:10.1261/rna.2414110 (2010).
- 317 Gumireddy, K. *et al.* Small-molecule inhibitors of microrna miR-21 function. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**, 7482-7484, doi:10.1002/anie.200801555 (2008).

318 Lennox, K. A., Owczarzy, R., Thomas, D. M., Walder, J. A. & Behlke, M. A. Improved Performance of Anti-miRNA Oligonucleotides Using a Novel Non-Nucleotide Modifier. *Mol Ther Nucleic Acids* **2**, e117, doi:10.1038/mtna.2013.46 (2013).





Thèse de Doctorat

Camille JACQUES

Mécanismes Epigénétiques associés à la Progression et à la Chimiorésistance des Sarcomes Osseux

Epigenetic of Primary Bone Tumors' Progression and Chemoresistance

<u>Résumé</u>

L'épigénétique caractérise l'ensemble des mécanismes permettant de réguler l'expression des gènes, indépendamment de toute mutation de leur séquence ADN. Les processus qui l'orchestrent sont nombreux et mettent en jeu divers facteurs aux fonctions et propriétés bien particulières, tels que les protéines à BET Bromodomaines ou les microARNs (miARNs). A l'heure actuelle, le rôle de ces composants n'est pas encore complètement élucidé et demeure toujours un des enjeux majeurs de la Recherche en Cancérologie, de tels régulateurs pouvant être employés comme biomarqueurs ou comme nouvelles cibles thérapeutiques innovantes. Ceci est particulièrement vrai dans le cadre des Sarcomes Osseux, dans lesquels peu d'alternatives cliniques sont disponibles du fait de l'agressivité et de la rareté de ces pathologies. Dans une première partie, cette thèse traite ainsi de l'implication des protéines à BET Bromodomaines, une sous-famille de protéines épigénétiques, dans le développement tumoral du Sarcome d'Ewing. La seconde partie de ce travail de thèse s'attache, quant à elle, à mieux définir comment les miARNs peuvent être impliqués dans l'échappement tumoral des Sarcomes Osseux et plus particulièrement dans les phénomènes de dissémination métastatique et de chimiorésistance. La troisième partie de ce travail relie finalement les deux grandes parties précédentes, en s'inscrivant dans une démarche d'ouverture et de perspectives sur la relation entre les miARNs et la chimiorésistance aux inhibiteurs de BET Bromodomaines.

Mots clés

Ostéosarcome; Sarcome d'Ewing; Epigénétique; microARNs; BET Bromodomaines; Dissémination Métastatique; Chimiorésistance; p53

<u>Abstract</u>

Epigenetic is a very recently defined notion, characterizing all the mechanisms which contribute to the gene-expression's regulation, independently of the cell's DNA sequence. Several processes implicating plethora of factors such as the BET Bromodomains Proteins or the small non-coding microRNAs (miRNAs) orchestrate the epigenetic regulations. Nowadays, the precise role of these factors is not fully understood and a better delineation of their functions remains a main issue in the Cancerology field. Such regulators could indeed be used as biomarkers or as new original therapeutic targets, especially in the rare and aggressive Bone Sarcomas, in which few therapeutic options are available. In a first part, this thesis will focus on the epigenetic-related family of proteins, the BET Bromodomains Proteins' implication in the tumorigenicity of the Ewing Sarcoma. The second part of this work aims to define how the miRNAs could be implicated in the Bone Sarcoma's escape, through both the metastatic spreading and the chemoresistance processes. The last part of this manuscript finally connects the two first ones and aims to highlight some perspectives about the relationship between miRNAs and the recently described BET Bromodomains' inhibitors' chemoresistance.

Key Words

Osteosarcoma; Ewing Sarcoma; Epigenetic; microRNAs; BET Bromodomains; Metastatic Dissemination; Chemoresistance; p53