

Thèse de Doctorat

Romain GUIHO

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du **grade de Docteur de l'Université de Nantes** sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

Ecole doctorale : BS Biologie-Santé

Discipline : Biologie cellulaire

Spécialité : Cancérologie

Unité de recherche :

Laboratoire de Physiopathologie de
la Résorption Osseuse et Thérapie
des Tumeurs Osseuses Primitives –
INSERM UMR957

Soutenue le 16 octobre 2015

Thèse N° :

THERAPIES IMPLIQUANT LA VOIE DE TRAIL DANS LES TUMEURS OSSEUSES PEDIATRIQUES

MECANISMES DE RESISTANCE ET APPROCHES
PRECLINIQUES POUR UNE (RE-)SENSIBILISATION

JURY

Rapporteurs : **Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL**, Directeur de Recherche, Université de Rennes 1 - EA SeRAIC 4427
Heidy SCHMID-ANTOMARCHI, Directeur de Recherche, Université de Nice - IBV CNRS 7277 INSERM 1091

Examineurs : **Catherine PELLAT-DECEUNYNCK**, Directeur de Recherche, Université de Nantes - INSERM 892
Olivier MICHEAU, Chargé de Recherche, Université de Bourgogne - INSERM UMR866

Directeur de Thèse : **Françoise REDINI**, Directeur de Recherche, Université de Nantes – LPRO – INSERM UMR957

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier

de l'association **l'Etoile de Martin**



www.letoiiledemartin.org

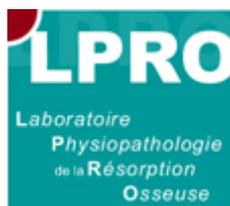
Au sein du

**Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse
et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives**

INSERM UMR957

Faculté de Médecine - 1, rue Gaston Veil

44 035 Nantes



Remerciements

Comme prélude à ce manuscrit de thèse, je tiens à remercier particulièrement :

Françoise REDINI pour m'avoir encadré au cours de ces années passées au laboratoire, ce fut un plaisir de réaliser une thèse dans de si bonnes conditions. Merci pour sa confiance, sa disponibilité et sa bienveillance qui font d'elle la directrice de thèse rêvée.

Dominique HEYMANN pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL et **Heidy SCHMID-ANTOMARCHI** qui ont accepté d'être rapporteur de ces travaux de thèse.

Catherine PELLAT-DECEUNYNCK et **Olivier MICHEAU** pour les discussions constructives que nous avons pu avoir lors des comités de suivi de thèse et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci également à **tous les membres du laboratoire**, qu'ils fassent partie des murs ou qu'ils ne soient de passage que pour quelques semaines ou quelques mois. En premier lieu, je remercie chaleureusement ceux qui ont participé au plus près à ces travaux de thèse :

Julien, lister tout ce pourquoi je voudrais te remercier prendrait plus de temps qu'il ne t'en faut pour remplir une plaque de PCR. Merci pour tous ces moments partagés à la paillasse, sur une table de bar ou dans un lit à l'île aux Moines. Dans le désordre, je pense à ces innombrables citations de Perceval ou Léodagan en attendant que les souris s'endorment, à ces discussions autour d'une tasse de thé ou d'un Martini (je pense que toi tu avais plutôt une chope de bière devant toi...) quand elles ne tournaient

pas autour du foot ou de la dernière défaite de Gasquet, à ton superbe mariage mayennais, au moment où tu es revenu en disant « J'ai pissé à côté de Jean Rochefort », à la concentration extrême en enregistrant les voix off des meilleures vidéos de thèse jamais réalisées, à nos projets à venir esquissés autour du microscanner, à notre amitié.

Kevin, pour m'avoir remis du cœur à l'ouvrage, pour ton dynamisme et la rigueur scientifique dont tu nous fais profiter. Merci surtout pour toutes les blagues un peu foireuses, tous les calambours constamment débiles mais toujours inattendus, toutes les réflexions faites avec ce petit sourire qui te va si bien. Désormais, je ne pourrais plus prononcer Zol sans l'accent allemand, ni ne pourrais voir une perruque blonde sans penser à ton talent devant la caméra. Ton aide et ton soutien ont été indispensables à mes deux dernières années de thèse.

Malika, tout d'abord pour avoir supporté sans trop broncher mon humour ravageur, toutes mes excuses ! Merci pour ta patience quand les impératifs de ma thèse (ou de mon sommeil...) me retenaient loin du labo, pour ton autonomie signe de la débrouillardise dont tu sais faire preuve, pour ta persévérance quand tout semble voué à l'échec et pour ton sens de la répartie. De ce dernier point, tu devrais donner quelques cours à Régis... Bonne chance pour la suite, je sais que tu réussiras ce que tu entreprendras. Je suis ravi d'avoir eu à travailler à tes côtés et fier d'avoir achevé ces remerciements sans avoir fait de propositions indécentes.

Audrey G., j'espère que tu te souviendras longtemps que peu importe les déboires, il y a toujours une solution, il y a toujours un stratagème pour sauver la situation et résoudre le problème. Merci pour ton optimisme et ton énergie positive. Je n'ai jamais honoré ton invitation à inverser les rôles et venir en stage dans le service de pédiatrie, mais je sais que ta gentillesse et ton professionnalisme font de toi un médecin idéal. Depuis ton passage au labo, je ne peux écouter *Visage Pâle rencontrer Public* sans penser à ta maîtrise de l'intro de *Petite*.

Merci à **Hélios** pour ces bons moments partagés. Dans notre métier, il est vital de se remettre en question et tu as magnifiquement joué le rôle de l'empêcheur de tourner en rond. J'espère avoir pu te transmettre quelques clefs pour comprendre la recherche. Tu as mon numéro si tu décides un jour de te lancer dans la brocante, je répondrais présent.

Merci à mes nombreuses stagiaires pour leurs qualités humaines et leurs compétences techniques. J'espère leur avoir transmis autant qu'elles m'ont appris : **Anne-Laure, Chloé, Emeline, Audrey, Oriane, ...**

Merci à tous ceux qui détiennent les clefs des savoir-faire techniques et logistiques indispensables à la réalisation de ces trois années de thèse,

Merci à toi **Régis**, tu as un don inestimable pour accueillir les nouveaux et prendre soin des anciens, un grand homme a écrit un jour que tu es le vendéen le plus serviable de la région ligérienne, ce n'est guère exagéré. Merci pour m'avoir poussé à la consommation à de multiples reprises, je n'ai jamais regretté. Merci pour avoir essayé d'être cocasse plusieurs fois par jour sans jamais baisser les bras, rassure-toi, ton potentiel comique est sans égal. Merci enfin de donner sans compter de ton temps à ceux qui en ont besoin, tu es un vrai mec à la cool.

Merci à Son Altesse Royale, la **princesse Julie**, comment oublier ces pauses thé en ta compagnie ? J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler à tes côtés et suis ravi que notre amitié dure malgré ton départ du labo.

Merci à **Mathias** pour toujours trouver l'angle d'attaque le plus inénarrable d'une situation, ce talent de la bonne formule n'éclipse pourtant pas tes compétences à la paillasse.

Merci à **Martine** qui restera toujours un exemple d'énergie et de bonne humeur au travail. Merci pour ta confiance manifestée par le passage de flambeau à Benjamin et moi de l'administration du réseau informatique du labo, ce n'était pas un cadeau !

Merci à **Soizic** dont les compétences retentissent encore en 121 quand on entame un Western Blot, à **Rachel** dont la détermination et les compétences sont de bon augure pour la poursuite des projets de l'équipe et à **Séverine** sans qui la microtomographie me serait restée une science obscure.

Merci à **Catherine** pour les trop courtes discussions dans le bureau sur l'éthique en Science ou le fonctionnement d'une unité de recherche.

Merci à **Céline** et **Jérôme**, à **Gwénola**, **Audrey** et **Bénédicte**, à **Éric**.

Merci à l'extraordinaire personnel de l'animalerie, **Guylène**, **Julie** et **Pierre**, toujours présents et aux petits soins autant pour les animaux que pour les manipulateurs, vous êtes la pierre angulaire de la qualité de nos expérimentations.

Merci enfin à **Marie-Hélène**, **Sandrine** et **Annie** pour avoir réglé d'insolubles problèmes administratifs et à **Laurent** pour ta bonne humeur et ton assistance.

Merci à tous les chercheurs du laboratoire, vous vous êtes tous rendus disponibles à un moment ou à un autre de ces cinq années depuis mon arrivée en master I, merci pour vos idées, vos conseils, votre expérience, le tout avec bonne humeur !

Merci à **Valérie** pour ton enthousiasme dans les moments de déprime, pour ta disponibilité sans faille en cas de soucis techniques en biologie moléculaire, et pour réussir d'une phrase à remettre les choses à leur place.

Merci à **Franck** pour tes innombrables astuces et ton sourire communicatif.

Merci aux trois mousquetaires de la résorption osseuse, **François**, **Ben** et **Marco**, qui ont été tout au long de ces années de thèse des modèles à suivre, tant au niveau scientifique pour vos expertises respectives sur la synergie entre les drogues, l'épigénétique et la physiologie osseuse, que pour vos qualités humaines.

Merci à **Fred B.** pour ton engagement à rendre le monde de la recherche accessible à tous. Merci de m'avoir transmis le goût du partage des connaissances et de la vulgarisation scientifique qui sont une des missions du chercheur académique. *L'aventure d'Un Lien Pour Guérir* ne fait que commencer.

Merci à **Béné** pour ton investissement pour solutionner les petits problèmes du quotidien et les bons moments passés le midi en salle de pause.

Merci à **Pierre L.**, à **Fred L.** pour les discussions interminables, à **Thibault** et à **Meadhbh**, à **Benoît**, à **Kosei** pour tes expressions (« Rhoooo Régis ! » « C'est la même chose ? ») et tes grimaces en mangeant du maroilles.

J'ai également une pensée émue pour **Marc** sans qui je n'aurais jamais mis les pieds au premier étage de la faculté de Médecine. Nous ne t'oublions pas.

Merci bien évidemment aux étudiants qui se sont succédés au fil des ans au laboratoire. Aux anciens tout d'abord, j'espère avoir été digne de votre héritage et d'avoir marché sans faillir dans vos pas,

A **Pierre**, seul et unique, à qui je n'ai jamais su dire non pour un Jack & Coke, merci de m'avoir laissé la chance de faire mes preuves malgré mon affreuse photo Facebook, ce fut un plaisir de contribuer modestement à tes derniers mois de thèse comme successeur préposé au CO₂. A **Steven**, radicalement briéron et honnissant les footix, merci de m'avoir initié au comportement digne à garder un soir de

défaite au stade Francis-Le-Basseur, *la Garde meurt mais ne se rend pas*. Prendre la suite de vous deux au laboratoire n'a pas été chose aisée, j'ai peur de n'avoir votre talent pour mettre Régis en boîte et dénigrer les thés de baltringues. Merci pour avoir partagé votre expérience avec bienveillance et une pointe d'ironie salutaire.

Merci à **Gaëlle** pour m'avoir transmis le flambeau du projet TRAIL.

Merci à **Julie** pour son rire inimitable, à **David** pour avoir initié mes oreilles à des sons exotiques, à **Bérangère** pour le canon sur le *Coq est Mort*.

Merci à **Anne-Laure**, pour ta bonne humeur de tous les jours même quand les complexes se débobinent. *Et encore félicitations !* Merci à **Aude**, pour nos nombreux footings, l'occasion de débats enflammés sur l'IL-34, pour ces bons moments passés à la paillasse et en dehors. Merci à **Lidia** et à **Luis** pour avoir ravivé mes souvenirs de cours d'espagnol. Merci pour votre entrain communicatif dans le bureau.

A mes chers conscrits, soyons fiers de ce que nous avons réalisé,

Toutes mes félicitations et merci à **Audrey**, pour ton écoute et ta bienveillance, pour ton énergie et pour être toujours partante pour un verre au Côté Plage ou un week-end en bord de mer. Félicitations également à **Laetitia**, dont le projet nous a ouvert des mondes inconnus.

Courage pour les ultimes mètres de la dernière ligne droite et un immense merci à toi, **Pierre, M. Avril**, avec qui j'ai partagé coups de cœur et coups de gueule au long de ces cinq années au laboratoire. Tu sais que le dévouement au bien commun fait partie du job de thésard, tout comme de partager notre expérience et notre modeste savoir-faire aux générations à venir. Nos envolées philosophiques, nos débats politiques et nos échanges spirituels resteront pour moi des moments inestimables. Je me souviendrai des proverbes entre les draps, de ton incroyable talent de flechiverbiste et de l'ambiance musicale jamais égalée lorsque l'impératif partagé d'un Western Blot nous rassemblait en 121. J'associe bien sûr à ces remerciements **Marine**, vous êtes définitivement de merveilleux amis sans qui même les jardins de Versailles ou le concert de Souchy et Voulzon paraîtraient fades.

Une très bonne fin de thèse à ceux qui nous suivrons,

A **Marie-Astrid**, merci pour la magnifique qPCR (en **FIGURE 66A**) et d'avoir repris la place de Pierre et ainsi perpétué la venue de Fred dans le bureau. A **Benjamin**, merci de ton implication pour le collectif, tes compétences et ta résolution sont essentielles au laboratoire. A **Louis-Romée**, merci pour ta

capacité à t'enthousiasmer de la même façon pour la différenciation chondroblatique de MSC ou la douche réussie de Swampy le crocodile. Merci à **Camille** et à **Nathalie**.

Et enfin merci aux étudiants en BTS, Licence, Master, aux ostéopathes, aux lycéens et aux collégiens de passage pour découvrir le monde de la recherche. En particulier, merci à **Patrick** et à **Olivier**, mes confrères de Master I, merci à **Joséphine** et **Fanny** pour votre humour détonnant, à **Mathilde** pour tes petites questions, à **Géraldine** à qui il faut que je demande une ordonnance pour des vacances, à **Damien** et **François**, à **Brieuc**, et aux Master II qui débutent, **Geoffroy**, **Julie**, **Marie-Alice**, **Brice** et **les deux Sarah**, bonne continuation à tous !

Merci à ceux qui, sans bien comprendre ce qu'était le travail d'un doctorant, qui considérant que des chercheurs qui cherchent on en trouve mais que des chercheurs qui trouvent on en cherche, ou pour qui encore pensant que de l'aube à l'aurore j'assassinais des petites souris, m'ont malgré tout toujours envoyé des ondes positives.

Merci à mes parents, **Annick** et **Daniel**, qui m'ont soutenu dans tous mes choix et tout ce que j'ai entrepris, qui m'ont permis de garder le cap et qui m'ont tant donné. Merci à **ma grand-mère** et une grande pensée pour **mon grand-père** qui m'ont transmis entre beaucoup d'autres choses la curiosité et le goût du savoir et de la connaissance.

Merci à mes amis pour leur soutien, et en particulier à **Adrien** pour avoir maintenu MBG à flot malgré mes manquements, pour m'avoir fait oublier les soucis de la thèse le samedi en inventant sans cesse de nouvelles Cuganderies, pour guider Vanwolk et Iconoclast sur la voie Lumineuse, pour s'occuper de ma santé spirituelle en me rappelant l'essentiel, pour être finalement le frère que je n'ai jamais eu. Merci à **Claire et Arnaud**, à **Marie et Greg**, à **Julie et Sylvain**, pour toujours avoir l'impression de s'être vu la veille et continuer à évoquer de nos meilleurs souvenirs et en créer de nouveaux.

Merci à **Roselyne** et **Thierry** pour les nombreux bons moments passés et à venir autour d'une bouteille de Layon, de Tariquet, de Pineau ou de San Pellegrino en Loire-Atlantique, en Vendée, en Charente-Maritime ou ailleurs ! Merci à **Marie-Françoise** et **Bernard** pour avoir révélé mon talent pour les clôtures, pour la découverte d'inégalables spécialités culinaires belges et pour parfaire ma culture musicale. Merci à **Julien** pour me faire tant rire quand tu es de passage à la Plaine sur Mer.

Merci aux énergumènes des Ecuries de l'Horizon qui font la vie extraordinaire, à **Charline**, la meilleure monitrice du monde qui a relevé le défi de m'apprendre à monter et à chuter de poney, à **Dorothée** et **Jérémy**, à **Christophe**.

Pour terminer, un immense merci à **Marie**, pour ta présence sans faille à mes côtés, pour tes délicats mais indispensables encouragements tout au long de la rédaction de ce manuscrit. Tu es celle qui fait battre mon cœur, qui bouscule mes habitudes, qui illumine ma vie. Il me faudrait l'art et le style de Vincent Delerm au théâtre Déjazet pour dire tous les remerciements que je voudrais t'adresser, pour nos pérégrinations, nos fous rires, pour m'avoir expliqué la différence entre les épaules en-dedans et les têtes au mur, pour tes talents culinaires qui ravissent sans cesse mes papilles, pour les moments qui n'appartiennent qu'à nous...

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	10
Listes des figures et des tableaux	17
Liste des abréviations	22
Introduction générale	27
I. TRAIL, une cytokine pro-apoptotique facteur clef de l'immunosurveillance du cancer	30
1. De la théorie de l'immunosurveillance du cancer au concept d' « immunoediting »	30
2. Les mécanismes de l'immunosurveillance du cancer	34
a. Acteurs de la première reconnaissance des cellules transformées.....	36
b. Mécanismes de cytotoxicité dans l'immunosurveillance	39
3. TNF Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) un candidat prometteur en cancérologie .	46
a. TRAIL et ses récepteurs.....	46
b. Voie de signalisation apoptotique de TRAIL	48
c. Intérêt et limites de cibler la voie de l'apoptose extrinsèque de TRAIL dans le cancer	51
II. Les tumeurs osseuses pédiatriques et leur microenvironnement	55
1. L'ostéosarcome pédiatrique.....	56

a.	Epidémiologie de l'ostéosarcome	58
b.	Tableau clinique de l'ostéosarcome	59
c.	Etiologie de l'ostéosarcome	61
d.	Traitements actuels et limites	63
2.	Le sarcome d'Ewing	66
a.	Epidémiologie du sarcome d'Ewing.....	66
b.	Etiologie	67
c.	Tableau Clinique	71
d.	Traitements actuels et limites	72
3.	Le microenvironnement osseux tumoral, une cible pour de nouveaux traitements	75
a.	Cercle vicieux entre ostéolyse et prolifération des tumeurs osseuses primitives malignes.....	75
b.	Essais précliniques et cliniques en cours dans les tumeurs osseuses pédiatriques	78
III.	TRAIL, une nouvelle approche thérapeutique dans les tumeurs osseuses pédiatriques ..	80
1.	Intérêt du ciblage de la voie de l'apoptose induite par TRAIL dans les tumeurs osseuses pédiatriques	80
a.	Le sarcome d'Ewing et TRAIL	81
b.	L'ostéosarcome et TRAIL.....	82
2.	Mécanismes de résistance à TRAIL des tumeurs osseuses pédiatriques	83
3.	Expression d'un isoforme tronqué de DR4 dans les tumeurs osseuses pédiatriques	84
4.	Le microenvironnement des tumeurs osseuses pédiatriques, une niche pour la résistance à TRAIL ?	85
a.	Rôle de TRAIL dans le fonctionnement normal du tissu osseux	85
b.	Un microenvironnement hypoxique	87
c.	Un microenvironnement acide	88
d.	Un environnement inflammatoire	88
e.	La présence d'ostéoprotégérine	88

Objectifs de la thèse	89
Matériels et Méthodes.....	92
I. Modèles Cellulaires	92
1. Lignées cellulaires.....	92
2. Modèles de reproduction des conditions du microenvironnement tumoral osseux <i>in vitro</i>	94
a. Modèle d'hypoxie induite par la Déféroxamine (DFO)	94
b. Modèle d'acidité du pH extracellulaire.....	95
II. Modèles in vivo	97
1. Administration de traitements.....	98
2. Transfert de gène non viral par électro-transfert	98
III. Outils	100
1. Protéines recombinantes humaines.....	100
2. Variants de TRAIL sélectifs pour un des récepteurs de mort	101
3. Anticorps agoniste de DR5 – AMG655	101
4. Multiple agoniste des récepteurs de TRAIL –APG880.....	102
5. Cellules souches mésenchymateuses (CSM) utilisées comme source stable de TRAIL	102
IV. Techniques	103
1. Etude de la prolifération et de la migration cellulaire	103
a. Détermination des concentrations inhibitrices médianes (IC50).....	104
b. Etude de synergie entre un activateur des récepteurs de TRAIL et des agents potentiellement sensibilisants	104
c. Etude de la migration cellulaire	105
2. Etude de l'induction de l'apoptose	106
a. Test enzymatique d'activation des caspases.....	106
b. Cytométrie en flux.....	107
3. Expression transcriptionnelle, traductionnelle et de surface	107

a.	RT-qPCR	107
b.	Western Blot.....	109
c.	Méthode immuno-enzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	111
d.	Cytométrie en flux.....	112
4.	Modification transcriptionnelle des lignées par shRNA	113
a.	Choix des séquences des shRNA et clonage en plasmide	113
b.	shRNA utilisés dans cette étude.....	115
c.	Production de particules lentivirales et transduction des lignées.....	116
5.	Histologie et analyse de la micro-architecture osseuse.....	117
a.	Immunofluorescence	117
b.	La microscopie à fluorescence	118
c.	Analyse de la microarchitecture osseuse par microtomographie.....	118
6.	Analyses statistiques	119

Partie I – Mécanismes de résistance à TRAIL des Tumeurs Osseuses Pédiatriques

.....	121
I. Caractérisation des Lignées	122
1. Sensibilité à rhTRAIL	122
2. Expression des récepteurs de mort de TRAIL dans les lignées.....	125
3. Rôle des inhibiteurs de l'apoptose	130
a. Expression des récepteurs leurres de TRAIL.....	130
b. Expression des inhibiteurs de l'apoptose.....	133
c. L'inhibition de c-FLIP par shRNA ne sensibilise pas les lignées initialement résistantes à rhTRAIL....	134
4. Sensibilité à Fas-L	135
5. Sensibilité aux variants de TRAIL sélectifs pour DR4 ou DR5	137

II. Mise au point des modèles d'étude in vivo	139
1. Sensibilité des lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome à l'AMG655	141
2. Mise au point d'un modèle <i>in vivo</i> sensible à l'AMG655	142
3. Mise au point d'un modèle <i>in vivo</i> résistant à l'AMG655	143
III. Activation de la voie non-apoptotique de TRAIL dans un modèle résistant d'ostéosarcome	146
1. Des voies de signalisation non-apoptotiques induites par la fixation de TRAIL sur ses récepteurs de mort	146
a. Formation d'un complexe de signalisation secondaire.....	147
b. Voies de signalisation de survie et de prolifération	148
c. Voies de signalisation induisant la migration et l'invasion.....	150
2. Rôle des voies non-apoptotiques de TRAIL dans la survie et la prolifération de la lignée K-HOS	151
a. Activation de voies non-apoptotiques de TRAIL par l'AMG655 dans la lignée K-HOS.....	151
b. <i>In vitro</i> , l'AMG655 diminue le temps de doublement des cellules K-HOS	153
c. <i>In vivo</i> , AMG655 diminue le temps de doublement des cellules K-HOS	154
3. Activation de la voie non-apoptotique de TRAIL induisant la migration de la lignée K-HOS....	155
IV. Rôle du microenvironnement des tumeurs osseuses pédiatriques sur la sensibilité à l'AMG655	158
1. Etude de la sensibilité à l'AMG655 dans un modèle d'induction de HIF-1 α	158
2. Rôle du pH extracellulaire acide sur la sensibilité à l'AMG655	159
Conclusions de la première partie	161
 Partie II - Vers une sensibilisation des Tumeurs Osseuses Pédiatriques aux thérapies impliquant la voie de TRAIL	166

I.	Inhibition de la voie non-apoptotique de TRAIL : Une preuve de concept par l'utilisation de shRNA ciblant RIPK1	167
1.	Vérification de l'inhibition de l'expression de RIPK1 dans la lignée K-HOS transduite avec shRIP1	168
2.	L'inhibition de l'expression de RIPK1 par shRNA ne modifie pas la sensibilité de la lignée K-HOS à l'apoptose induite par l'AMG655	169
3.	L'inhibition de l'expression de RIPK1 par shRNA bloque l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL induite par l'AMG655	170
4.	<i>In vivo</i> , l'inhibition de RIPK1 permet de sensibiliser la lignée K-HOS à l'AMG655	171
II.	Des cellules souches mésenchymateuses comme source stable de TRAIL	173
1.	Des CSM transduites exprimant fortement la GFP et TRAIL	173
2.	Les lignées d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing sont sensibles à TRAIL par contact direct avec les CSM-TRAIL	175
3.	La quantité de TRAIL sécrétée par les CSM-TRAIL n'est pas suffisante pour induire l'apoptose des lignées étudiées	177
4.	<i>In vivo</i> , la co-injection de CSM-TRAIL avec les cellules de sarcome d'Ewing TC-71 ralentit la progression tumorale	178
5.	La co-injection de CSM-GFP et de cellules de sarcome d'Ewing A-673 accélère la progression tumorale <i>in vivo</i> , les CSM-TRAIL sont capables de contrecarrer cet effet et de ralentir la progression tumorale	179
6.	Les CSM-TRAIL induisent l'apoptose des cellules tumorales de sarcome d'Ewing adjacentes	181
7.	La co-injection des CSM-GFP dans le modèle d'ostéosarcome K-HOS accélère la progression tumorale, les CSM-TRAIL ne peuvent pas contrecarrer cet effet	183
8.	Les CSM-TRAIL n'induisent pas l'apoptose des cellules tumorales d'ostéosarcome adjacentes	184
III.	L'augmentation de la « clusterisation » des récepteurs de TRAIL permet-elle de favoriser la voie pro-apoptotique de TRAIL au lieu de la voie non-canonique ?	186

1. <i>In vitro</i> , l'APG880 induit un effet antiprolifératif supérieur à celui de l'AMG655, même dans la plupart des lignées résistantes	188
2. L'APG880 induit une activation plus élevée et plus précoce de la voie de signalisation non-apoptotique de TRAIL dans la lignée K-HOS.....	189
IV. Le ciblage du microenvironnement tumoral osseux comme piste de sensibilisation à TRAIL : l'exemple de l'acide zolédronique	191
1. <i>In vitro</i> , l'acide zolédronique sensibilise les cellules K-HOS à l'AMG655	192
a. L'acide zolédronique à hautes doses inhibe la prolifération des cellules K-HOS	192
b. L'acide zolédronique agit de façon synergique avec l'AMG655 sur la prolifération des cellules K-HOS	193
c. L'acide zolédronique inhibe l'expression des protéines c-IAP1 et c-IAP2 dans la lignée K-HOS ..	194
2. <i>In vivo</i> , l'acide zolédronique permet de s'opposer à l'effet pro-tumoral de l'AMG655 mais ne sensibilise pas à l'effet pro-apoptotique.....	195
Conclusions de la seconde partie.....	198
Discussion générale	205
Conclusion générale et perspectives.....	210
Bibliographie.....	211
Annexes	230
I. Solutions utilisées	231
1. Solutions Western Blot.....	231
II. Revue publiée dans Future Oncology	
III. Article sur les CSM-TRAIL en cours de soumission	

Listes des figures et des tableaux

Figure 1 Capacités distinctives des cancers redéfinies en 2011 par Hanahan and Weinberg.....	28
Figure 2 Relation entre cellules tumorales et système immunitaire au cours des différentes étapes du développement tumoral selon le concept de l'immunoediting.....	32
Figure 3 Une théorie unifiée de la complexité immunitaire du cancer	33
Figure 4 Modèle proposé pour la phase d'élimination du processus d'immunoediting du cancer.....	35
Figure 5 Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK.....	37
Figure 6 Récepteurs de mort de la superfamille du TNF-récepteur (TNFRSF) et leurs ligands.....	42
Figure 7 Voie extrinsèque de l'apoptose induite par la fixation du TNF, de FasL ou de TRAIL sur leurs récepteurs de mort..	43
Figure 8 Amplification de l'apoptose induite par la fixation des cytokines de la superfamille du TNF sur leurs récepteurs de mort par l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose.....	44
Figure 9 Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose induite par la fixation de TRAIL sur ses récepteurs de mort DR4 et DR5..	49
Figure 10 Transformation des cellules de la lignée ostéoblastique en ostéosarcome.	57
Figure 11 Préparations histologiques d'ostéosarcomes	58
Figure 12 L'ostéosarcome en imagerie médicale.....	60
Figure 13 Principales localisations du sarcome d'Ewing	67
Figure 14 Translocation entre les chromosomes 11 et 22.....	67
Figure 15 Schéma de la translocation chromosomique responsable de la production d'un facteur de transcription chimérique aberrant.....	68
Figure 16 Réseau annoté des effets de EWS-FLI1 sur la prolifération et l'apoptose.....	69

Figure 17 Coloration Hématoxyline-Eosine de tumeur de sarcome d'Ewing présentant de petites cellules rondes indifférenciées.....	70
Figure 18 Radiologie d'un patient présentant des lésions ostéolytiques et une réaction périostée consécutives à un sarcome d'Ewing.....	72
Figure 19 Cercle vicieux s'établissant entre résorption osseuse et prolifération tumorale dans les tumeurs osseuses primitives malignes.....	76
Figure 20 Thérapies de l'ostéosarcome ciblant les capacités distinctives de ce cancer.....	78
Figure 21 Thérapies du sarcome d'Ewing ciblant les capacités distinctives de ce cancer.....	79
Figure 22 Expression des récepteurs de mort de TRAIL dans les tumeurs de sarcome d'Ewing.....	81
Figure 23 Schéma de la prédiction de la fixation de TRAIL se liant à DR4a ou DR4b.....	85
Figure 24 Caractéristiques du microenvironnement osseux tumoral ayant potentiellement un rôle dans la sensibilité/résistance des cellules tumorales à TRAIL.....	86
Figure 25 La voie de régulation des gènes induits par l'hypoxie.....	94
Figure 26 pH du milieu DMEM en fonction de la quantité de HCl 1N ajouté.....	95
Figure 27 Electro-transfert d'ADN plasmidique chez la souris Nude.....	99
Figure 28 Exemple de graphe Chou Talalay de l'Index de Combinaison en fonction de Fa.....	105
Figure 29 Schéma de l'étude de la migration cellulaire en fonction d'un gradient de SVF à travers des pores 8µm.....	106
Figure 30 Schéma de l'intégration de la séquence de 19 nucléotides (N) complémentaire (W) à l'ARNm du gène cible dans la structure tige-boucle du shRNA.....	114
Figure 31 Intégration de la cassette contenant la séquence du shRNA dans le plasmide pSUPER linéarisé, entre les sites de restriction BglII et HindIII.....	114
Figure 32 Séquence d'expression lentivirale du plasmide pFG12.....	115
Figure 33 Viabilité de lignées modèles en présence de rhTRAIL déterminée par test de prolifération WST-1.....	123
Figure 34 IC50 des lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome en réponse à rhTRAIL.....	124
Figure 35 Sensibilité de lignées modèles à l'apoptose induite par rhTRAIL évaluée par test enzymatique spécifique de la caspase-3.....	125
Figure 36 Expression des récepteurs de mort de TRAIL par les lignées modèles.....	127
Figure 37 Expression transcriptionnelle des récepteurs de mort de TRAIL dans les lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome.....	128
Figure 38 Corrélation entre l'expression de DR4 et la sensibilité à rhTRAIL dans les lignées de sarcome d'Ewing.....	129

Figure 39 Effet de l'inhibition de DR5 dans la lignée STA-ET-1 sur la sensibilité à rhTRAIL.	130
Figure 40 Expression des récepteurs leurres de TRAIL par les lignées modèles.....	131
Figure 41 Expression transcriptionnelle des récepteurs leurre de TRAIL dans les lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome	132
Figure 42 Expression transcriptionnelle de c-FLIP dans les lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome	133
Figure 43 L'inhibition de c-FLIP par shRNA ne sensibilise pas les lignées initialement résistantes à rhTRAIL.	134
Figure 44 IC50 des lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome en réponse à rhFas-L.....	136
Figure 45 Sensibilité croisée des lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome à rhTRAIL et rhFAS-L.	137
Figure 46 Effets des variants de TRAIL sélectifs pour DR4 ou DR5 par rapport à TRAIL WT dans les lignées TC-71 et K-HOS.....	138
Figure 47 Expression protéique de TRAIL dans le muscle électro-transféré et dans le serum des animaux sept jours après le transfert de gène	140
Figure 48 Sensibilité de lignées modèles à l'agoniste de DR5 AMG655	141
Figure 49 L'AMG655 ralentit le développement tumoral primitif du modèle de sarcome d'Ewing induit par les cellules TC-71	143
Figure 50 L'AMG655 accélère le développement tumoral primitif du modèle d'ostéosarcome induit par l'injection de cellules K-HOS.....	144
Figure 51 Comparaison des voies apoptotique et non-apoptotique de TRAIL.....	147
Figure 52 Voies de signalisation favorisant la survie et la prolifération cellulaire à la suite de l'activation des récepteurs de mort de TRAIL.....	148
Figure 53 Voies de signalisation favorisant la migration cellulaire et l'invasion à la suite de l'activation des récepteurs de mort de TRAIL.....	150
Figure 54 Activation des voies pro-prolifératives dans la lignée K-HOS après traitement à l'AMG655 révélée par Western Blot..	152
Figure 55 Temps de doublement de la lignée K-HOS avant et après traitement à l'AMG655.	153
Figure 56 Temps de doublement de cellules tumorales isolées à partir de tumeurs induites chez la souris nude par les cellules K-HOS traitées ou non par 2mg/kg d'AMG655.....	154
Figure 57 rhTRAIL et l'AMG655 augmentent la migration des cellules K-HOS soumises à un gradient de SVF à travers des pores de 8 µm.	155
Figure 58 L'AMG655 induit l'activation de voies de migration et d'invasion de la cellule tumorale.	156

Figure 59 L'hypoxie simulée par la déféroxamine (DFO) ne modifie pas la sensibilité des cellules K-HOS à l'AMG655.	159
Figure 60 Un pH extracellulaire acide augmente l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL par l'AMG655 dans les cellules K-HOS.	160
Figure 61 Inhibition de l'expression de RIPK1 dans la lignée K-HOS transduite avec des shRNA ciblant RIPK1 (K-HOS shRIP1-1 et shRIP1-2).	168
Figure 62 Absence d'activation de la voie apoptotique de TRAIL dans les lignées K-HOS shCT, K-HOS shRIP1-1 et K-HOS shRIP1-2	169
Figure 63 Blocage de l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL induite par l'AMG655 par les shRNA ciblant RIPK1 dans la lignée K-HOS	170
Figure 64 L'inhibition de RIPK1 par shRNA sensibilise les tumeurs induites par les cellules K-HOS à l'effet anti-tumoral de l'AMG655.	172
Figure 65 Caractérisation de l'expression de la GFP des CSM transduites.	174
Figure 66 Quantification transcriptionnelle par RT-qPCR (A) ou traductionnelle par ELISA (B) de l'expression de TRAIL par les CSM transduites.	175
Figure 67 IC50 pour rhTRAIL des 12 lignées étudiées dans l'étude CSM-TRAIL.....	176
Figure 68 Coculture des cellules tumorales avec les CSM-GFP ou CSM-TRAIL.....	176
Figure 69 Prolifération des cellules tumorales dans les chambres de Boyden au-dessus de CSM-TRAIL.	178
Figure 70 La co-injection de CSM-TRAIL avec les cellules tumorales prévient le développement tumoral et augmente la survie des souris dans le modèle de xénogreffe orthotopique de sarcome d'Ewing TC-71.....	179
Figure 71 La coinjection de CSM-TRAIL prévient le développement tumoral et augmente la survie des souris dans le modèle de xénogreffe orthotopique de sarcome d'Ewing A-673.	180
Figure 72 Les CSM-TRAIL induisent l'apoptose des cellules tumorales A-673 adjacentes.	182
Figure 73 La co-injection de CSM-TRAIL et de CSM-GFP avec les cellules tumorales accélère le développement tumoral et diminue la survie des souris dans le modèle de xénogreffe orthotopique d'ostéosarcome K-HOS.....	184
Figure 74 Les CSM-TRAIL n'induisent pas l'apoptose des cellules tumorales K-HOS adjacentes.	185
Figure 75 Schéma de la fixation d'une molécule d'APG880 sur six récepteurs de mort de TRAIL.	187
Figure 76 Effets comparatifs de l'AMG655 et de l'APG880 dans les lignées modèles.....	188
Figure 77 La lignée G-292 est résistante à l'AMG655 et à l'APG880.....	189

Figure 78 Activation de la voie non-apoptotique dans la lignée K-HOS après traitement à l'AMG655 et à l'APG880 révélée par Western Blot.....	190
Figure 79 Effet de l'acide zolédronique sur la prolifération des cellules K-HOS.....	193
Figure 80 L'acide zolédronique (zol) sensibilise les cellules K-HOS à l'AMG65.....	194
Figure 81 L'acide zolédronique inhibe l'expression des protéines IAP1 et IAP2 dans la lignée K-HOS.....	195
Figure 82. L'acide zolédronique permet de contrecarrer l'effet pro-tumoral de l'AMG655 dans le modèle in vivo K-HOS mais ne sensibilise pas à l'effet pro-apoptotique.....	196
Figure 83 Etude de la microarchitecture osseuse par microtomographie permettant la reconstruction de l'os en 3 dimensions..	197
Figure 84 Proposition d'association de l'acide zolédronique et d'un agent induisant fortement la voie apoptotique de TRAIL, comme l'APG880.....	208
Tableau I Liste des essais cliniques ciblant la voie de TRAIL.....	53
Tableau II Principales translocations chromosomiques retrouvées chez les patients atteints de sarcome d'Ewing.....	68
Tableau III Lignées cellulaires humaine de sarcome d'Ewing utilisées au cours de cette étude.....	93
Tableau IV Lignées cellulaires humaines d'ostéosarcome utilisées au cours de cette étude.....	93
Tableau V Anticorps utilisés en Western Blot.....	111
Tableau VI Liste des anticorps primaires utilisés en cytométrie en flux.....	112
Tableau VII Liste des shRNA utilisés dans cette étude et leur séquence.....	115
Tableau VIII Références des produits utilisés en immunofluorescence.....	118

Liste des abréviations

Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BID	BH3-Interacting Domain
BSA	Bovine Serum Albumin
c-FLIP	cellular FLICE-Inhibitory Protein
CSM	Cellule Souche Mésenchymateuse
DcR1/2	Decoy Receptor – Récepteur Leurre
DFO	DéFérOxamine
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DR4/5	Death Receptor 4/5 – Récepteurs de Mort
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FLICE	FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme

HIF	Hypoxia Inducible Factor
IAP	Inhibitory Apoptosis Protein - Protéine Inhibitrice de l'Apoptose
IC50	Inhibitory Concentration 50 - Concentration Inhibitrice moyenne
IP	Iodure de Propidium
LT α	Lymphotoxine- α
NEMO	NF- κ B Essential MOdulator
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Cellule Natural Killer
NKT	Lymphocyte T Natural Killer
OPG	Ostéoprotégérine
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PVDF	PolyVinylidene Fluoride
pVHL	protéine suppresseur de tumeur Von Hippel Lindau
RIPK1	Receptor Interacting Protein Kinase 1
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SFV	Sérum de Veau Foetal
STS	Staurosporine
TL1A	TNF-like ligand 1A
TNF	Tumor-Necrosis-Factor
TRADD	TNF-Receptor Associated Death Domain
TRAF2	TNF-Receptor Associated Protein 2
TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand

UA Unités Arbitraires

WT Wild Type

Introduction

La vie, [c'est] l'ensemble des fonctions qui s'opposent à la mort

Marie François Xavier Bichat

1771-1802

Introduction générale

Reconnaitre ce qui est étranger, discriminer le « non-soi » du « soi » et enfin détruire la menace, voici les rôles du système immunitaire, véritable gardien intervenant à tous les niveaux de fonctionnement de l'organisme. Le système immunitaire laisse généralement en sécurité les cellules appartenant à l'organisme, mais comment agit-il lorsque la menace est le « soi » lui-même, fondement même du cancer ?

Les cellules tumorales, accumulant les mutations qui vont changer leur profil d'expression génique par rapport à leurs homologues normales, peuvent devenir ainsi des cibles identifiables. Le système immunitaire dispose alors de plusieurs moyens pour éradiquer la menace, dont l'induction de la mort programmée des cellules tumorales.

S'appuyer sur ces mécanismes innés de défense de l'organisme est l'une des pistes de recherche en cancérologie, parmi ces immunothérapies, l'utilisation de la cytokine TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) semble être prometteuse.

La caractérisation des altérations génétiques et épigénétiques affectant les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes a permis de poser les principes fondamentaux de la biologie du cancer et de déterminer quelles sont les capacités distinctives (en anglais *Hallmarks*) des cellules tumorales qui leur donnent les aptitudes nécessaires à la prolifération anarchique caractéristique de cette pathologie. Ces capacités distinctives ont été définies en 2000 par Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) puis complétées à la suite des progrès de la recherche en cancérologie, notamment sur le microenvironnement tumoral, en 2011 (Hanahan and Weinberg, 2011) et résumées en **FIGURE 1**. Les caractéristiques régissant la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses sont ainsi réduites à huit capacités distinctives (l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, la capacité de se répliquer indéfiniment, l'invasion et la formation de métastases, l'induction de l'angiogenèse, la capacité à éviter l'apoptose, l'esquive d'une destruction par le système immunitaire et la dérégulation du métabolisme énergétique) et à deux caractéristiques favorisant les cancers (l'instabilité et les mutations du génome et l'inflammation favorisant la tumeur).

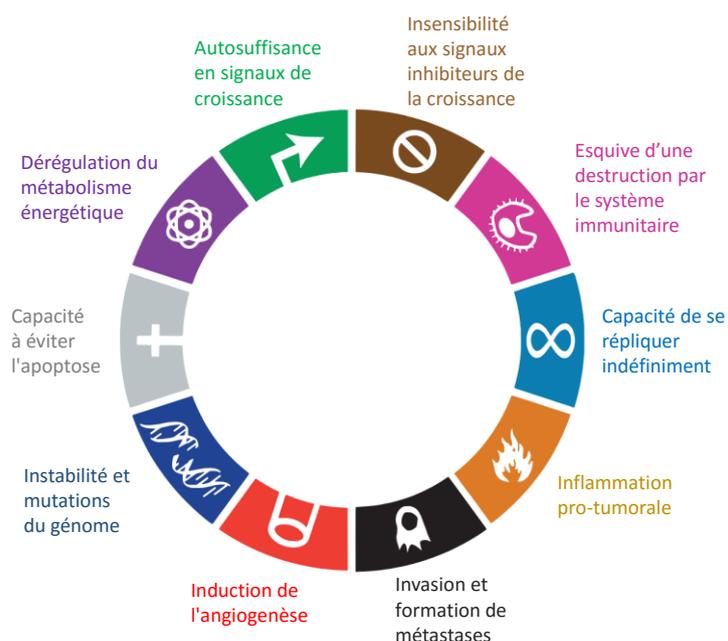


Figure 1 Capacités distinctives des cancers redéfinies en 2011 par (Hanahan and Weinberg, 2011). La complexité du cancer peut être réduite à un petit nombre de principes sous-jacents, ces caractéristiques régissent la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses. Il y a huit capacités distinctives (l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, la capacité de se répliquer indéfiniment, l'invasion et la formation de métastases, l'induction de l'angiogenèse, la capacité à éviter l'apoptose, l'esquive d'une destruction par le système immunitaire et la dérégulation du métabolisme énergétique) et deux caractéristiques favorisant les cancers (l'instabilité et les mutations du génome et l'inflammation favorisant la tumeur).

Sur le modèle de la théorie de l'évolution des espèces de Darwin, le développement d'une tumeur maligne peut alors être présenté comme un processus de sélection de cellules ayant acquis des anomalies leur conférant un avantage de croissance, suivies de vagues d'expansions clonales. Le responsable de la pression de sélection peut alors être assimilé au système immunitaire. L'idée que le système immunitaire joue un rôle important dans la biologie du cancer n'est pas nouvelle et date du début du XX^{ème} siècle. Le concept d'*immunoediting* est l'aboutissement de nombreuses années de progrès et de découvertes dans ce domaine de la cancérologie.

I. TRAIL, une cytokine pro-apoptotique facteur clef de l'immunosurveillance du cancer

1. De la théorie de l'immunosurveillance du cancer au concept d' « immunoediting »

Les prémices de la théorie de l'immunosurveillance du cancer sont proposées en 1909 par le médecin Paul Ehrlich, colauréat l'année précédente du Prix Nobel de physiologie ou médecine pour ses travaux sur l'immunité (Ehrlich, 1909; Nobelprize.org, 2015). D'après ses observations, il postulait alors que le cancer surviendrait de manière plus fréquente en absence de contrôle du système immunitaire, suggérant ainsi que le développement tumoral est le plus souvent aboli grâce à lui. Néanmoins, cette théorie a connu plusieurs évolutions avant que le site internet Nature.com en fasse récemment la troisième pierre de fondation de la recherche en cancérologie (Nature.com, 2015).

A la fin des années 1950, la théorie de l'immunosurveillance est formulée de façon explicite par plusieurs équipes (Burnet, 1957; Foley, 1953; Thomas and Lawrence, 1959) et largement acceptée par les immunologistes remarquant par exemple le rejet immuno-dépendant de greffes de tumeurs induites chimiquement chez la souris syngénique (Old and Boyse, 1964).

Cependant, des études sur les animaux présentant un déficit immunitaire aboutirent à des résultats discordants quant à la sensibilité de ces souris aux tumeurs spontanées ou induites chimiquement

(Stutman, 1975). L'incidence plus élevée de cancers chez les sujets immunodéprimés a ainsi été attribuée à leur incapacité à éliminer les agents infectieux transformants, plutôt qu'à l'absence d'immunosurveillance de la tumeur. Le concept de l'immunosurveillance du cancer a été amplement abandonné après l'observation que des souris nude athymiques n'aient pas montré une incidence accrue de tumeurs spontanées ou induites chimiquement par rapport à des animaux sauvages (Rygaard and Povlsen, 1974). Cette mise en retrait du concept d'immunosurveillance du cancer est reflétée dans la déclaration de Thomas en 1982 selon laquelle les modèles expérimentaux de l'époque ne permettaient pas de démontrer l'existence formelle d'immunosurveillance de la tumeur (Thomas, 1982).

À partir de 1994, des travaux ont toutefois amené un nouveau soutien au principe central que le système immunitaire peut empêcher la formation de tumeurs. Deux découvertes ont ainsi été essentielles dans des modèles de rejet de greffe de tumeurs chez la souris, d'une part le rôle de l'interféron gamma (IFN- γ) endogène (Dighe et al., 1994; Kaplan et al., 1998) et d'autre part celui de la perforine (van den Broek et al., 1996).

Dans ce même temps, des travaux ont montré que le système immunitaire promeut ou sélectionne également des clones de cellules tumorales avec une immunogénicité réduite, fournissant ainsi aux tumeurs en développement un mécanisme pour échapper à la détection immunologique et à l'élimination (Svane et al., 1996).

Ces dernières constatations ont conduit à l'élaboration de l'hypothèse d'« *immunoediting* » du cancer par l'équipe de Robert Schreiber en 2002, un affinement de la théorie de l'immunosurveillance du cancer, qui, avec une vision plus large des interactions entre le système immunitaires et les cellules tumorales, reconnaît à la fois les actions du système immunitaire de protection de l'hôte et du modelage des tumeurs en développement (Dunn et al., 2002). L'immunoediting est souvent résumé par les initiales « 3 E », reprenant les trois étapes distinctes d'Élimination des cellules tumorales par le système immunitaire, d'Équilibre entre les deux acteurs et d'Échappement de la tumeur (Dunn et al., 2004). Ce concept est illustré en **FIGURE 2**.

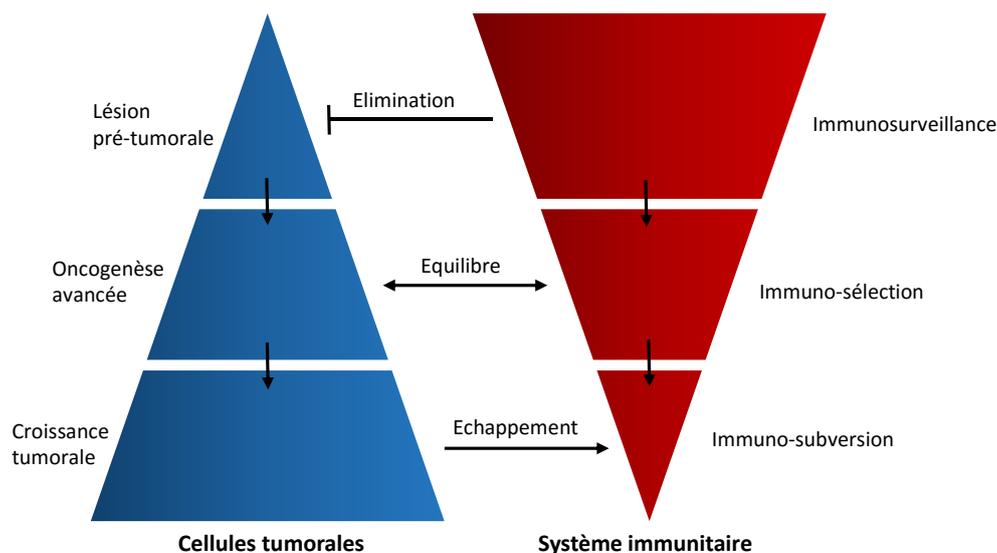


Figure 2 Relation entre cellules tumorales et système immunitaire au cours des différentes étapes du développement tumoral selon le concept de l'immunoediting (d'après (Zitvogel et al., 2006))

Cette hypothèse a, dans les années suivantes, été éprouvée dans de nombreux modèles, ne permettant pas de la valider dans tous les cas étudiés. Ainsi, dans des types de cancers spontanés exprimant l'antigène T du SV40, il a été montré que les cellules tumorales n'échappaient pas au système immunitaire mais le rendait plutôt tolérant (Ciampricotti et al., 2011; Willimsky and Blankenstein, 2005). Pour prendre en compte tous ces cas de figure, l'hypothèse de l'immunoediting a été elle-même intégrée à une théorie unifiée de la complexité immunitaire du cancer (**FIGURE 3**) proposée en 2011 par (Manjili, 2011).

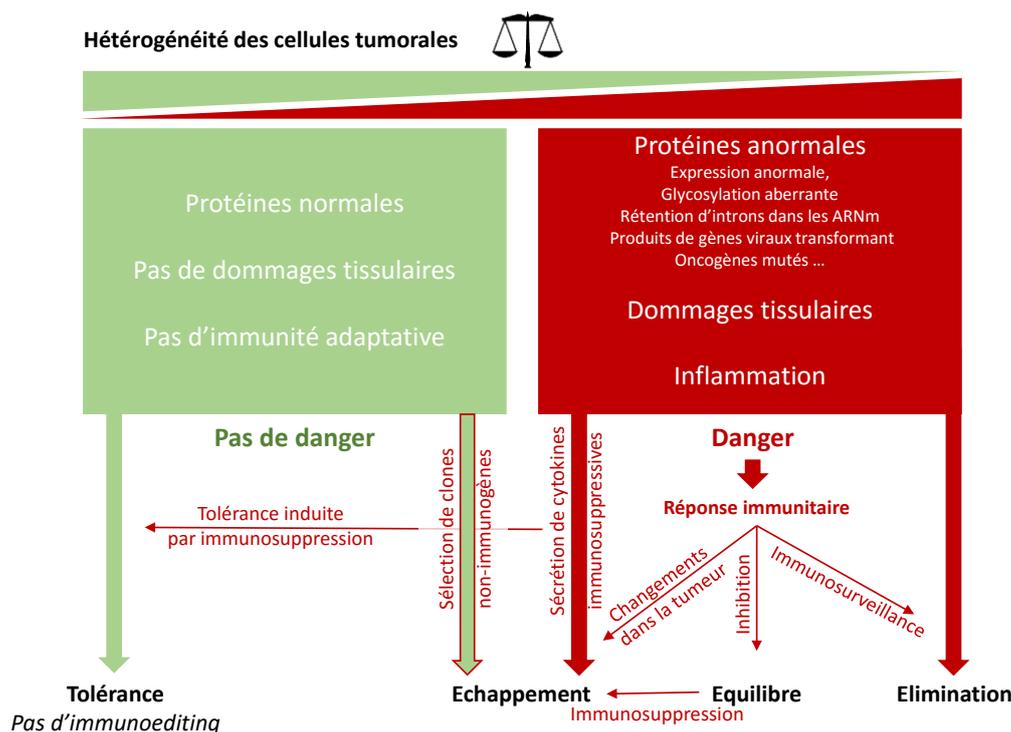


Figure 3 Une théorie unifiée de la complexité immunitaire du cancer. Les tumeurs sont constituées d'une population hétérogène de cellules qui se développe à partir de clones qui envoient des signaux de danger pour le système immunitaire (rouge) et de clones qui ne semblent pas être dangereux pour le système immunitaire (vert). La balance entre ces deux types de clones détermine l'état de l'immunosurveillance de la tumeur chez l'hôte. Il y a de nombreuses voies possibles représentées ici, qui décrivent l'interaction entre immunoediting de la tumeur et la tolérance. (d'après (Manjili, 2011))

En fonction de l'hétérogénéité des cellules tumorales et de la balance entre les cellules ne présentant pas de danger pour le système immunitaires (portant des protéines normales, ne causant pas de dommages tissulaires, ...) et les cellules en présentant, plusieurs mécanismes sont possibles. Parmi ces mécanismes on compte les trois E (Elimination, Equilibre et Echappement) mais aussi la tolérance soit innée par l'absence de danger soit induite par immunosuppression. Cette tolérance est la cible de nouvelles thérapies visant à réorienter le système immunitaire vers les mécanismes de l'immunosurveillance et ainsi l'élimination des cellules tumorales (Lesokhin et al., 2015).

2. Les mécanismes de l'immunosurveillance du cancer

L'immunosurveillance, premier des trois E (Elimination), reste donc d'actualité dans le champ de recherche en cancérologie. Il est possible de résumer en quatre étapes cette phase d'initiation de la réponse immunitaire face aux cellules transformées (**FIGURE 4**).

Lorsque le nombre de cellules transformées atteint un seuil critique, encore à déterminer, les lymphocytes de l'immunité innée Natural Killer (NK), lymphocytes T natural killer (NKT) et lymphocytes $T\gamma\delta$ s'activent et sécrètent de l'interféron- γ (IFN- γ) (**FIGURE 4 A**).

L'IFN- γ ainsi produit initie une cascade de réactions immunitaires innées qui impliquent plusieurs mécanismes. Le premier est l'induction de chémokines, notamment les chémokines angiostatiques CXCL10, CXCL9 et CXCL11. Ces chémokines ont le double intérêt de bloquer la néovascularisation de la tumeur et de permettre le recrutement de cellules immunitaires effectrices vers le site de la tumeur (cellules NK, cellules dendritiques, macrophages,...). Le second mécanisme est l'action antiproliférative directe de l'IFN- γ sur la tumeur en développement qui passe par le blocage du cycle cellulaire (Platanias and Fish, 1999). Enfin, l'IFN- γ potentialise l'activité cytotoxique des macrophages et des cellules NK infiltrant la tumeur. Tous ces événements conduisent à la mort des cellules tumorales par des mécanismes immunologiques et non immunologiques. Ces cellules tumorales mortes ou leurs débris sont alors captés par les cellules dendritiques qui migrent vers le ganglion lymphatique de drainage (**FIGURE 4 B**).

La croissance tumorale est tenue en échec par les activités cytotoxiques des cellules NK et des macrophages activés tandis que les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques pour des antigènes tumoraux se développent dans le ganglion lymphatique drainant (**FIGURE 4 C**).

Enfin, les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques infiltrent la tumeur le long d'un gradient de chémokines où ils reconnaissent et détruisent les cellules tumorales exprimant des antigènes tumoraux (**FIGURE 4 D**).

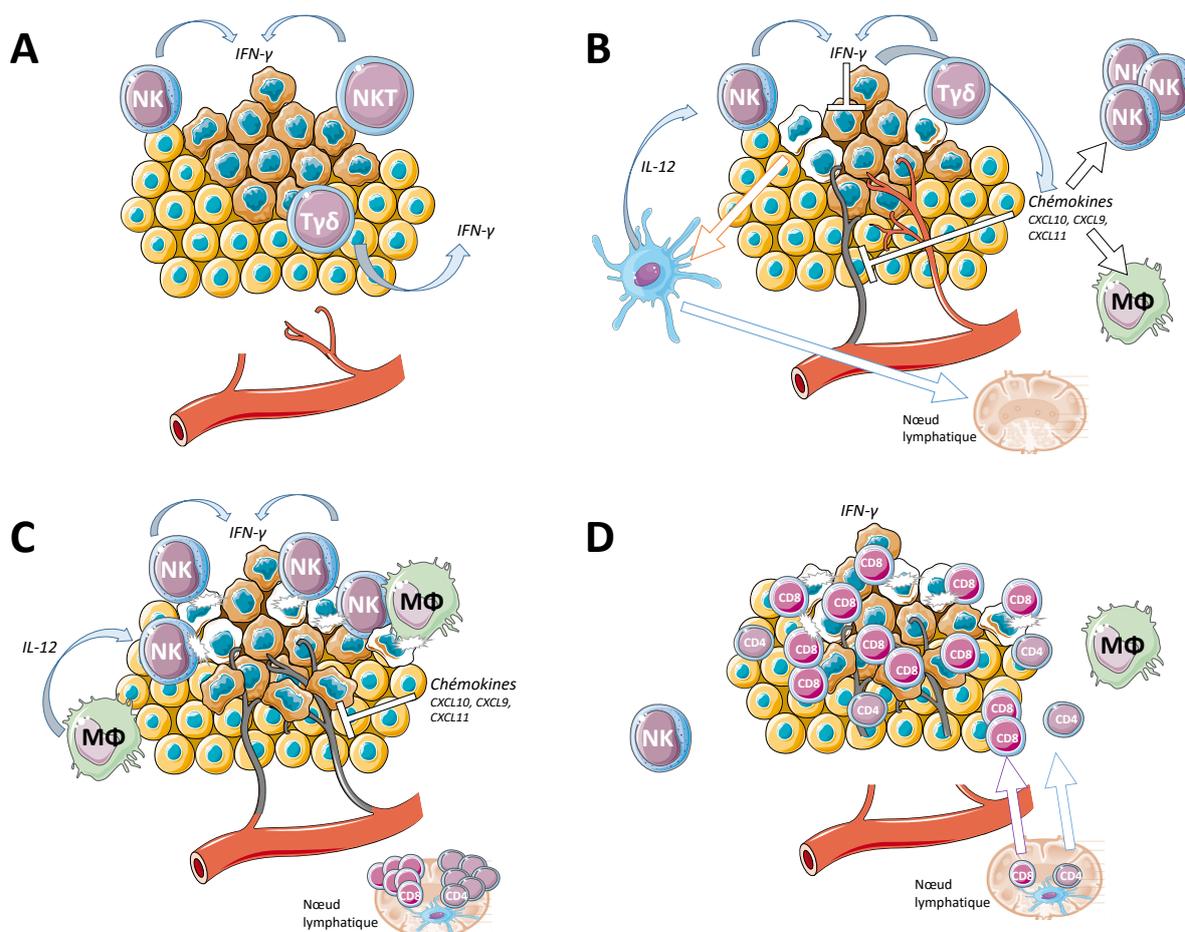


Figure 4 Modèle proposé pour la phase d'élimination du processus d'immunoediting du cancer. (A) Initiation de la réponse pendant laquelle les lymphocytes de l'immunité innée (cellules NKT, NK et $T\gamma\delta$) reconnaissent les cellules transformées et sont stimulés pour produire de l'interféron (IFN)- γ .

(B) L'IFN- γ initie alors une cascade de réactions immunitaires innées qui impliquent (1) l'induction de chémokines, y compris les chémokines angiostatiques (CXCL10, CXCL9 et CXCL11) bloquant la néovascularisation de la tumeur et permettant le recrutement de cellules immunitaires effectrices vers le site de la tumeur (cellules NK, cellules dendritiques, macrophages,...). (2) une action antiproliférative directe de l'IFN- γ sur la tumeur en développement et (3) l'activation de l'activité cytotoxique des macrophages et des cellules NK infiltrant la tumeur. Ces événements conduisent à la mort des cellules tumorales par des mécanismes immunologiques et non immunologiques. Ces cellules tumorales mortes ou leurs débris sont captés par les cellules dendritiques qui migrent vers le ganglion lymphatique de drainage.

(C) La croissance tumorale est tenue en échec par les activités cytotoxiques des cellules NK et des macrophages activés tandis que les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques pour des antigènes tumoraux se développent dans le ganglion lymphatique drainant.

(D) Les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques infiltrent la tumeur le long d'un gradient de chémokines où ils reconnaissent et détruisent les cellules tumorales exprimant des antigènes tumoraux.

Cellules tumorales (marron); Cellules non transformées (jaune); Cellules tumorales mortes (blanches); Lymphocytes Natural Killer (NK), NKT, $T\gamma\delta$, cellules dendritiques et macrophages (M Φ). Modifié d'après (Dunn et al., 2002).

Bien comprendre cette étape clef de reconnaissance des cellules transformées et de leur cytolyse est nécessaire pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses basées sur l'utilisation de ces mécanismes du système immunitaire.

a. Acteurs de la première reconnaissance des cellules transformées

Les cellules de l'immunité innée jouent un rôle primordial dans l'initiation des mécanismes d'immunosurveillance permettant la reconnaissance puis la destruction des premières cellules transformées dont les débris seront captés par les cellules dendritiques et initieront la réponse spécifique du système immunitaire adaptatif.

- **Les cellules NK**

Les cellules NK, caractérisées en 1978 par Herberman et Holden (Herberman and Holden, 1978) sont de grands lymphocytes granuleux n'appartenant pas aux lignées T et B ($CD3^- CD19^-$), caractérisés chez l'homme par les marqueurs CD56 et CD16. Ces cellules ont été initialement identifiées par leur capacité à tuer des cellules tumorales. Depuis lors, l'effet anti-tumoral des cellules NK a été documenté dans de nombreux modèles et instances. Une caractéristique importante des cellules NK est leur capacité à distinguer les cellules stressées (telles que les cellules tumorales, les cellules infectées et les cellules qui ont subi des blessures physiques ou chimiques) des cellules saines (Smyth et al., 2002a). Cette capacité repose sur une balance de signaux inhibiteurs transmis par des récepteurs membranaires inhibiteurs (NKG2A reconnaissant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (Parham, 2005), NKRP1A, ...) et de signaux transmis par des récepteurs membranaires activateurs (NKG2D interagissant avec des molécules du soi régulées positivement par les cellules stressées, les récepteurs de la famille Natural Cytotoxicity Receptors (NCR),...). Les cellules NK sont tolérantes vis-à-vis des cellules saines car la force des signaux d'activation qu'ils reçoivent en rencontrant ces cellules est contrebalancée par l'engagement de récepteurs inhibiteurs comme NKG2A avec le CMH de classe I (**FIGURE 5, HAUT**). La reconnaissance des cellules tumorales peut se faire de

deux façons, la première repose sur l'absence de présentation du « soi », les cellules transformées peuvent en effet perdre l'expression des molécules du CMH de classe I. Les cellules NK sont alors activées en réponse, libérées du signal inhibiteur délivré par le CMH de classe I (FIGURE 5, CENTRE). En outre, les cellules NK peuvent être activées par la reconnaissance de cellules stressées, qui surexpriment des ligands d'activation MICA (MHC class I polypeptide-related séquence A) ou MICB, surmontant ainsi la signalisation inhibitrice des molécules du CMH de classe I (FIGURE 5, BAS).

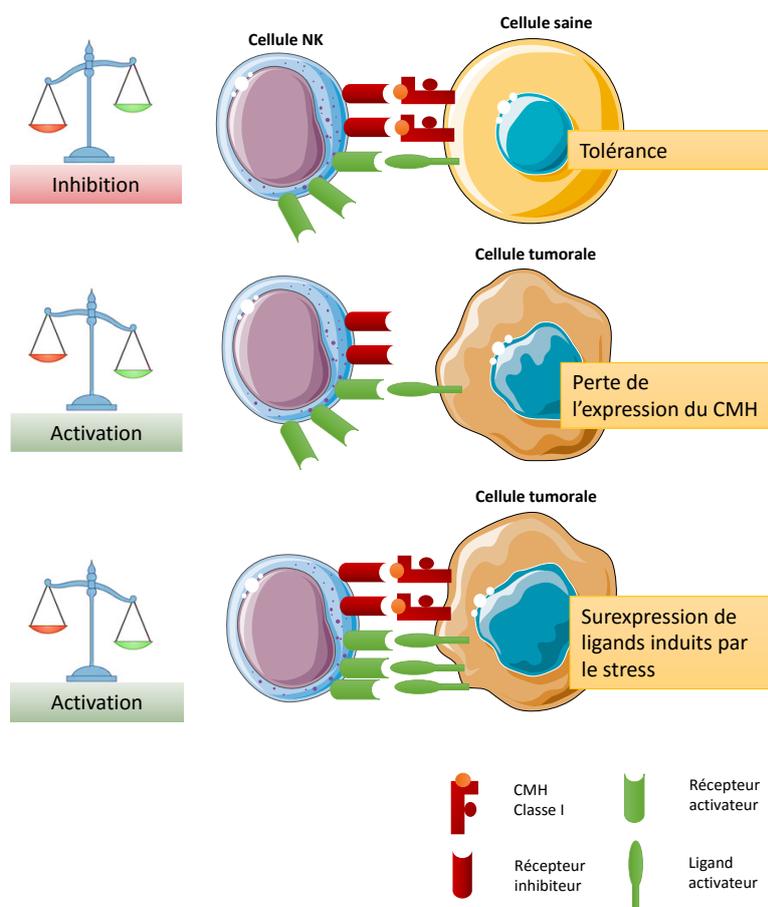


Figure 5 Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK. Les cellules NK sont tolérantes vis-à-vis des cellules saines, la force des signaux d'activation qu'elles reçoivent en rencontrant ces cellules est contrebalancée par l'engagement de récepteurs inhibiteurs avec le CMH de classe I (haut). Les cellules tumorales peuvent perdre l'expression des molécules du CMH de classe I (centre). Les cellules NK sont alors activées en réponse, libérées du signal inhibiteur délivré par le CMH de classe I (centre). En outre, les cellules NK sont activées par des cellules stressées, qui surexpriment des ligands d'activation pour les cellules NK, surmontant ainsi la signalisation inhibitrice des molécules du CMH de classe I (bas). D'après (Vivier et al., 2012).

- **Les lymphocytes T Natural Killer (NKT)**

Si cette population hétérogène de lymphocytes exprime des marqueurs de cellules NK, elle porte également un récepteur des cellules T : le TCR $\alpha\beta$. Cependant, ce récepteur possède une diversité très réduite par rapport aux lymphocytes T $\alpha\beta$, et ne reconnaît pas des complexes CMH/peptides, mais des lipides et glycolipides présentés par des molécules ressemblant au CMH. La sous-population la plus étudiée est les NKT de type I ou NKT invariants (iNKT) dont le TCR est restreint pour la molécule CMH-like CD1d.

Les données récentes confirment le rôle des cellules iNKT dans l'immunosurveillance du cancer. Un rôle protecteur des cellules iNKT a ainsi été démontré dans plusieurs modèles de tumeurs (Smyth et al., 2000; Swann et al., 2009). En outre, leur absence prédispose au développement du cancer et leur production d'IFN- γ favorise probablement l'activation des cellules NK. Si ces résultats suggèrent que les cellules iNKT sont déterminantes pour l'immunosurveillance de la tumeur, les cellules NKT de type II ne sont pas indispensables.

Il est possible d'activer les cellules iNKT avec des agonistes puissants, tels que α GalCer, conduisant à de fortes réponses anti-tumorales chez les souris. Cependant, dans ce cas, la contribution de cellules iNKT à la réponse anti-tumorale est indirecte et est médiée par les cellules NK et par l'action de l'IFN- γ , plutôt que par le ciblage direct des cellules cancéreuses par des mécanismes cytotoxiques (Smyth et al., 2002b). La reconnaissance directe de cellules tumorales exprimant CD1d par les cellules iNKT a été démontrée *in vitro*. CD1d est exprimé sur des cellules de leucémie myélomonocytaire, et il a été montré que ces cellules sont sensibles à la lyse par des NKT humaines (Metelitsa et al., 2003).

Cependant, on ne sait pas comment les cellules iNKT distinguent l'expression de CD1d sur les cellules malignes de l'expression de CD1d sur les cellules normales. Bien que l'expression CD1d ait été démontrée sur des cellules hématopoïétiques malignes humaines, la plupart des tumeurs solides et des modèles de lignées cellulaires n'expriment pas ou seulement faiblement CD1d, ce qui suggère un mécanisme d'activation indirect par des cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques, macrophages, ...) (Shimizu et al., 2007; Wu et al., 2003).

- **Les lymphocytes T $\gamma\delta$**

Porteurs d'un TCR $\gamma\delta$ ces cellules sont des lymphocytes T non-conventionnels participant à la fois à la réponse immunitaire innée et adaptative. Suivant les sous-populations, ce TCR est capable de reconnaître CD1d ou des phospho-antigènes (Adams et al., 2015).

Ces trois types cellulaires (NK, NKT et lymphocytes T $\gamma\delta$) capables de reconnaître les cellules transformées vont alors ralentir la prolifération de ces dernières et recruter sur la zone de nouveaux partenaires par la sécrétion d'INF- γ . Ils mettent également en place des mécanismes de cytotoxicité qui permettront l'inflammation, la présence de signaux de danger et l'activation de l'immunité adaptative.

b. Mécanismes de cytotoxicité dans l'immunosurveillance

Les mécanismes de cytotoxicité mis en jeu lors des premiers temps de l'immunosurveillance conduisent tous à l'apoptose de la cellule tumorale ciblée.

L'apoptose est le mécanisme majeur de la mort cellulaire programmée utilisé par les organismes métazoaires pour éliminer les cellules superflues ou irrémédiablement endommagées (Danial and Korsmeyer, 2004). Elle joue un rôle primordial dans la formation des organes au cours du développement et dans le contrôle de l'homéostasie et de l'intégrité des tissus tout au long de la vie (Chowdhury et al., 2006; Meier et al., 2000). L'apoptose peut être déclenchée par une grande variété de stimuli (stress cellulaire sévère, détérioration de composants cellulaires essentiels suite à un choc thermique ou un rayonnement, médicaments cytotoxiques, infection virale ou transformation oncogénique).

Dans les cellules de mammifères, l'induction de l'apoptose se produit par deux voies distinctes : les voies intrinsèque et extrinsèque. La voie intrinsèque est activée par les événements intracellulaires et dépend de la libération de facteurs pro-apoptotiques des mitochondries (Danial and Korsmeyer, 2004).

La voie extrinsèque reçoit des signaux à travers la liaison de ligands extracellulaires de protéines à des récepteurs de mort, situés sur la surface des cellules (Ashkenazi and Dixit, 1998).

Ces deux voies mènent à l'activation hiérarchique de protéases cystéine-aspartate spécialisées appelées caspases (Li and Yuan, 2008). Les signaux pro-apoptotiques activent tout d'abord les caspases initiatrices, les caspase-2, -8, -9 et -10, en induisant leur oligomérisation (Chen et al., 2002). Une fois stimulées, les caspases initiatrices activent par clivage les caspases effectrices en aval, y compris les caspase-3, -6 et -7, qui à leur tour vont cliver de nombreuses protéines cellulaires essentielles. Cela conduit aux caractéristiques morphologiques et biochimiques uniques de l'apoptose, telles que le bourgeonnement de la membrane plasmique, le rétrécissement cellulaire, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN internucléosomal.

- **Le système Perforine – Granzyme B**

Le premier mécanisme d'induction de l'apoptose des cellules transformées par les cellules NK, NKT et $T\delta\gamma$ est le système de sécrétion de perforine et granzyme B (Cao et al., 2007). Le contact entre ces cellules et leurs cibles résulte en la formation d'une "synapse immunologique" composée des récepteurs activateurs NK et de leurs ligands. Cette synapse immunologique induit la phosphorylation de protéines de signalisation à proximité de la membrane plasmique et la formation d'un complexe de signalisation qui va activer l'exocytose de granules lytiques contenant de la perforine et du granzyme B au niveau de la synapse vers la membrane plasmique de la cellule cible (Krzewski and Strominger, 2008).

La perforine libérée s'insère dans la membrane plasmique et les vésicules d'endocytose de la cellule cible et forme un pore en se polymérisant (Law et al., 2010). Ce pore permet au granzyme B de pénétrer dans le cytoplasme de la cellule cible et de provoquer l'apoptose par la voie intrinsèque de l'apoptose, notamment par le clivage de BH3 interacting-domain death agonist (BID).

- **La présentation de cytokines pro-apoptotiques de la superfamille du Tumor Necrosis Factor (TNF)**

Le second mécanisme d'induction de l'apoptose des cellules tumorales repose sur la présentation par les cellules immunitaires effectrices de cytokines pro-apoptotiques de la superfamille du TNF.

La superfamille des ligands du TNF comprend 18 des gènes codant pour 19 protéines transmembranaires de type II (extrémité N-terminale intracellulaire et C-terminale extracellulaire) caractérisée par un domaine C-terminal conservé dénommé «Domaine d'Homologie du TNF» (THD). Ce domaine trimérique est responsable de la liaison au récepteur et son homologie de séquence entre les différents membres de la famille est de 20 à 30% (Bodmer et al., 2002). Bien que la plupart des ligands soient synthétisés sous forme de protéines liées à la membrane, des formes solubles peuvent être générées par protéolyse limitée. Des protéases distinctes selon le ligand sont impliquées dans ce processus : des métalloprotéinases de la famille ADAM (a disintegrin and metalloproteinase domain) pour le TNF et RANK-L (Receptor Activator of Nuclear factor kappa-B Ligand), la matrilysine pour Fas ligand (Fas-L), ou une cystéine protéase pour TNF Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) (Kimberley and Screaton, 2004). Si la solubilisation est essentielle pour la fonction physiologique de certains ligands (LymphoToxine- α (LT- α), TNF-like ligand 1A (TL1A)), pour d'autres le clivage inhibe leur fonction. Par exemple, l'activité cytotoxique de Fas-L est considérablement régulée à la baisse suite à son clivage (Tanaka et al., 1998). Ces différents ligands contrôlent et orchestrent les réponses immunitaires et inflammatoires à plusieurs niveaux (Locksley et al., 2001), notamment par l'induction de l'apoptose en se fixant sur des récepteurs de mort de la superfamille du TNF-récepteur (TNF-R).

Il existe sept récepteurs de mort appartenant à cette superfamille (**FIGURE 6**).

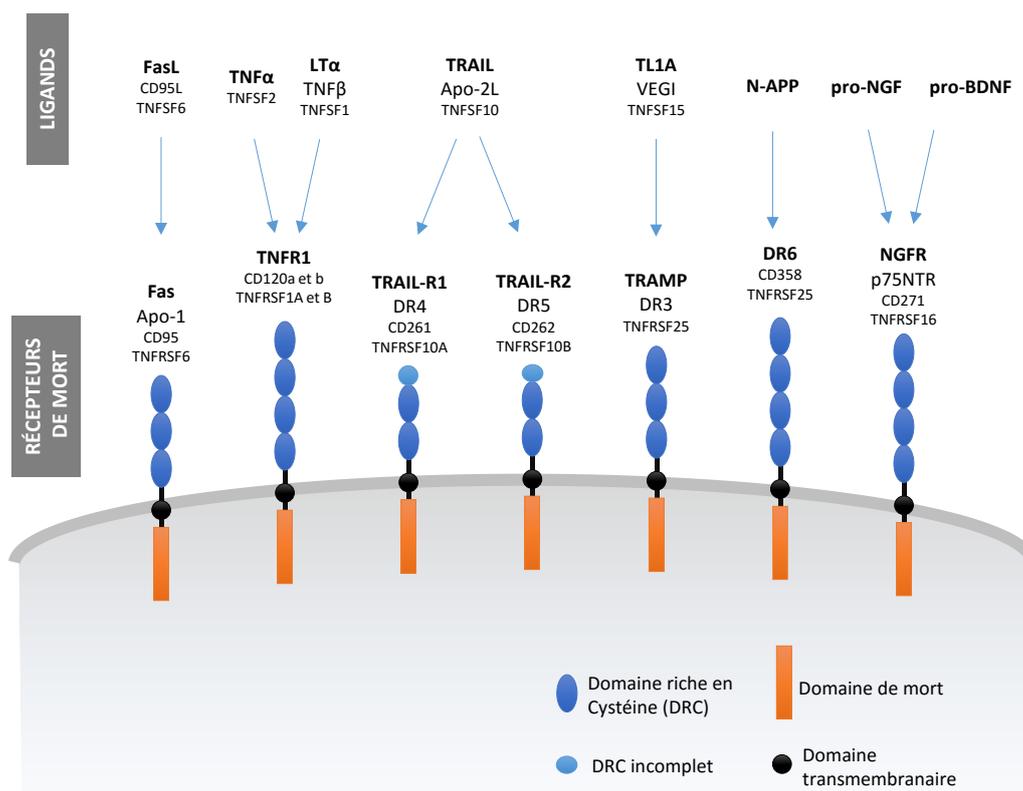


Figure 6 Récepteurs de mort de la superfamille du TNF-récepteur (TNFRSF) et leurs ligands.
FasL : Fas Ligand ; LT : Lymphotoxine ; TRAIL : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand ; TL1A : TNF-like ligand 1A ; VEGI : Vascular endothelial growth inhibitor ; NGF : Nerve growth factor ; BDNF : Brain-derived neurotrophic factor ; DR4/5/6 : Death Receptor 4/5/6 ; TRAMP : TNF receptor-related apoptosis-mediating protein ; N-APP : fragment N-terminal de l’Amyloid Precursor Protein ; NGFR : Nerve growth factor receptor ; p75NTR : p75 neurotrophin receptor.

Dans le cadre de l’immunosurveillance du cancer, les cellules immunitaires effectrices peuvent présenter les cytokines Fas-L (CD95L – TNFSF6), TNF α (TNFSF2) et TRAIL (Apo-2L – TNFSF10), qui vont se fixer sur les récepteurs de mort présents à la surface des cellules tumorales, respectivement Fas (Apo-1 – CD95 – TNFRSF6), TNFR1 (CD120) et les deux récepteurs de mort de TRAIL : TRAIL-R1 (DR4 – CD261 – TNFRSF10A) et TRAIL-R2 (DR5 – CD262 – TNFRSF10B). La fixation des ligands sur leurs récepteurs induit l’apoptose de la cellule par la voie extrinsèque de l’apoptose (**FIGURE 7**).

La fixation du TNF α ou de la LT α sur TNFR1 induit sa trimérisation et, en l’absence d’inhibiteurs cellulaires de l’apoptose (protéines c-IAP), inhibe l’ubiquitination de receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1). Cela conduit à l’association des protéines RIPK1, TRADD (TNFR1-associated death domain protein), TRAF2 (TNF-receptor-associated factor 2), FADD (Fas-associated with death domain) et la pro-caspase-8 pour former le complexe pro-apoptotique cytoplasmique dans le cytosol, ce qui

promeut l'activation de la caspase-8 par clivage. La fixation de TRAIL ou FasL sur leurs récepteurs de mort trimérisés induit le recrutement de la protéine adaptatrice FADD puis le recrutement et l'activation des pro-caspases-8 et -10 par clivage dans le complexe membranaire DISC (Death-inducing signaling complex). Dans les deux cas, la caspase-8 active la caspase-3 effectrice de l'apoptose.

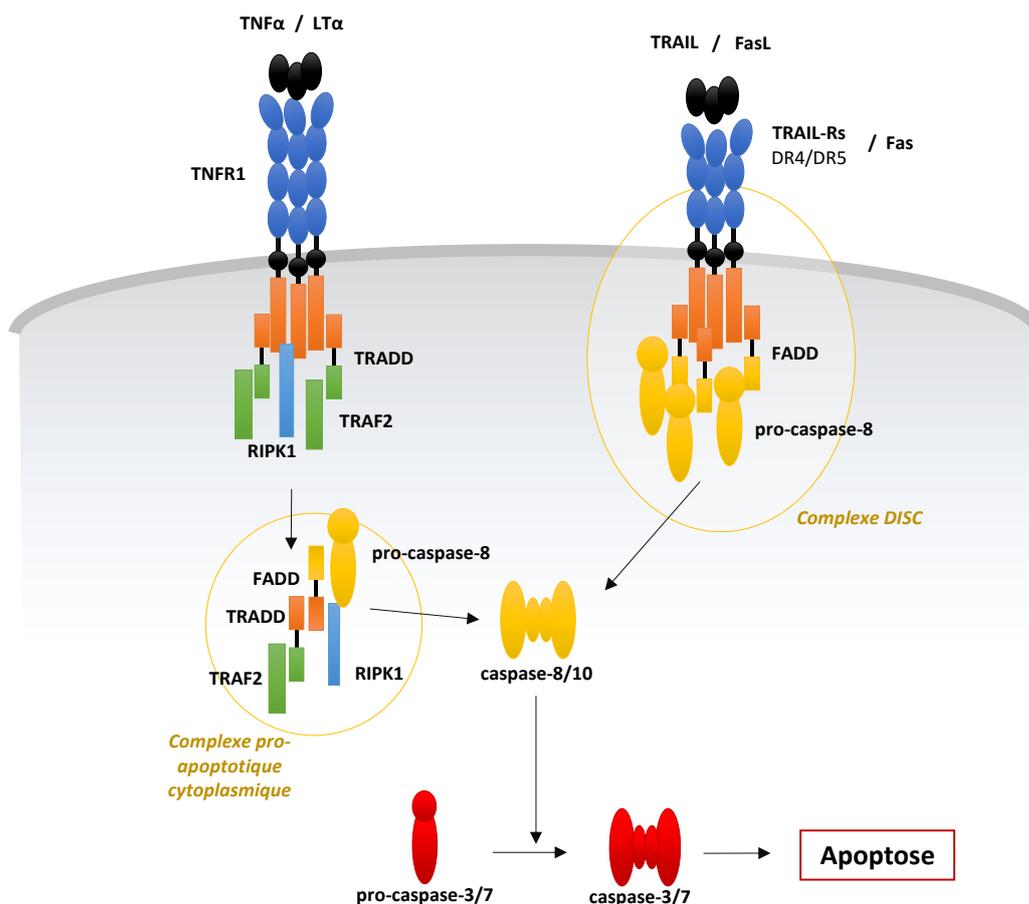


Figure 7 Voie extrinsèque de l'apoptose induite par la fixation du TNF, de FasL ou de TRAIL sur leurs récepteurs de mort. La fixation du TNF sur TNFR1, en l'absence d'inhibiteurs cellulaires de l'apoptose (c-IAP), élimine l'ubiquitination de receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1). Ceci conduit à l'association des protéines RIPK1, TRADD (TNFR1-associated death domain protein), TRAF2 (TNF-receptor-associated factor 2), FADD (Fas-associated with death domain) et la pro-caspase-8 pour former le complexe pro-apoptotique cytoplasmique dans le cytosol, ce qui promeut l'activation de la caspase-8 par clivage. La fixation de TRAIL ou FasL sur leurs récepteurs de mort trimérisés induit le recrutement de la protéine adaptatrice FADD puis le recrutement et l'activation des pro-caspases-8 et -10 par clivage dans le complexe membranaire DISC (Death-inducing signaling complex). Dans les deux cas, la caspase-8 active la caspase-3 effectrice de l'apoptose.

Cette voie extrinsèque de l'apoptose peut être amplifiée par l'induction parallèle de la voie intrinsèque de l'apoptose (**FIGURE 8**). Dans ce cas, La caspase-8 active clive BID (BH3 interacting-domain death agonist) en BID tronqué (tBID). tBID perturbe la membrane mitochondriale externe avec l'aide des protéines BAX (Bcl-2-associated X protein) Apoptotic protease activating factor 1 et BAK (Bcl-2 homologous antagonist killer) pour provoquer la libération du facteur pro-apoptotique cytochrome c (Martinou and Green, 2001). Le cytochrome c ainsi libéré de l'espace inter-membranaire se lie à APAF1 (Apoptotic protease activating factor 1), qui recrute la pro-caspase-9 pour former l'apoptosome, dans lequel la caspase-9 est autocatalytiquement activée et peut à son tour activer la caspase-3.

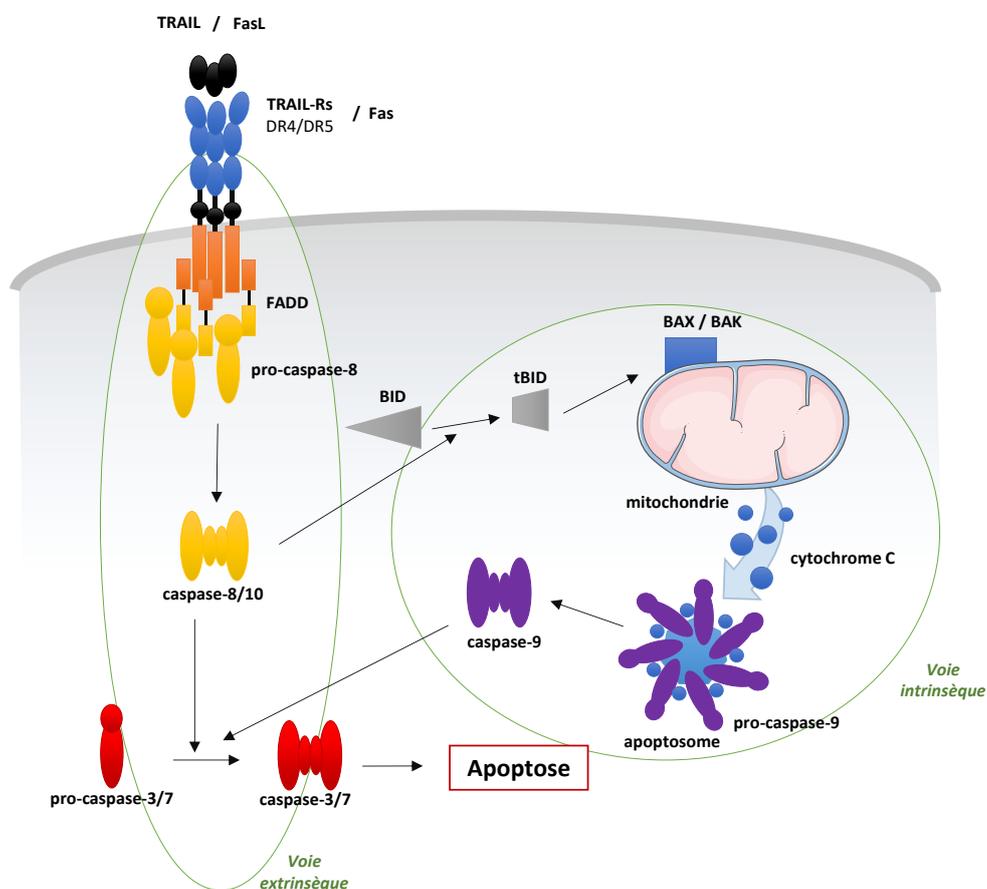


Figure 8 Amplification de l'apoptose induite par la fixation des cytokines de la superfamille du TNF sur leurs récepteurs de mort par l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. L'activation de la caspase-8 de la voie extrinsèque de l'apoptose peut induire le clivage de BID (BH3 interacting-domain death agonist) en BID tronqué (tBID). tBID perturbe la membrane mitochondriale externe avec l'aide des protéines BAX (Bcl-2-associated X protein) et BAK (Bcl-2 homologous antagonist killer) pour provoquer la libération du facteur pro-apoptotique cytochrome c. Le cytochrome c ainsi libéré de l'espace intermembranaire se lie à APAF1 (Apoptotic protease activating factor 1), qui recrute la pro-caspase-9 pour former l'apoptosome, dans lequel la caspase-9 est autocatalytiquement activée et peut à son tour activer la caspase-3.

Parmi les différents ligands pro-apoptotiques impliqués dans l'immunosurveillance du cancer, TRAIL a émergé comme un candidat prometteur pour le traitement du cancer, en vertu de sa capacité, notamment sous forme homotrimérique soluble, à induire l'apoptose de nombreux types de cellules cancéreuses sans toxicité importante envers les cellules normales (Ashkenazi et al., 1999; Lawrence et al., 2001).

3. TNF Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) un candidat prometteur en cancérologie

Ce membre de la superfamille du TNF a été découvert suite au projet de séquençage du génome humain en 1995 par deux équipes indépendantes qui ont rapporté, outre sa capacité à induire l'apoptose, une homologie de séquence avec le domaine extracellulaire de deux autres cytokines pro-apoptotiques, Fas-Ligand (28%) et le TNF (23%) (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). Le gène *TRAIL*, localisé sur le chromosome 3, qui code pour la cytokine TRAIL est composé de cinq exons pour une taille de 20kb. Si l'ARN messager de *TRAIL* a été détecté de façon constitutive dans tous les tissus humains, avec une expression plus importante dans la rate et la prostate (Wiley et al., 1995), TRAIL est exprimé spécifiquement à la surface des cellules immunitaires NK, des lymphocytes T cytotoxiques, des NKT, des macrophages et des cellules dendritiques notamment après une induction par l'IFN- γ (Almasan and Ashkenazi, 2003).

a. TRAIL et ses récepteurs

Chez l'homme, TRAIL peut se fixer à cinq récepteurs, deux récepteurs de mort membranaires : DR4 (TRAIL-R1 ; TNFSFR10A) et DR5 (TRAIL-R2 ; TNFRSF10B) pouvant transduire le signal d'apoptose et trois récepteurs leurres (Decoy Receptor : DcR) : les récepteurs membranaires DcR1 (TRAIL-R3, TNFRSF10C) et DcR2 (TRAIL-R4 ; TNFRSF10D) et le récepteur soluble Ostéoprotégérine (OPG).

- **Les récepteurs de mort de TRAIL**

DR4 et DR5 sont des protéines transmembranaire de type I présentant un domaine de mort (Death Domain : DD) dans leur partie intracytoplasmique capable de lier d'autres domaines de mort. Pendant longtemps, il a été supposé que les récepteurs de mort étaient retrouvés au niveau de la membrane sous forme monomérique et que la fixation du ligand trimérique induisait leur trimérisation.

Cependant, plusieurs indices laissent penser que ces récepteurs seraient déjà multimériques avant la fixation de TRAIL (Chan, 2007).

L'expression de DR4 et DR5 est régulée par la protéine p53 (Nimmanapalli et al., 2001). Ainsi, le gène codant pour DR5 expose dans son promoteur un élément de réponse à p53 et il est surexprimé en réponse à une irradiation aux rayons gamma par l'intermédiaire de p53 (Burns et al., 2001; Takimoto and El-Deiry, 2000). Des régulations post-traductionnelles des récepteurs DR4 et DR5 telles que la glycosylation et la palmitoylation ont par ailleurs été montrées comme étant des régulateurs importants de la signalisation induite par TRAIL.

Ainsi, il existe une corrélation entre l'expression de l'enzyme initiateur de la glycosylation GALNT14 et la sensibilité à TRAIL de cellules de carcinome pancréatique, de cancer du poumon et de mélanome (Gonzalez and Ashkenazi, 2010). Ces O-glycosylations ne semblent cependant pas altérer l'expression de DR4 et de DR5 à la membrane, ni leur affinité pour TRAIL. Elles sembleraient en revanche avoir une incidence sur l'oligomérisation des récepteurs en réponse à la fixation de TRAIL, celle-ci étant nécessaire à la formation du complexe DISC et à l'activation de la caspase-8.

Concernant la palmitoylation, elle serait nécessaire à la localisation de DR4 dans les radeaux lipidiques, permettant sa trimérisation en absence de ligand mais l'effet de son inhibition sur la sensibilité à TRAIL des cellules tumorales n'a pas été encore montré (Rossin et al., 2009). La fixation d'un ligand sur ses récepteurs induit souvent une endocytose du complexe ligand-récepteur et le rôle de cette internalisation a été récemment étudié en ce que concerne la voie de signalisation de TRAIL. Après fixation de TRAIL, DR4 et DR5 sont tous deux internalisés par un mécanisme dépendant de la dynamine. Le rôle biologique de cette endocytose est toujours mal connu et son inhibition ne semble pas influencer sur l'induction de l'apoptose induite par TRAIL (Austin et al., 2006; Kohlhaas et al., 2007).

- **Les récepteurs leurres membranaires**

L'affinité de TRAIL pour ces récepteurs leurres est moindre que pour les récepteurs de mort (Clancy et al., 2005).

L'expression de DcR1 et DcR2 peut prévenir l'induction de l'apoptose dans différentes lignées humaines tumorales telles que les lignées de lymphome, de carcinome du rein, du sein et de la prostate

(Riccioni et al., 2005; Sanlioglu et al., 2007a, 2007b) mais leur implication dans la résistance à TRAIL reste controversée (Griffith et al., 1998). Concernant leur mode d'action, DcR1 est un récepteur avec un ancrage GlycoPhosphatidyInositol (GPI) sans domaine intracellulaire et donc capable de séquestrer TRAIL dans les radeaux lipidiques.

DcR2 possède un domaine de mort tronqué et peut interagir avec DR5 pour former un hétérotrimère au niveau du complexe DISC pour inhiber l'activation de la caspase-8 (Mérino et al., 2006). Cette interaction aurait lieu en amont de l'interaction avec TRAIL (Clancy et al., 2005).

b. Voie de signalisation apoptotique de TRAIL

La fixation de TRAIL sur ses récepteurs de mort DR4 ou DR5 trimériques induit le changement de conformation de leur domaine de mort ce qui représente l'activation fonctionnelle du récepteur. Cette activation induit le recrutement de FADD par interaction de leur domaine de mort respectif. La protéine adaptatrice FADD va permettre le recrutement des pro-caspase-8 ou -10 par interaction de leur Death Domains (DD) respectifs. Ce complexe DISC ainsi formé conduit à l'apoptose par la voie extrinsèque, ce mécanisme est amplifié dans certains types cellulaires par l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Cependant, il existe des inhibiteurs de l'apoptose contrôlant l'activation des effecteurs à tous les niveaux des deux voies apoptotiques (**FIGURE 9**).

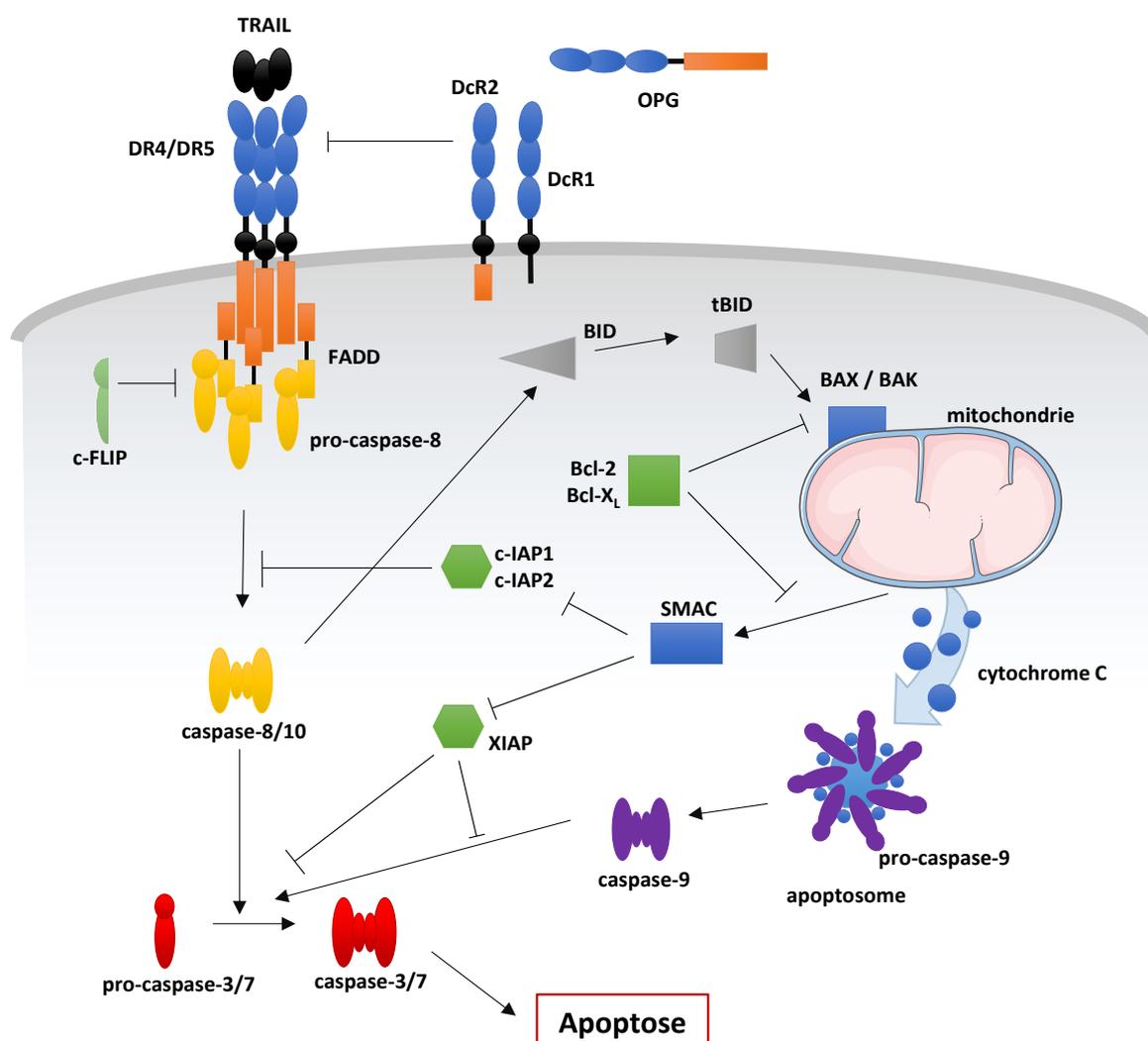


Figure 9 Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose induite par la fixation de TRAIL sur ses récepteurs de mort DR4 et DR5. **Effecteurs de l'apoptose** : TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) ; DR4/5 (Death Receptor 4/5) ; FADD (Fas-associated with death domain) ; caspase-8 et 10 ; caspase 3 et 7 ; BID (BH3 interacting-domain death agonist) ; tBID (truncated BID) ; BAX/BAK (Bcl-2-associated X protein/Bcl-2 homologous antagonist killer) ; SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases). **Inhibiteurs de l'apoptose** : DcR1/2 (Decoy Receptor 1/2) ; OPG (Ostéoprotégérine) ; c-FLIP (cellular-FLICE-like inhibitory protein) ; c-IAP1/2 (cellular inhibitor of apoptosis protein-1/2) ; Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ; Bcl-X_L (Bcl-extra large) ; XIAP (X-linked IAP).

- **Inhibiteurs de la voie extrinsèque de l'apoptose**

Le premier niveau d'inhibition de la voie extrinsèque de l'apoptose induite par TRAIL est la présence de récepteurs leurres à la surface de la cellule cible ou dans l'environnement.

Le second niveau d'inhibition est représenté par la protéine c-FLIP (cellular FLICE (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme)-like inhibitory protein) qui est un homologue des caspases initiatrices 8 et 10 et leur principal inhibiteur. c-FLIP peut être exprimée sous trois isoformes différentes dans les cellules humaines et n'ont pas la même activité biologique (Shirley and Micheau, 2013). c-FLIP_S (Short) et c-FLIP_R (Raji) sous deux isoformes courtes qui ne contiennent que les domaines effecteurs de mort (DED) à l'extrémité N-terminale. c-FLIP_L (Long) possède en plus un domaine protéolytique homologue aux caspases. En l'absence de c-FLIP, la dimérisation de la procaspase-8 induit l'activation complète de la caspase-8, conduisant à l'apoptose. En présence des isoformes courtes de c-FLIP qui se fixent par compétition à FADD, la procaspase-8 reste le plus souvent non clivée et donc non fonctionnelle. Lorsque la protéine c-FLIP_L est présente, la procaspase-8 forme des hétérodimères avec lui limitant l'autoprotéolyse mais ne l'abolissant pas. L'hétérodimère actif reste associé dans le complexe membranaire DISC où il peut cliver un certain nombre de substrats, pouvant conduire à l'activation de voies de signalisation non apoptotiques telles que celle de ERK (Micheau et al., 2002). Pour les deux types d'isoformes, longue et courtes, c-FLIP empêche l'apoptose induite par la fixation de TRAIL sur ses récepteurs de mort.

Enfin, les protéines c-IAP1 (BIRC2) et c-IAP2 (BIRC3) (cellular inhibitor of apoptosis protein 1 et 2) sont aussi des inhibiteurs de la voie extrinsèque de l'apoptose. Elles sont capables de se fixer sur les caspases mais il semble peu probable qu'elles inhibent directement la caspase-8, elles agissent indirectement sans doute par plusieurs mécanismes encore méconnus (Silke and Vucic, 2014).

- **Inhibiteurs de la voie intrinsèque de l'apoptose**

Les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Bcl-2 elle-même et Bcl-X_L (Bcl-extra large) sont des inhibiteurs de la voie intrinsèque de l'apoptose. Localisées dans la membrane mitochondriale, elles empêchent l'homodimérisation de BAX et de BAK et ainsi la libération du cytochrome c et l'activation de SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases).

La protéine XIAP est le membre de la famille des Protéines Inhibitrices de l'Apoptose le plus étudié. Il est capable d'inhiber à la fois les caspases initiatrices (caspase-9) et effectrices (caspase-3 et -7) activées dans la voie intrinsèque de l'apoptose, notamment dans le cadre de l'apoptosome : inhibition

du complexe Apaf-1 - caspase-9 - caspase-3 activé par la libération du cytochrome c à partir de l'espace inter-membranaire des mitochondries (Bratton et al., 2002).

c. Intérêt et limites de cibler la voie de l'apoptose extrinsèque de TRAIL dans le cancer

Il a été montré que TRAIL ne jouait pas ou très peu de rôle dans le développement embryonnaire, dans des modèles de zébrafish (Eimon et al., 2006) et murins (Cretney et al., 2002; Diehl et al., 2004). Les souris déficientes pour la forme murine de TRAIL ou pour son unique récepteur murin se développent ainsi normalement. Exprimé spécifiquement à la surface de cellules immunitaires, son rôle physiologique semble donc principalement lié à l'immunosurveillance du cancer. La voie de TRAIL a un potentiel important pour le traitement du cancer car il semble être intact dans de nombreux types de cellules cancéreuses.

De plus, l'inactivation par mutation du gène suppresseur de tumeur p53, qui régule l'apoptose principalement par la voie intrinsèque, permet de réduire la sensibilité de nombreux cancers aux traitements classiques. Le ciblage de la voie extrinsèque de la cellule, qui déclenche une apoptose indépendante de p53, offre une stratégie thérapeutique pouvant induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses résistantes.

Cette stratégie thérapeutique a été testée de nombreuses fois dans des essais précliniques puis cliniques avec la protéine TRAIL recombinante ou avec plusieurs anticorps monoclonaux qui activent DR4 ou DR5 qui ont été développés pour induire sélectivement l'apoptose des cellules cancéreuses tout en épargnant les cellules normales.

- **Essais précliniques**

Durant les dix dernières années, la capacité de TRAIL à induire spécifiquement l'apoptose de lignées cellulaires dérivées de tumeurs solides ou hématologiques, seul ou en association avec divers agents de chimiothérapie ou des radiations, *in vitro* et *in vivo* (Ashkenazi et al., 1999; Gazitt, 1999; Kelley et

al., 2001; Marini et al., 2005; Pitti et al., 1996; Pollack et al., 2001; Song et al., 2006; Walczak et al., 1999; Wiley et al., 1995), sans effets notables sur les cellules normales en a fait un candidat majeur pour une application potentielle en oncologie. Ces résultats sur l'activité anti-tumorale spécifique de TRAIL suggèrent qu'il pourrait être un meilleur candidat pour une utilisation clinique que Fas-L ou que le TNF- α qui présentent des effets secondaires délétères *in vivo*. Cependant, l'utilisation de TRAIL comme agent thérapeutique dans des essais cliniques a été retardée en raison d'études *in vitro* ayant mis en évidence l'induction d'apoptose dans des cultures d'hépatocytes traités par une forme recombinante de TRAIL (Ganten et al., 2006; Jo et al., 2000; Lawrence et al., 2001). Cependant, toutes les formes recombinantes de TRAIL utilisées dans ces études possédaient des tags exogènes (polyhistidine, leucine zipper, isoleucine zipper ou Flag). Ces formes taguées possèdent une structure tertiaire aberrante induisant une sur-agrégation des récepteurs, responsables des effets secondaires sur les hépatocytes (Lawrence et al., 2001). Depuis, il a été montré que la forme recombinante non taguée de TRAIL induit spécifiquement l'apoptose des cellules tumorales sans effets secondaires sur les hépatocytes (Hao, 2004).

- **Essais cliniques**

De nombreux essais cliniques mettant en œuvre la voie apoptotique de TRAIL ont été réalisés dans de multiples types de cancer en utilisant la protéine TRAIL recombinante ou des anticorps monoclonaux agonistes de DR4 ou DR5 fournissant une stratégie pro-apoptotique de remplacement. Différentes classes de ces anticorps agonistes ont été produites (murine, chimérique, humanisée et humaine), leur avantage est double, d'une part leur longue demi-vie (plusieurs jours) par rapport à rhTRAIL (30-60 min)(Wiezorek et al., 2010) et d'autre part le ciblage spécifique des récepteurs de mort sans fixation des récepteurs leurres. Par conséquent, de faibles doses d'anticorps agonistes peuvent être appliquées et moins fréquemment par rapport à rhTRAIL. Un aperçu des protéines recombinantes rhTRAIL et des anticorps agonistes DR4 et DR5 développés et leurs utilisations dans des études cliniques est donné dans le **TABLEAU I**.

NOM	PHASE	TYPE TUMORAL	ANNEES	PATIENTS	FABRIQUANT	NUMERO D'ESSAI
Dulanermin	Ib	Cancer Colorectal	2006–2012	42	Genentech	NCT00671372
	I	Cancer Colorectal (Métastatique)	2009–2014	23		NCT00873756
AMG 951	II	Cancer du poumon non à petites cellules	2007–2012	213	Amgen	NCT00508625
Mapatumumab	I	Carcinome Hépatocellulaire	2008–2012	23	GSK	NCT00712855
	II	Carcinome Hépatocellulaire	2011–2014	101		NCT01258608
	II	Cancer du poumon non à petites cellules	2007–2011	111		NCT00583830
	Ib/II	Cancer du col utérin	2010–2014	9		NCT01088347
	II	Myélome multiple	2006–2010	105		NCT00315757
TRM-1	II	Cancer du poumon non à petites cellules	2005	n/a	GSK	NCT00092924
	II	Lymphome non hodgkinien	2004–2007	n/a		NCT00094848
Conatumumab (AMG655)	Ib/II	Cancer du poumon non à petites cellules	2008–2011	172	Amgen	NCT00534027
	Ib/II	Cancer colorectal (Métastatique)	2007–2011	202		NCT00625651
	Ib/II	Sarcome des tissus mous	2007–2011	134		NCT00626704
	Ib/II	Cancer pancréatique (Métastatique)	2007–2012	138		NCT00630552
	II	Cancer colorectal (Métastatique)	2009–2012	155		NCT00813605
	Ib	Lymphome	2008–2011	33		NCT00791011
	Ib/II	Cancer colorectal (Métastatique)		53		NCT00630786
CS-1008	II	Cancer pancréatique	2007–2008	65	Daiichi Sankyo Inc.	NCT00521404
Lexatumumab (HGS-ETR2)	I	Tumeurs métastatiques	2006–2011	19	HGS	NCT00428272
PRO95780	II	Cancer du poumon non à petites cellules	2007–2010	128	Genentech	NCT00480831
	II	Lymphome non hodgkinien	2008–2009	49	Genentech	NCT00517049
	I	Cancer colorectal	2007	20	Genentech	NCT00497497
	I	Cancer colorectal (Métastatique)	2009–2010	9	Genentech	NCT00851136
Tigatuzumab (CS-1008)	II	Cancer ovarien (Métastatique)	2009–2012	24	Daiichi Sankyo Inc.	NCT00945191
	II	Cancer du poumon non à petites cellules	2009–2011	109	Daiichi Sankyo Inc.	NCT00991796
	II	Carcinome Hépatocellulaire	2010–2014	160	Daiichi Sankyo Inc.	NCT01033240
	II	Cancer du sein (Métastatique)	2011–2015	66	University of Alabama, Birmingham	NCT01307891
	I	Lymphome	2007	40	Daiichi Sankyo Inc.	NCT00320827
	I	Cancer Colorectal (Métastatique)	2010–2013	21	Daiichi Sankyo Inc.	NCT01124630

Tableau I Liste des essais cliniques ciblant la voie de TRAIL

Il est encourageant de noter que ces différents produits n'ont pas montré d'effets secondaires importants et sont bien tolérés dans les études cliniques de phase précoce. Toutefois, leur potentiel thérapeutique est probablement limité par l'apparition de différents phénomènes de résistance qui ont été constatés dans un grand nombre de lignées de cellules cancéreuses humaines et des tumeurs primaires (Daniel and Wilson, 2008; Herbst et al., 2010; Leong et al., 2009; Roberts et al., 2011).

Afin d'optimiser les capacités thérapeutiques des agonistes des récepteurs de TRAIL, les phases II des essais cliniques en cours sont axées sur leur évaluation en combinaison avec diverses chimiothérapies ou thérapies ciblées (Soria et al., 2011; Thorburn et al., 2008).

II. Les tumeurs osseuses pédiatriques et leur microenvironnement

Les tumeurs osseuses primitives sont des cancers rares divisés en deux catégories : les tumeurs osseuses primitives bénignes (tumeurs à cellules géantes, chondromes, ostéomes,...) et les tumeurs osseuses primitives malignes. Ces dernières représentent moins de 1% des cancers et environ 10% de l'ensemble des tumeurs survenant à l'âge pédiatrique. Cependant, un second pic d'incidence intervient autour de 60 ans pour des tumeurs osseuses primitives malignes qui peuvent survenir suite à une pathologie du remodelage osseux, notamment la maladie de Paget. Ces tumeurs intervenant plus tardivement ont des caractéristiques différentes et ne seront pas traitées dans cette introduction.

L'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing sont les deux principales tumeurs osseuses primitives malignes chez l'enfant et le jeune adulte en termes de fréquence. Elles représentent en effet environ 90% des tumeurs osseuses primitives malignes pédiatriques (Desandes et al., 2004).

1. L'ostéosarcome pédiatrique

L'ostéosarcome est la tumeur osseuse pédiatrique la plus fréquente. Les plus anciens cas d'ostéosarcomes ont été décrits sur des momies de l'Égypte antique datant plus de 5000 ans, avec des traces probables d'une intervention chirurgicale sous forme d'amputation. Un autre cas d'ostéosarcome également bien documenté, montrant un profil radiologique typique en « feu d'herbes », a été observé sur le fémur d'un jeune péruvien datant de 1100 après J-C (Capasso, 2005).

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'ostéosarcome est « une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales ». Il dérive du mésoderme et est issu des Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) (Mohseny and Hogendoorn, 2011). L'ostéosarcome résulterait d'une dérégulation du programme de différenciation de ces CSM. Les cellules ostéosarcomateuses peuvent donc être plus ou moins différenciées selon le stade de différenciation de la cellule affectée par la transformation tumorale (**FIGURE 10**). De manière générale, une corrélation inverse semble exister entre différenciation et agressivité des tumeurs (Wagner et al., 2011).

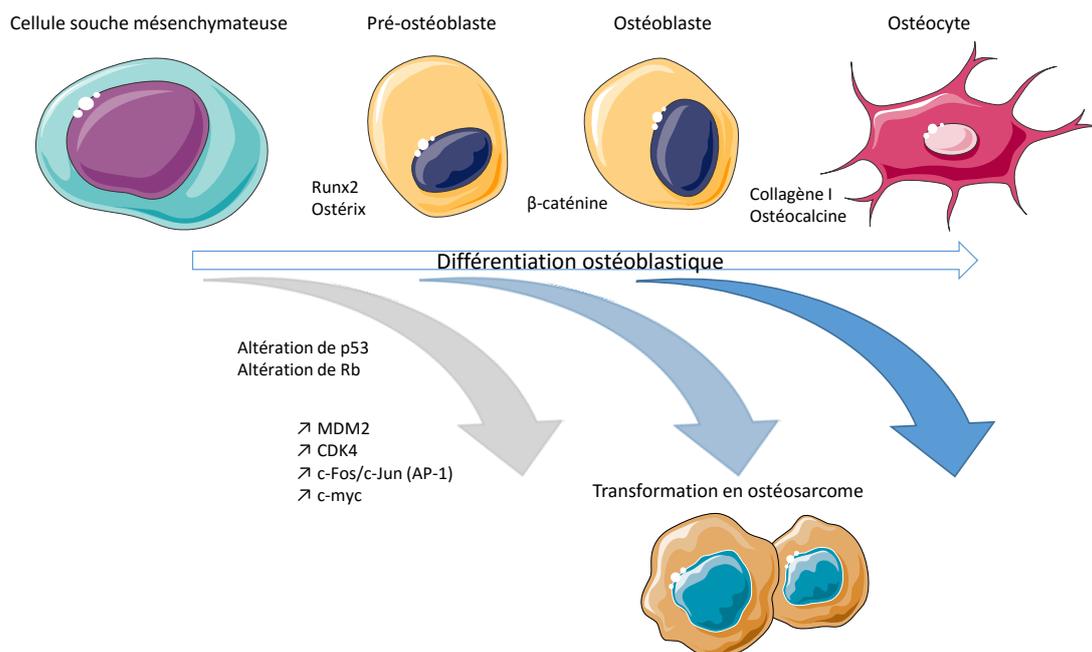


Figure 10 Transformation des cellules de la lignée ostéoblastique en ostéosarcome. Selon le stade de différenciation de la cellule affectée par la transformation tumorale, les caractéristiques de la pathologie peuvent varier.

L'ostéosarcome est donc le nom générique d'une famille de tumeurs très hétérogène. Pour illustrer cette hétérogénéité, l'OMS définit 3 sous-types d'ostéosarcomes conventionnels (**FIGURE 11**) :

- l'ostéosarcome ostéoblastique : il est le plus fréquent des ostéosarcomes avec des cellules tumorales de type ostéoblastique produisant une matrice ostéoïde formant un complexe trabéculaire.
- l'ostéosarcome fibroblastique : il est formé de cellules indifférenciées de morphologie fibroblastique.
- l'ostéosarcome chondroblastique : il est caractérisé par des amas de cellules peu différenciées produisant une matrice cartilagineuse, rappelant l'ossification endochondrale.

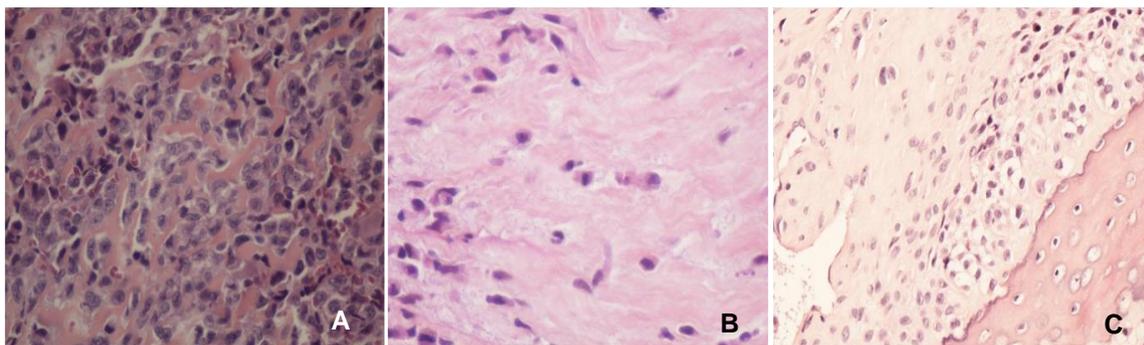


Figure 11 Préparations histologiques d'ostéosarcomes colorées à l'Hématoxyline – Eosine. Aspect typique d'un ostéosarcome ostéogénique (grossissement x 40) (A). Ostéosarcome fibroblastique (grossissement x 20) (B). Ostéosarcome chondroblastique (grossissement x 20) (C) (D^r MF Heymann, CHU de Nantes, INSERM UMR957).

Cependant, on compte aussi des formes exceptionnelles d'ostéosarcome :

- Ostéosarcome central de bas grade
- Ostéosarcome télangiectasique
- Ostéosarcome à petites cellules
- Ostéosarcome secondaire
- Ostéosarcome parostéal
- Ostéosarcome périostal
- Ostéosarcome de surface de haut grade

a. Epidémiologie de l'ostéosarcome

L'ostéosarcome représente la moitié des cas des tumeurs osseuses primitives diagnostiquées mais reste une pathologie rare (5% des cancers de l'enfant soit 0,2% de toutes les néoplasies malignes). Il est donc la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes avec une incidence annuelle déterminée pour la décennie 1990-1999 d'environ 4,8 nouveaux cas par million d'enfants de moins de 20 ans aux USA (Linnet et al., 1999) et 3,6 nouveaux cas par million d'enfant de moins de 15 ans en France (Desandes et al., 2004). Les dernières données d'épidémiologie ne sont pas connues mais le réseau ResOS qui permet la prise en charge des sarcomes osseux en France estime l'incidence de l'ostéosarcome en 2012 à 125 cas (ResOS, infosarcomes.org). L'ostéosarcome survient généralement

sur une population jeune, avec un pic d'incidence observé à l'âge de 18 ans avec une relative prédominance masculine (ratio moyen de 1,4 : 1). Il est rare avant 10 ans, exceptionnel avant 5 ans. L'âge de survenue au moment de la poussée de croissance pubertaire et la localisation souvent métaphysaire de ces tumeurs suggèrent un lien entre la croissance osseuse et la survenue des ostéosarcomes.

b. Tableau clinique de l'ostéosarcome

La principale manifestation clinique de l'ostéosarcome est la douleur au niveau du site tumoral, irradiant vers les articulations voisines. Une masse sensible à la palpation et pouvant gêner la mobilité de l'articulation apparaît plus tardivement. Les signes inflammatoires cutanés et une stase veineuse sont visibles à un stade avancé de la maladie. Le diagnostic repose essentiellement sur l'analyse anatomopathologique d'une biopsie ainsi que sur l'imagerie médicale. La radiographie conventionnelle révèle les lésions ostéolytiques ou ostéocondensantes et la scintigraphie osseuse permet la visualisation de lésions multiples. L'imagerie en coupe de type résonance magnétique (IRM) ou tomodensitométrie (TDM) sont quant à elles utiles pour déterminer la nature précise de la tumeur, son extension locale et la présence de métastases, pulmonaires ou osseuses (**FIGURE 12**).

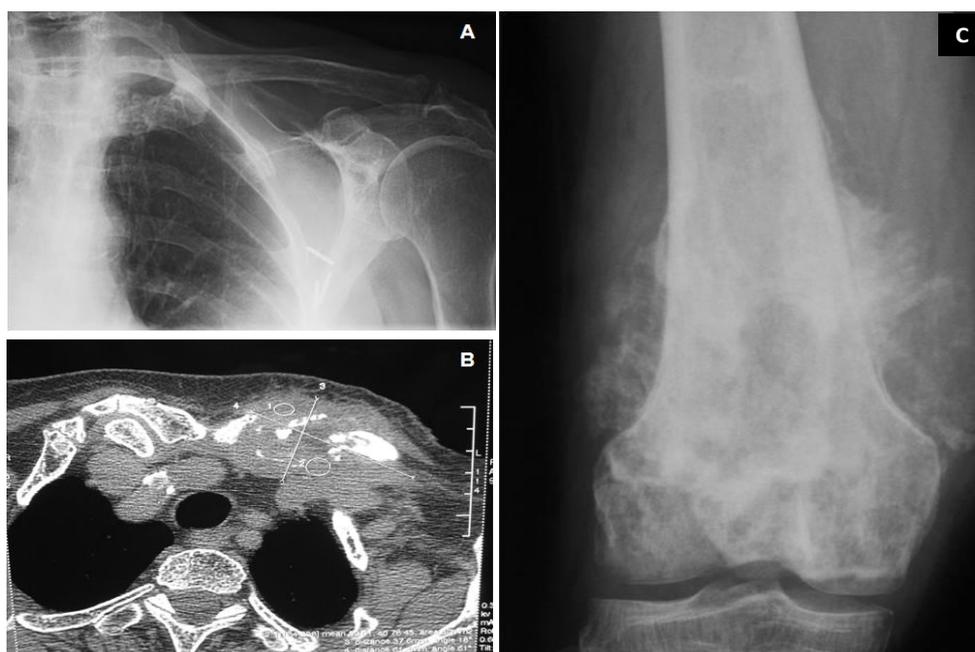


Figure 12 L'ostéosarcome en imagerie médicale. Ostéosarcome radique claviculaire peu visible en radiologie (A). IRM (coupe horizontale) améliorant l'observation de cet ostéosarcome (B). Radiographie d'un ostéosarcome avec des ostéocondensations hétérogènes de la métaphyse et de l'épiphyse fémorale, ostéolyse corticale, ostéogenèse dans les parties molles (C) (P^r François Guoin, CHU de Nantes, INSERM UMR957).

L'ostéosarcome touche dans 90% des cas la métaphyse des os longs. Il est principalement localisé au niveau du genou à savoir : l'extrémité inférieure du fémur (40 %), l'extrémité supérieure du tibia (15 %), mais également à l'extrémité supérieure du fémur et de l'humérus (14 %). Ces sites correspondent aux segments osseux dont la croissance est la plus importante de l'organisme. Moins de 10% des ostéosarcomes surviennent à la diaphyse et les localisations épiphysaires sont encore plus rares tout comme celles des os plats ou des os courts. Cependant, des cas d'ostéosarcomes ont été rapportés pour tous les os du squelette, même pour les sésamoïdes (petits os situés près des articulations).

Trois groupes sont identifiés selon leur localisation au sein de l'os :

- les ostéosarcomes de surface, généralement de bon pronostic,
- les ostéosarcomes intracorticaux, extrêmement rares, seules des observations isolées sont rapportées,
- les ostéosarcomes intramédullaires ou centraux, les plus fréquents, ils regroupent différentes variantes histologiques qui, à l'exception de la forme dite « bien différenciée intramédullaire », sont toutes de haute malignité.

Le site métastatique préférentiel des ostéosarcomes est le poumon. Le développement de nodules pulmonaires entraîne une insuffisance respiratoire causant le décès du patient et la présence de ces nodules au moment du diagnostic diminue fortement les chances de survie des patients. Plus rarement, des métastases osseuses peuvent être retrouvées (Jaffe et al., 2002).

c. Etiologie de l'ostéosarcome

L'étiologie précise de l'ostéosarcome reste actuellement encore largement inconnue. Cependant, un certain nombre de théories sur les causes et les facteurs de risques ont été émises à partir d'observations expérimentales et cliniques.

- **Ostéosarcome et croissance**

Une plus grande fréquence de développement d'ostéosarcome chez les sujets de grande taille, un pic d'incidence au moment de la poussée de croissance pubertaire ainsi qu'une localisation souvent métaphysaire suggèrent fortement une corrélation entre croissance osseuse et ostéosarcome.

- **Développement d'ostéosarcome lié à différentes pathologies**

Un certain nombre de pathologies pédiatriques, le plus souvent liées à des mutations génétiques, favorisent le développement de l'ostéosarcome :

- le rétinoblastome : tumeur maligne de la rétine liée à une mutation sur les deux allèles du gène *RB1* (*rétinoblastome 1*). Lors du développement d'un second cancer, il s'agit dans 50% des cas d'un ostéosarcome (Chauveinc et al., 2001). Les ostéosarcomes s'y observent cent fois plus fréquemment que dans le reste de la population.

- le syndrome de Li-Fraumeni : dû à une mutation d'un des allèles du gène *TP53* codant pour la protéine P53, facteur de transcription régulant d'importantes fonctions cellulaires (mitose, mort programmée,...) aboutissant au développement de nombreuses tumeurs (Varley et al., 1997) dont des ostéosarcomes.
- le syndrome de Rothmund-Thomson : lié à une mutation du gène *RECQL4* situé sur le chromosome 8 et caractérisé par des troubles cutanés, des anomalies osseuses congénitales et un risque accru d'ostéosarcome (Leonard et al., 1996).
- la dysplasie fibreuse des os : affection osseuse bénigne congénitale mais non héréditaire, où l'os normal est remplacé par un tissu pseudo-fibreux présentant une ostéogenèse immature (Ruggieri et al., 1994).
- la tumeur à cellules géantes : tumeur bénigne des os touchant le plus souvent la région métaphyso-épiphysaire des os longs, pouvant dans de très rare cas dégénérer en ostéosarcome, notamment à la suite d'une radiothérapie.

• Anomalies cytogénétiques et épigénétiques

L'analyse des caryotypes des ostéosarcomes a révélé une grande complexité, avec de nombreux réarrangements chromosomiques ainsi que des variations dans le nombre de chromosomes, mais n'a pas permis d'identifier des spécificités. Cependant, des altérations génétiques récurrentes touchant des gènes impliqués dans le contrôle de la transition G1-S du cycle cellulaire ont été observées (López-Guerrero et al., 2004) (**FIGURE 10**). Les mutations les plus courantes touchent les gènes *RB1* (dans environ 70% des cas) et *TP53* (dans 50% des cas) (Fuchs and Pritchard, 2002). Certains gènes sont amplifiés comme ceux codant pour l'inhibiteur de p53, MDM2 (Murine Double Minute 2), et pour CDK4 (Cycline Dependant Kinase 4) qui accélèrent tous deux la transition G1-S. Un certain nombre de proto-oncogènes peuvent être également surexprimés : c-MYC (dans plus de 85% des ostéosarcomes), AP-1 (plus de 70%) et c-KIT (aux alentours de 80) (Leaner et al., 2009; Wu et al., 2012). La présence de ces différentes altérations génétiques est corrélée avec l'agressivité des tumeurs et la survie des patients. Ces gènes peuvent donc représenter des cibles thérapeutiques intéressantes.

En plus des altérations chromosomiques et génétiques, de nombreuses modifications épigénétiques ont également été observées dans l'ostéosarcome. En effet, des études ont montré que l'hyperméthylation de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) au niveau des promoteurs entraîne une baisse importante de l'expression du gène associé (Cui et al., 2011). Ces gènes sont impliqués dans différents processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation ou la prolifération. Cette hyperméthylation de l'ADN joue un rôle dans la progression de l'ostéosarcome et dans son pouvoir métastatique.

A l'inverse, certains gènes peuvent être hypométhylés. L'hypométhylation de l'ADN est un autre type d'aberrations épigénétiques présentes dans les tumeurs malignes, dont l'ostéosarcome. Ce processus est catalysé par des déméthylases et induit des altérations fonctionnelles et structurelles du génome. Certains gènes, normalement réprimés, sont alors ré-exprimés. Ce phénomène peut ainsi favoriser la cancérogenèse.

d. Traitements actuels et limites

Le traitement de l'ostéosarcome a considérablement évolué au cours de ces dernières décennies. En effet, jusqu'aux années 1970, le traitement était uniquement chirurgical. L'amputation du membre représentait alors le traitement radical de la tumeur primitive mais n'empêchait pas la survenue de métastases chez 80% des patients dans les mois suivants. La survie à 5 ans était alors seulement de 12% et trois patients sur quatre décédaient dans les deux ans suivant le diagnostic. Depuis 40 ans, l'apparition de nouvelles molécules de chimiothérapie a permis d'améliorer la prise en charge des patients.

Actuellement, le traitement de l'ostéosarcome s'effectue généralement en trois étapes. La première est une chimiothérapie néoadjuvante d'une durée de trois mois. Cette étape permet un traitement prophylactique précoce des métastases, une diminution de la taille de la tumeur primitive et la possibilité d'évaluer la réponse histologique à la chimiothérapie préopératoire sur la pièce de résection et ainsi d'ajuster la chimiothérapie adjuvante. La seconde est une résection chirurgicale de la tumeur. La conservation du membre est possible dans 90% des cas mais l'amputation est nécessaire en cas de

tumeur trop volumineuse envahissant les tissus mous avoisinants. Enfin, le traitement se termine par une chimiothérapie adjuvante pendant six mois.

En France, les cinq molécules les plus fréquemment utilisées en chimiothérapie néoadjuvante et/ou adjuvante sont (Bacci, 2003) :

- le méthotrexate (utilisé chez les jeunes patients) : agent cytotoxique ciblant le métabolisme de la cellule tumorale. Il agit en inhibant une enzyme-clef de la synthèse de la thymidine, la dihydrofolate réductase,
- la doxorubicine : agent cytotoxique considéré initialement comme un agent intercalant, elle agit également en inhibant les topoisomérases de type II, des enzymes impliquées dans la décondensation de l'ADN,
- le cisplatine : agent cytotoxique alkylant induisant la formation de ponts inter- et intra-brins dans les chaînes d'ADN,
- l'ifosfamide: agent cytotoxique alkylant induisant la formation de ponts inter-brins d'ADN en se fixant sur le 7^{ème} azote des guanines,
- l'étoposide : inhibiteur de la topoisomérase II.

La combinaison des différentes molécules de chimiothérapie, leurs doses et la fréquence des injections dépendent de l'âge du patient et des données histologiques de la biopsie qui déterminent la nature et le grade de l'ostéosarcome. De plus, la sensibilité de la tumeur à la chimiothérapie néoadjuvante est déterminée au moment de l'exérèse de la tumeur par l'appréciation de la nécrose tumorale qui quantifie le pourcentage moyen de cellules viables sur la pièce de résection (grade de HUVOS). Un patient est considéré comme « bon répondeur » à un traitement néoadjuvant lorsque 90 à 95 % de nécrose est observée sur la pièce de résection. Ceci permet par la suite d'adapter la chimiothérapie post-opératoire (Bacci, 2003).

Cette approche associant à la fois chimiothérapie et chirurgie a permis une amélioration considérable du pronostic (Bielack et al., 2002). La survie à 5 ans des patients est actuellement autour de 70 % pour les formes localisées mais chute à 30 % pour les groupes de patients à haut risque. Ces groupes rassemblent les patients présentant des métastases pulmonaires lors du diagnostic ce qui est le cas pour 30% des patients, mais aussi les patients révélant une absence de réponse aux drogues

anticancéreuses. De plus, les séquences de traitement répétées, les hospitalisations et les effets secondaires font de la chimiothérapie un traitement lourd et difficile à supporter pour les patients. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles thérapies anti-ostéosarcomateuses.

2. Le sarcome d'Ewing

Décrit pour la première fois par James Ewing en 1921, le sarcome d'Ewing est caractérisé par la forte agressivité des cellules tumorales présentant une translocation chromosomique aboutissant à la production d'un facteur de transcription aberrant et responsable de la transformation de ces cellules. Cette deuxième tumeur de l'os en terme de fréquence chez l'enfant et le jeune adulte, présente un pic d'incidence à 15 ans (80% des patients ont moins de 20 ans) (Bernstein et al., 2006).

a. Epidémiologie du sarcome d'Ewing

Avec environ 200 nouveaux cas diagnostiqués chaque année aux Etats-Unis, l'incidence annuelle du sarcome d'Ewing dans la population est d'environ 2,93 cas / millions d'enfants (Esiashvili et al., 2008). Cette tumeur osseuse est, par ailleurs, plus fréquente chez les garçons avec un rapport de 1,2 à 1,5 et s'avère très rare chez les populations afro-américaine et asiatique. Environ 85 % des sarcomes d'Ewing sont osseux avec une prédominance au niveau de la diaphyse des os longs (fémur, tibia, péroné, humérus) et, contrairement à l'ostéosarcome, de certains os plats (ceinture pelvienne et cage thoracique) avec des fréquences variables répertoriées en **FIGURE 13** (Bernstein et al., 2006). Les sarcomes d'Ewing s'accompagnent de tumeurs des parties molles souvent volumineuses en particulier au niveau des os plats. Par ailleurs, le risque de métastases est très important et facteur de mauvais pronostic. Il est estimé que 15 à 25% des patients présentent une forme métastatique de la pathologie au moment du diagnostic. Les sites métastatiques les plus fréquents sont les poumons et dans une moindre mesure des localisations médullaires ou osseuses.

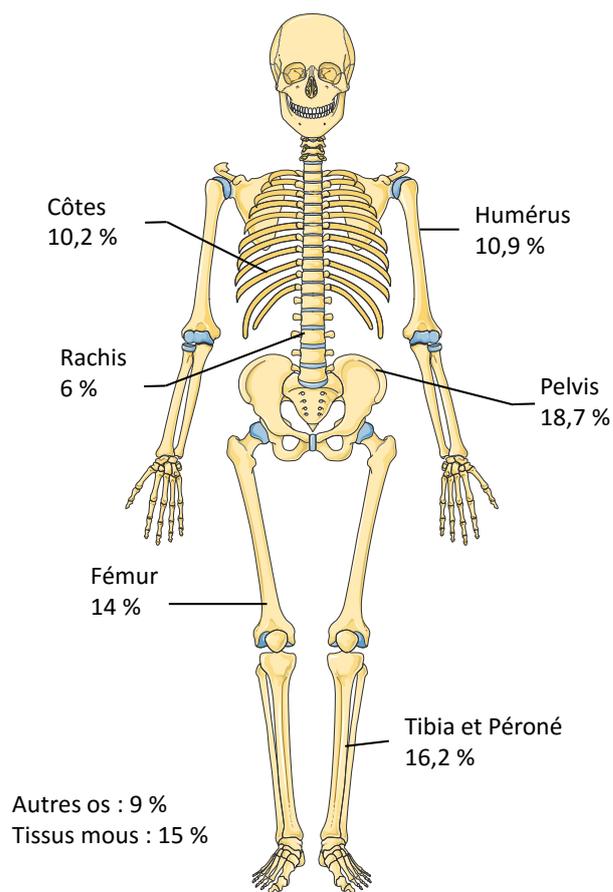


Figure 13 Principales localisations du sarcome d'Ewing

b. Etiologie

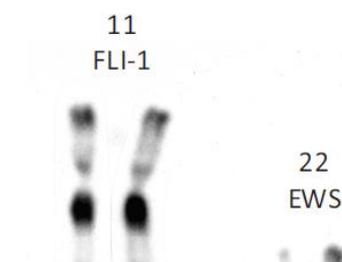


Figure 14 Translocation entre les chromosomes 11 et 22

Le développement du sarcome d'Ewing est associé à une translocation chromosomique donnant naissance à un gène de fusion spécifique entre le gène *EWS* et un gène de la famille *ETS* (FIGURES 14 ET 15). La translocation $t(11;22)(q24;q12)$, entre les gènes *FLI1* et *EWS*, est retrouvée dans 90% des cas et génère le gène de fusion *EWS-FLI1* (Delattre et al., 1992). Dans environ 5% des cas, une translocation a lieu entre les gènes *ERG* et *EWS*, $t(21;12)(22;12)$, donnant naissance au gène de fusion *EWS-ERG*. Et dans les 1-5 % restants, plusieurs translocations sont possibles entre le gène *EWS* et un membre de la famille *ETS* tel que *ETV1* ou *ETV4* avec des fréquences

variables (Potratz et al., 2012) (**TABLEAU II**). De manière générale les taux de survie des patients en fonction du type de translocation varient peu (Le Deley et al., 2010).

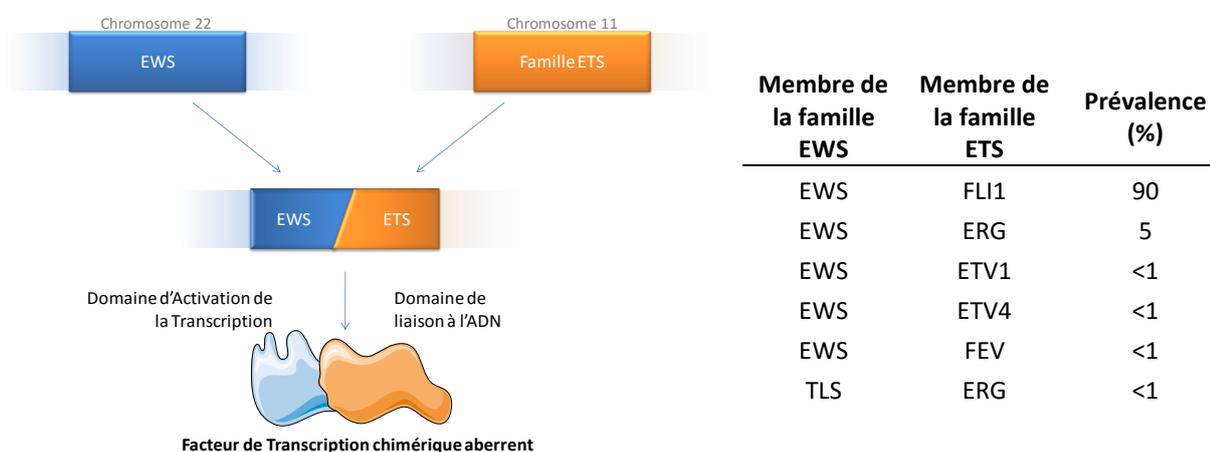


Figure 15 Schéma de la translocation chromosomique responsable de la production d'un facteur de transcription chimérique aberrant

Tableau II Principales translocations chromosomiques retrouvées chez les patients atteints de sarcome d'Ewing (Mackintosh et al., 2010)

La protéine traduite EWS-FLI1 issue de ce gène de fusion agit comme un facteur de transcription aberrant capable d'activer ou de réprimer, directement ou indirectement, la transcription de nombreux gènes dont certains gènes oncogéniques. Ainsi, ce facteur joue un rôle clef dans la tumorigenèse du sarcome d'Ewing. Pour illustration, la **FIGURE 16** représente le réseau des effets de EWS-FLI1 sur les gènes et les protéines impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (Stoll et al., 2013).

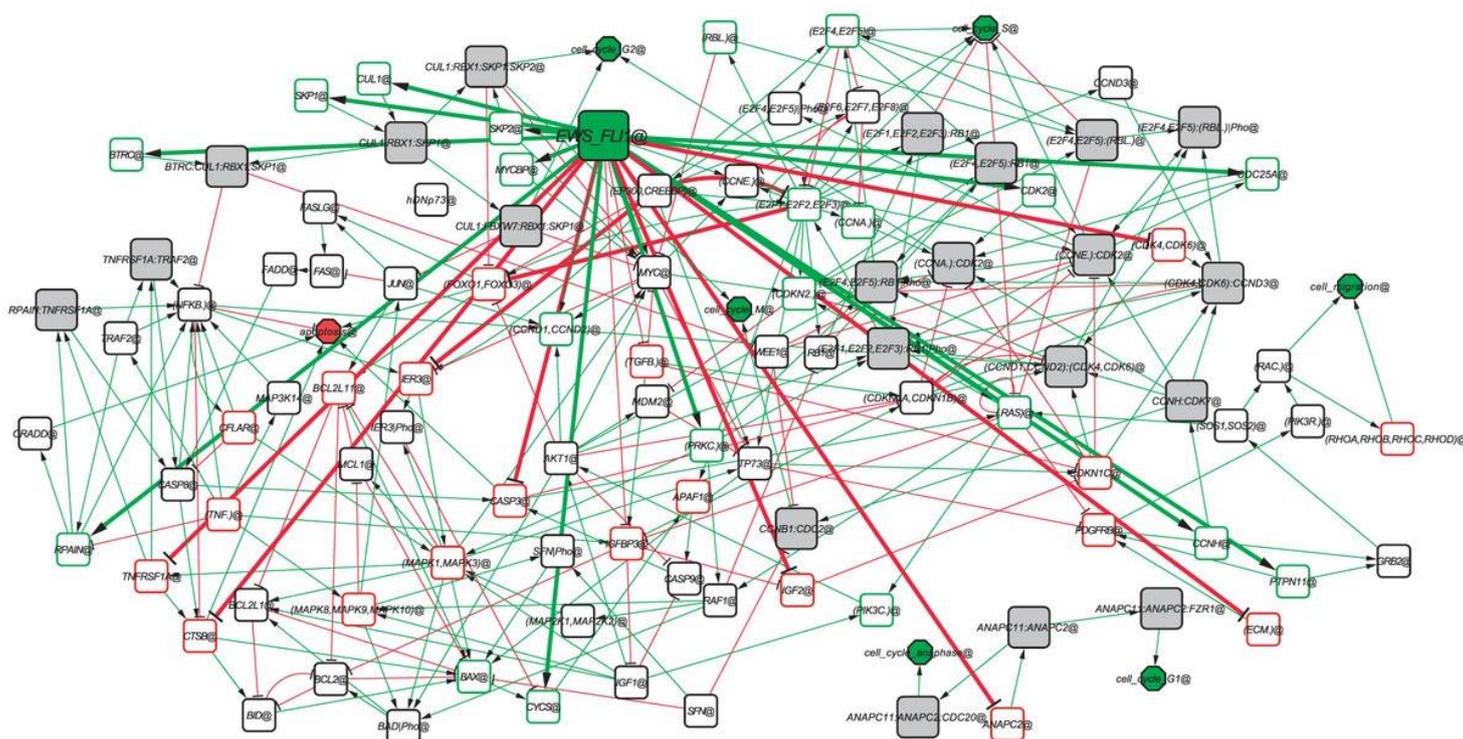


Figure 16 Réseau annoté des effets de EWS-FLI1 sur la prolifération et l'apoptose. Les nœuds blancs représentent des gènes ou des protéines; les gris des complexes protéiques. Du carré vert représentant EWS-FLI1 partent les flèches vertes et rouges symbolisant respectivement l'influence positive et négative. (Stoll et al., 2013)

Par ailleurs, d'autres mutations aspécifiques peuvent être retrouvées. En effet, p16 est souvent sous-exprimée dans les sarcomes d'Ewing et constitue un facteur d'agressivité de la tumeur (Kovar et al., 1997). De plus, alors que p53 est mutée dans plus de 50% des tumeurs, cette mutation n'est retrouvée que dans 10% des sarcomes d'Ewing. Cependant, EWS-FLI1 pourrait bloquer directement la voie p53 pour induire la tumorigénicité (Rorie and Weissman, 2004). L'effet de ces délétions peut également se cumuler puisque la délétion conjointe de p53, p16 et p14 définit un groupe de tumeurs très résistantes à la chimiothérapie (Huang et al., 2005).

Si la présence d'un gène de fusion est connue depuis 30 ans, la cellule d'origine de cette tumeur n'est pas encore clairement établie et reste un sujet controversé (Kovar et al., 1997; Lin et al., 2011). Deux théories principales suggèrent que cette tumeur serait issue soit de cellules primaires provenant de la crête neurale, soit de cellules souches mésenchymateuses.

- **Hypothèse d'une origine neuroectodermique**

Histologiquement, les cellules de sarcome d'Ewing ressemblent aux cellules primitives neuroectodermiques (**FIGURE 17**). De plus, des marqueurs neuronaux précoces tels que le marqueur NSE (neuron-specific enolase) et S-100 peuvent être retrouvés dans ces tumeurs (Lin et al., 2011).

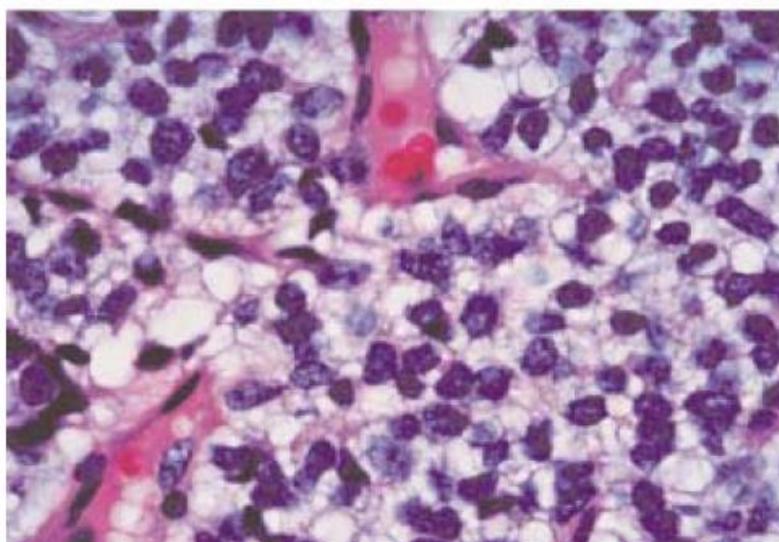


Figure 17 Coloration Hématoxyline-Eosine de tumeur de sarcome d'Ewing présentant de petites cellules rondes indifférenciées. Grossissement x160 (Arndt and Crist, 1999)

Malgré ces données suggérant une origine neuroectodermique, des doutes persistent car il a été montré qu'EWS-FLI1 est capable d'induire la différenciation neuroectodermique et d'augmenter l'expression de marqueurs précoces de cette différenciation (Hu-Lieskovan et al., 2005). Ces études suggèrent alors que les caractéristiques neuroectodermiques des sarcomes d'Ewing seraient liées à l'expression d'EWS-FLI1 plutôt qu'à leur origine cellulaire.

- **Hypothèse d'une origine mésenchymateuse**

La seconde hypothèse formulant que les sarcomes d'Ewing dériveraient des cellules souches mésenchymateuses semble se confirmer. En effet, des études ont montré que suite à l'inhibition

d'*EWS-FLI1* dans des lignées de sarcome d'Ewing, ces cellules acquièrent alors la capacité de se différencier dans les voies chondroblastique, ostéoblastique et adipogénique. De plus, dans cette même étude, les auteurs ont montré que le profil d'expression génique de ces cellules tend à converger vers celui des CSM (Tirode et al., 2007). Cependant, si l'expression d'*EWS-FLI1* dans des CSM humaines induit l'expression de gènes nécessaires à leur transformation en cellules cancéreuses similaire aux sarcomes d'Ewing, elle n'est pas suffisante pour induire la formation d'une tumeur chez des souris immunodéficientes (Riggi et al., 2008).

De nombreuses données supportent donc une origine mésenchymateuse du sarcome d'Ewing. Cependant, il est clair que la simple inhibition d'*EWS-FLI1* dans ces cellules tumorales n'est pas suffisante pour réverser leur phénotype en CSM saines (Lin et al., 2011). Par ailleurs, l'expression des marqueurs neuronaux étant strictement dépendante d'*EWS-FLI1*, une hypothèse consiste à dire que les sarcomes d'Ewing sont d'origine mésenchymateuse mais qu'*EWS-FLI1* favorise la différenciation de ces cellules vers un phénotype neuronal.

c. Tableau Clinique

Le sarcome d'Ewing est caractérisé par une croissance rapide et une destruction massive et extensive des os touchés qui peut induire des douleurs osseuses ainsi que des fractures pathologiques. Les signes révélateurs de la maladie sont tout d'abord une douleur intermittente, puis persistante au repos, dont l'intensité croît généralement progressivement sur plusieurs semaines. Cette évolution progressive entraîne fréquemment des retards de diagnostic. Dans 15 à 20 % des cas, la douleur et la présence d'une masse s'accompagnent également de signes généraux, associés au développement de la tumeur, en particulier de la fièvre, une asthénie et un amaigrissement. Ces signes généraux sont souvent associés à une maladie métastatique ou à une localisation pelvienne. Dans le cas de métastases pulmonaires, des signes respiratoires révélateurs peuvent être observés et dans le cas d'une tumeur vertébrale, des douleurs radiculaires et une compression médullaire (Bernstein et al., 2006).

Cette tumeur présente un caractère très ostéolytique et très agressif, avec un aspect mal limité associé à une destruction de la corticale osseuse, des appositions périostées et une atteinte des parties molles

(FIGURE 18). Bien que la tumeur ne produise pas d'os, elle est condensante au scanner du fait des dépôts secondaires de calcium sur les travées osseuses. Ainsi, la radiographie, l'IRM (imagerie par résonance magnétique), le scanner thoracique, le scanner osseux et la tomographie par émission de positons peuvent être utilisés pour établir le diagnostic et rechercher d'éventuelles métastases pulmonaires et osseuses.



Figure 18 Radiologie d'un patient présentant des lésions ostéolytiques et une réaction périostée consécutives à un sarcome d'Ewing (Dr Nadège Coradini)

d. Traitements actuels et limites

L'enjeu thérapeutique du sarcome d'Ewing est d'assurer à la fois un contrôle systémique et local de la maladie. Les patients doivent donc être pris en charge par des équipes multidisciplinaires comprenant radiologues, anatomopathologistes, chirurgiens et radiothérapeutes, depuis la biopsie et jusqu'à la fin du traitement. Le principal critère pris en compte pour le choix du traitement est la présence ou non de métastases au moment du diagnostic.

- **Traitement des sarcomes d'Ewing localisés**

Le traitement des tumeurs localisées repose sur trois étapes. La première est l'étape de cytoréduction par chimiothérapie néo-adjuvante visant à éradiquer les micro-métastases et réduire la tumeur locale. La seconde étape repose sur la résection chirurgicale de la tumeur locale, réalisée si possible avec chirurgie conservatrice et reconstruction. Contrairement à l'ostéosarcome, la radiothérapie est fréquemment utilisée dans les formes inopérables ou associée à la chirurgie du fait de la radiosensibilité des sarcomes d'Ewing. La dernière étape consiste en une chimiothérapie adjuvante avec ou sans radiothérapie dans le but de prévenir l'apparition de récurrences. Les protocoles de chimiothérapie utilisent des approches combinatoires associant généralement cinq agents : Vincristine, Cyclophosphamide, Ifosfamide, Doxorubicine et Etoposide (Marec-Bérard et al., 2010).

- **Traitement des sarcomes d'Ewing métastatiques ou récidivants**

Quinze à 25% des patients présentent des métastases au moment du diagnostic. Pour ces formes métastatiques, la chimiothérapie et la radiothérapie sont les traitements de première intention ; la chirurgie peut également être appliquée. Lorsqu'elle est possible, la résection des métastases pulmonaires améliore la survie des patients. Cependant, la prise en charge thérapeutique des patients présentant ces formes métastatiques ou récidivantes consiste majoritairement à limiter l'évolution de la tumeur le plus longtemps possible.

Grâce à ces différents traitements, la survie à cinq ans de ce type de tumeur est de 60 % mais chute à 10 % dans les cas de récurrence. Pour les formes localisées, la survie à cinq ans est d'environ 70-75% alors qu'elle ne dépasse pas 15 à 30 % pour les formes métastatiques au diagnostic (Esiashvili et al., 2008).

- **Protocoles Euro-EWING**

Entre 1999 et 2014, le traitement de référence du sarcome d'Ewing en Europe suivait le protocole clinique Euro-EWING 99 (EUROpean Ewing tumor Working Initiative of National Groups). Les premiers

résultats intermédiaires publiés, concernant les 281 patients atteints de sarcome d'Ewing primaires disséminés inclus entre 1999 et 2005, montrent une survie sans rechute de 27% et une survie globale de 34% (Ladenstein et al., 2010). Le protocole Euro-EWING 2012 est ouvert en Angleterre depuis 2014 et le sera dans tous les centres français en septembre 2015. Il évalue le bénéfice clinique de deux types de chimiothérapie combinatoire différents : une association Vincristine, Ifosfamide, Doxorubicine et Etoposide (VIDE) ou une association Vincristine, Doxorubicine et Cyclophosphamide puis Ifosfamide et Etoposide (VDC/IE). Une randomisation est réalisée et les patients sont divisés en deux groupes, le protocole thérapeutique est constitué soit de six cures de la chimiothérapie néo-adjuvante VIDE soit cinq cure de VDC entrecoupées de quatre cures de IE. Pour les deux groupes, cette chimiothérapie néo-adjuvante est associée à une résection chirurgicale quand celle-ci est possible. Une nouvelle randomisation est ensuite réalisée et les patients sont divisés en trois groupes en fonction du volume tumoral, de la réponse histologique et de la présence de métastases au moment du diagnostic. Ainsi, pour la chimiothérapie adjuvante, différentes combinaisons de drogues sont évaluées en fonction du stade de la pathologie (pathologie localisée ; métastases pulmonaires ; métastases multifocales) (EuroEwing.eu, 2015).

Malgré l'amélioration de la prise en charge thérapeutique grâce à la polychimiothérapie néoadjuvante et à la chirurgie conservatrice, les taux de survie à cinq ans pour les patients atteints de sarcome d'Ewing restent faibles, notamment en cas de métastases, de récives ou dans le cas de l'apparition d'une résistance à la chimiothérapie. Par ailleurs, les séquences de traitements, les hospitalisations répétées et les effets secondaires font de la chimiothérapie un traitement très lourd aboutissant à une perte réelle de qualité de vie pour les patients.

3. Le microenvironnement osseux tumoral, une cible pour de nouveaux traitements

Ces dernières années, l'étude du microenvironnement tumoral a pris une place importante dans le domaine de la recherche sur le cancer. En effet, il est désormais admis que le caractère invasif d'une tumeur primitive est déterminé non seulement par le génotype des cellules tumorales elles-mêmes, mais aussi par leurs interactions avec l'environnement extracellulaire qui module leur capacités de développement.

Sachant que le pronostic d'un cancer est très directement lié au caractère invasif de la tumeur primitive et à ses éventuelles métastases, il est primordial d'acquérir des connaissances fondamentales sur les mécanismes de l'oncogenèse liées au microenvironnement tumoral dans le but d'améliorer les thérapies actuelles et de développer de nouvelles approches.

Dans les tumeurs osseuses pédiatriques, le microenvironnement tumoral est particulier de par leur forte relation avec le tissu osseux, que ce soit avec la matrice ou avec les cellules osseuses présentes.

a. Cercle vicieux entre ostéolyse et prolifération des tumeurs osseuses primitives malignes

La problématique biologique de l'ostéosarcome et du sarcome d'Ewing survenant en site osseux est complexe et repose en partie sur l'existence d'un cercle vicieux qui s'établit entre la phase de croissance tumorale et la phase de résorption osseuse (**FIGURE 19**).

En effet, le développement d'une tumeur osseuse primitive entraîne la formation de substance ostéoïde qui est régulièrement associée à une ostéolyse maligne. Ce processus résulte d'une activité accrue des cellules ostéoclastiques responsables de la résorption osseuse, consécutive à la sécrétion de cytokines d'origine tumorale, telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α et la LT- α , l'hormone Parathormone related peptide (PTHrP) et certains facteurs de croissance comme le TGF- β (Theoleyre et al., 2004). Des facteurs pro-ostéoblastiques sont également sécrétés par les cellules tumorales tels que les BMP,

IGF et WNT. Tous ces facteurs agissent alors soit directement sur l'ostéoclaste, soit indirectement en induisant la sécrétion de RANK-L par les ostéoblastes. La balance entre résorption et formation osseuse est alors déséquilibrée et penche en faveur de la résorption. Des facteurs de croissance piégés dans la matrice extracellulaire osseuse, tels que le TGF- β et l'IGF-1, sont alors libérés et stimulent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales. Un cercle vicieux s'installe alors entre la prolifération tumorale et l'ostéolyse associée.

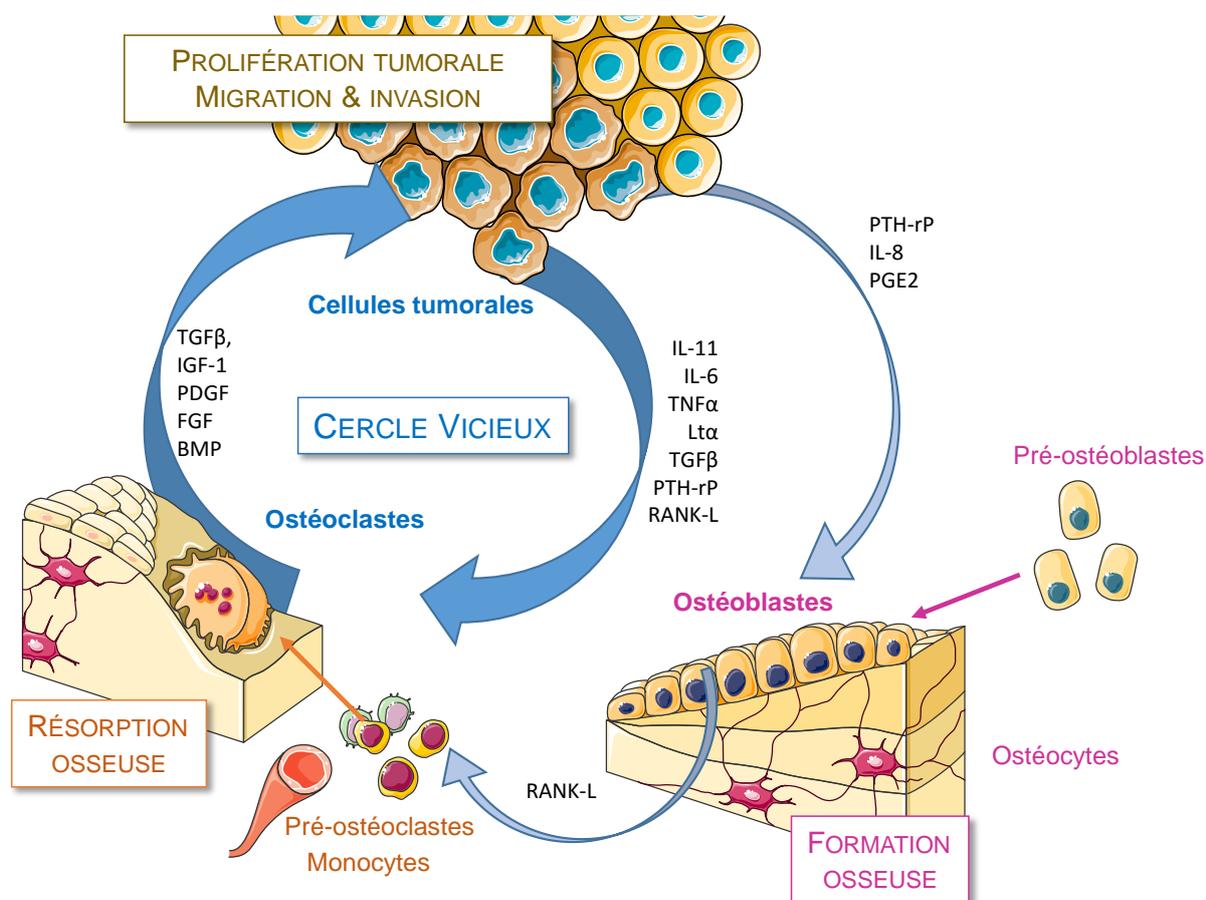


Figure 19 Cercle vicieux s'établissant entre résorption osseuse et prolifération tumorale dans les tumeurs osseuses primitives malignes. Les cellules tumorales sécrètent des signaux favorisant la résorption osseuse des ostéoclastes (Interleukine-11 et -6 (IL-); Tumor Necrosis Factor α (TNF α); Lymphotoxine α (LT α); Tumor Growth Factor β (TGF β); Parathyroid hormone-related peptide (PTH-rP) et receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)). En retour, la résorption de la matrice osseuse libère des facteurs de croissance pour les cellules tumorales (TGF β ; insulino-like growth factor-1 (IGF-1); Platelet-derived growth factor (PDGF); Fibroblast growth factor (FGF); Bone morphogenetic protein (BMP)) stimulant la prolifération tumorale, la migration et l'invasion. En parallèle, les cellules tumorales activent également la formation osseuse des ostéoblastes (sécrétion de PTH-rP; IL-8 et Prostaglandine E2 (PGE2)) qui par ricochet favorisent la différenciation de pré-ostéoclastes et de monocytes en ostéoclastes matures par la sécrétion de RANK-L.

De nouvelles stratégies thérapeutiques consistent à empêcher la mise en place de ce cercle vicieux et donc de cibler à la fois les cellules tumorales et la résorption osseuse (Redini et al., 2013).

Parmi celles-ci, l'utilisation des bisphosphonates, connus pour leur action inhibitrice de la résorption osseuse et utilisés comme traitement de l'ostéoporose, est l'une des approches envisagées dans le traitement des tumeurs osseuses primitives (Moriceau et al., 2010a). Les bisphosphonates sont déjà utilisés dans le traitement palliatif des métastases osseuses par certains cliniciens (Holen and Coleman, 2010). Dans ce contexte, l'étude multicentrique « OS 2006 » a pour objectif d'étudier l'intérêt thérapeutique de l'acide zolédronique en association avec la chimiothérapie conventionnelle.

Une autre voie d'investigation est de cibler la triade moléculaire RANK/RANKL/OPG, régulateurs essentiels de l'activité ostéoclastique, notamment en neutralisant la fixation de RANKL sur son récepteur RANK. A cette fin, différentes études ont été réalisées comme l'utilisation de l'OPG, récepteur leurre de RANKL et donc facteur anti-résorptif (Lamoureux et al., 2007), l'utilisation de RANK-Fc (fusion du domaine extracellulaire de RANK murin avec la région constante de l'immunoglobuline G1 humaine) (Lamoureux et al., 2008), l'utilisation de l'anticorps anti-RANKL (Denosumab) (Body et al., 2006) ou encore des siRNAs (Small Interfering Ribonucleic acid) inhibant l'expression de RANKL (Rousseau et al., 2011). Toutes ces stratégies ont donné des résultats encourageants.

Ces différentes molécules anti-résorption doivent être associées à des molécules anticancéreuses dans le cadre des traitements des tumeurs osseuses pédiatriques, le but étant d'obtenir un effet additif voire synergique. De plus, une étude a montré que l'utilisation combinée de l'acide zolédronique et de RAD001, un analogue de la rapamycine inhibiteur de la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), avait un effet anti-tumoral chez certains modèles d'ostéosarcome murins *in vitro* et *in vivo* (Moriceau et al., 2010b). Cette association de molécules a permis non seulement d'obtenir un effet synergique mais également de lever les résistances au RAD001 ouvrant alors de nouvelles perspectives dans les stratégies thérapeutiques ciblées combinatoires. Une stratégie combinatoire permettrait alors de potentialiser l'effet anti-tumoral des drogues mais également d'éviter les phénomènes de résistance.

b. Essais précliniques et cliniques en cours dans les tumeurs osseuses pédiatriques

Au-delà du cercle vicieux, d'autres thérapies ciblées sont envisagées dans les tumeurs osseuses pédiatriques.

De nombreux essais cliniques de phase I, II et III sont donc en cours actuellement dans les tumeurs osseuses primitives malignes (FIGURES 20 ET 21). Ces essais cliniques ciblent différents processus biologiques tels que : l'angiogenèse, le processus métastatique, la mort cellulaire, l'inflammation, la prolifération cellulaire, le microenvironnement tumoral et le contrôle de l'apoptose. Un large panel d'agents thérapeutiques va ainsi permettre de développer des thérapies ciblées et individualisées et donc d'adapter le traitement à chaque patient en fonction par exemple des mutations détectées dans ses cellules tumorales, soutenant le concept de la médecine personnalisée.

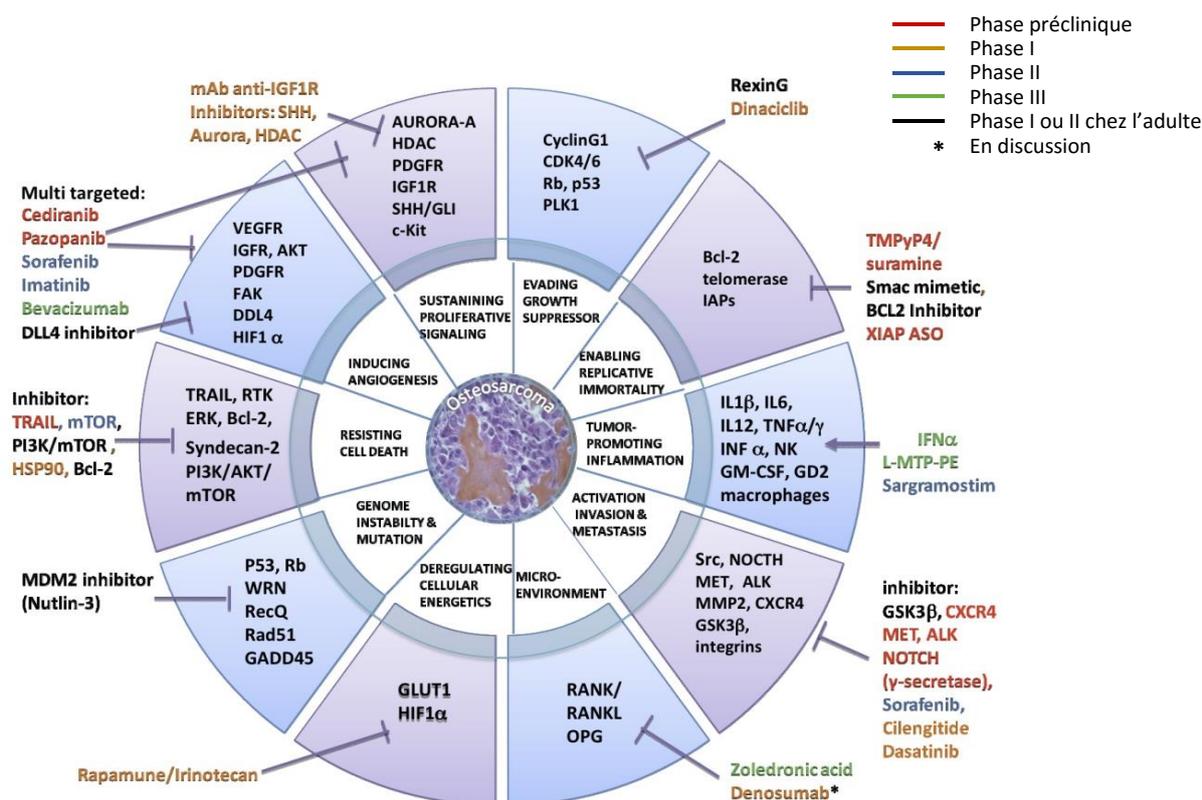


Figure 20 Thérapies de l'ostéosarcome ciblant les capacités distinctives de ce cancer. Récapitulatif des différents essais cliniques en cours et des cibles moléculaires (en orange : phase I, en bleu : phase II, en vert : phase III, en noir : phase I et II uniquement chez l'adulte) (Dr Nadège Corradini, CHU Nantes, UMR 957)

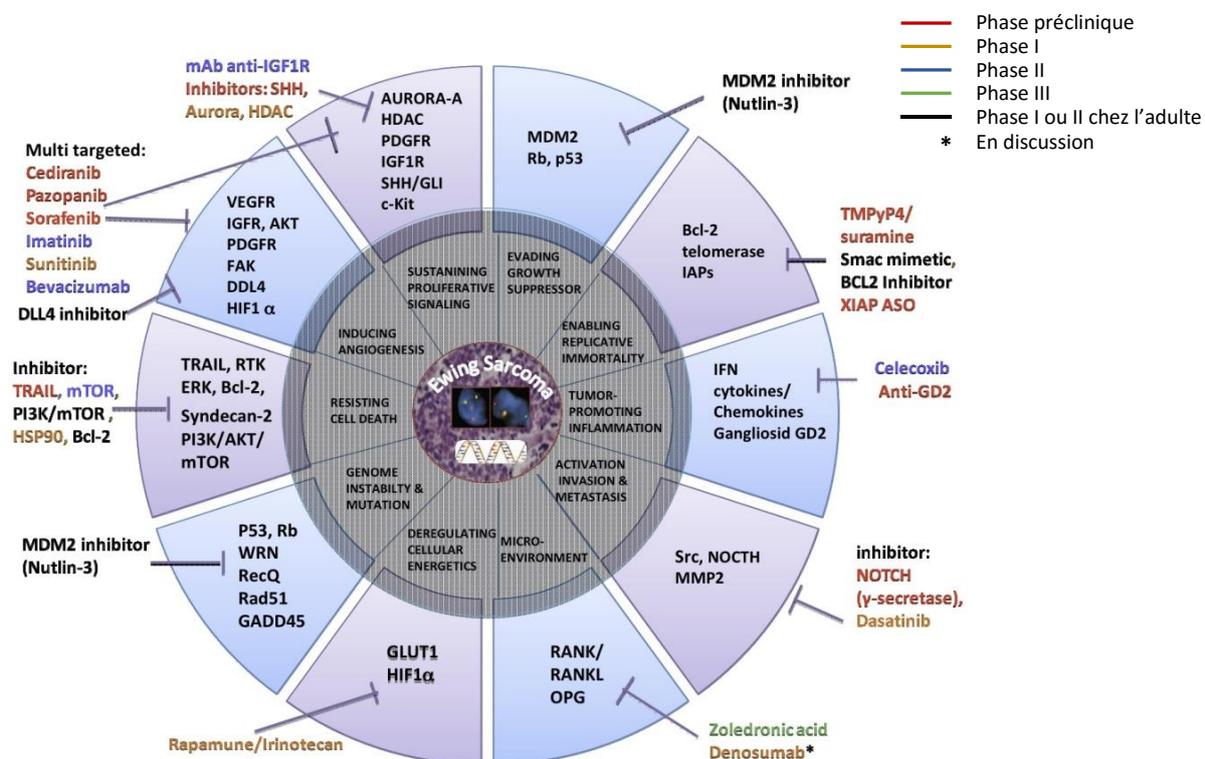


Figure 21 Thérapies du sarcome d'Ewing ciblant les capacités distinctives de ce cancer. Récapitulatif des différents essais cliniques en cours et des cibles moléculaires (en orange : phase I, en bleu : phase II, en vert : phase III, en noir : phase I et II uniquement chez l'adulte) (Dr Nadège Corradini, CHU Nantes, UMR 957)

III. TRAIL, une nouvelle approche thérapeutique dans les tumeurs osseuses pédiatriques

Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et de molécules anticancéreuses est un enjeu important dans les tumeurs osseuses pédiatriques, le potentiel important du ciblage la voie de l'apoptose extrinsèque de TRAIL en fait un candidat intéressant dans ces pathologies.

1. Intérêt du ciblage de la voie de l'apoptose induite par TRAIL dans les tumeurs osseuses pédiatriques

Au tout début des années 2000, plusieurs études se sont intéressées à l'utilisation de TRAIL dans des modèles de ces pathologies. Dès ces premiers résultats, il a été évident que les deux tumeurs osseuses pédiatriques ne répondaient pas de la même manière à TRAIL.

a. Le sarcome d'Ewing et TRAIL

Il a été très vite rapporté que de nombreuses lignées cellulaires humaines issues de sarcome d'Ewing étaient sensibles à l'apoptose induite par TRAIL (Kumar et al., 2001; Mitsiades et al., 2001; Van Valen et al., 2000). La majorité des lignées de sarcome d'Ewing étudiées ont été identifiées comme très sensibles à TRAIL, en particulier celles exprimant les récepteurs de mort de TRAIL (Kontny et al., 2001). Il a également été montré dans une étude portant sur 32 biopsies de patients atteints de sarcome d'Ewing que la majorité de ces tumeurs exprimaient au moins un des récepteurs de mort de TRAIL (**FIGURE 22**), ces résultats suggérant une forte probabilité de sensibilité du sarcome d'Ewing à l'apoptose induite par TRAIL, ils justifient l'utilisation d'un tel traitement activant cette voie apoptotique.

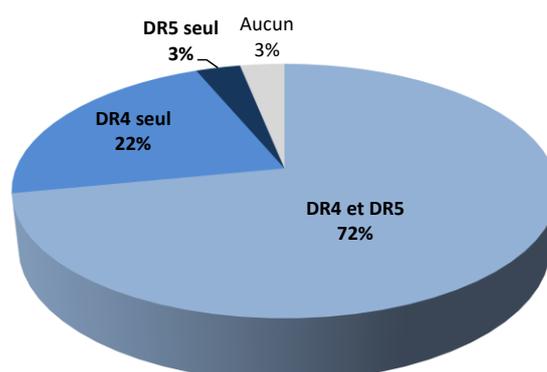


Figure 22 Expression des récepteurs de mort de TRAIL dans les tumeurs de sarcome d'Ewing. Etude réalisée sur 32 biopsies, d'après (Mitsiades et al., 2001)

A la suite de ces études *in vitro*, des expérimentations complémentaires dans des modèles murins de xénotransgreffe de sarcome d'Ewing ont montré que TRAIL lui-même ou un agoniste de DR5 réduisent significativement le volume tumoral, prévenant les lésions ostéolytiques et augmentant la survie des animaux (Merchant et al., 2004; Picarda et al., 2010). Cependant, une étude portant sur 18 patients atteints de sarcome d'Ewing a montré que c-FLIP est surexprimé dans 100% des tumeurs primitives et des métastases (de Hooge et al., 2007) ce qui pourrait limiter les effets de TRAIL dans cette pathologie.

b. L'ostéosarcome et TRAIL

Si les lignées cellulaires de sarcome d'Ewing sont en grande majorité sensibles à TRAIL, les lignées d'ostéosarcome sont au contraire, pour la plupart, résistantes à TRAIL. En effet le traitement de cellules d'ostéosarcome avec TRAIL n'a pas conduit à des résultats satisfaisants même si ce manque de sensibilité des cellules d'ostéosarcome reste peu clair (Bouralexis et al., 2003).

Par conséquent, des agents supplémentaires ont été proposés pour sensibiliser les cellules d'ostéosarcome à l'apoptose induite par TRAIL, mais le problème des effets secondaires demeure (Cenni et al., 2004; Hotta et al., 2003). Sous certaines conditions, les cellules d'ostéosarcome peuvent être sensibilisées *in vitro* par plusieurs agents chimiothérapeutiques (Bouralexis et al., 2004; Evdokiou et al., 2002; Van Valen et al., 2003).

Deux publications rapportent tout de même que la surexpression de TRAIL dans des modèles murins d'ostéosarcome allogreffé (Picarda et al., 2010) et xénogreffé (Li et al., 2012) a effet significatif sur la réduction des métastases pulmonaires et par conséquent augmente la survie des animaux. Cependant, aucune sensibilisation de cellules d'ostéosarcome par des agents de chimiothérapie n'a pu être démontrée *in vivo*.

Actuellement, aucun essai clinique utilisant TRAIL ou un anticorps agoniste de DR4 ou DR5 n'est en cours dans les tumeurs osseuses primitives. La principale limite de l'utilisation clinique de TRAIL ou des agonistes des récepteurs de mort est en effet l'apparition de phénomènes de résistance. Cependant, certaines lignées cellulaires résistantes aux agents de chimiothérapie conventionnels tels que l'adriamycine ou l'étoposide, sont sensibles à TRAIL, ce qui démontre l'intérêt de TRAIL comme alternative de traitement pour ces patients dont le taux de survie à 5 ans reste très faible. Ces agents de chimiothérapie sont de plus capables de sensibiliser des cellules tumorales à l'apoptose induite par TRAIL dans des lignées cellulaires de carcinome du poumon (Vaculova et al., 2010).

2. Mécanismes de résistance à TRAIL des tumeurs osseuses pédiatriques

Malgré le grand intérêt de TRAIL pour sa capacité à induire sélectivement l'apoptose des cellules tumorales, de nombreuses tumeurs malignes sont résistantes, dont l'ostéosarcome. Plusieurs mécanismes de résistance développés par les cellules cancéreuses ont déjà été décrits dans la voie de signalisation de TRAIL (**FIGURE 9**) et la compréhension de ces mécanismes est nécessaire avant d'envisager une utilisation thérapeutique de TRAIL ou d'un agoniste de ses récepteurs de mort. Ainsi, si TRAIL doit être utilisé en tant que partie de l'arsenal thérapeutique pour le sarcome d'Ewing et l'ostéosarcome, il est important d'identifier des moyens de sensibiliser ces tumeurs aux effets de TRAIL pour traiter une maladie locale ou métastatique.

En ce qui concerne le sarcome d'Ewing, il a été montré que la seule réexpression de la caspase-8 par déméthylation de son promoteur ou transfert de gène permet de sensibiliser des lignées cellulaires à l'apoptose induite par TRAIL *in vitro* (Fulda et al., 2001). D'après des études antérieures, la résistance à TRAIL dans le sarcome d'Ewing ne semble pas être due à l'expression des récepteurs de mort ou des récepteurs leurres à la surface des cellules, le taux de DR4 et DR5 est relativement constant entre les différentes lignées qu'elles soit sensibles ou résistantes. Les récepteurs leurres sont quant à eux à peine détectables dans ces lignées (Kontny et al., 2001).

Plusieurs méthodes de sensibilisation des lignées résistantes ont été envisagées. Ainsi, la pré-incubation avec l'IFN- γ a rendu deux lignées cellulaires initialement résistantes à TRAIL sensibles en induisant une activation de la caspase-8. D'autres études de la même équipe ont confirmé la pertinence de l'utilisation de l'IFN- γ pour améliorer l'activation de la caspase-8, sensibilisant ainsi des lignées cellulaires résistantes (Kumar et al., 2001; Lissat et al., 2007). D'autre part, le rétinoïde de synthèse Fenrétinide a été utilisé dans des modèles de sarcome d'Ewing pour augmenter l'expression des récepteurs de mort de TRAIL à la surface cellulaire par un mécanisme dépendant de l'activation de p38 (White and Burchill, 2010).

Plusieurs études ont révélé que la résistance à TRAIL peut également être surmontée par des inhibiteurs du protéasome. Dans une première étude, des inhibiteurs de la synthèse de

macromolécules (actinomycine D, cycloheximide) augmentent la sensibilité à TRAIL dans des lignées cellulaires déjà sensibles à TRAIL, mais ne sensibilisent pas les lignées cellulaires initialement résistantes à TRAIL. Cependant, l'inhibiteur de protéasome MG-132 sensibilise ces lignées cellulaires à TRAIL (Van Valen et al., 2000). Une seconde étude confirme ces résultats, montrant que le bortézomib, lui aussi inhibiteur du protéasome, présente une activité synergique lorsqu'il est combiné avec TRAIL dans deux lignées de cellules de sarcome d'Ewing (Lu et al., 2008).

En ce qui concerne l'ostéosarcome, une étude de 2011 détermine les effets des bisphosphonates, médicaments utilisés comme agents anti-résorptifs dans le traitement de maladies des os, sur les cellules MG-63 d'ostéosarcome humain résistantes à TRAIL (Moon et al., 2011). Ces cellules n'ont montré aucune réponse à TRAIL utilisé seul mais un prétraitement avec des bisphosphonates a augmenté de manière significative l'apoptose induite par TRAIL et l'activation de la caspase-3. Le mécanisme proposé par les auteurs pour expliquer cette sensibilisation est l'augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine DR5.

3. Expression d'un isoforme tronqué de DR4 dans les tumeurs osseuses pédiatriques

Il a été identifié au laboratoire en 2012 un nouveau transcrite de *DR4*, issu d'un épissage alternatif, codant pour un isoforme tronqué de DR4 dans des lignées de sarcome d'Ewing (Picarda et al., 2012a). Nommé DR4b, par opposition à l'isoforme complet DR4a, il manque à cet isoforme les acides aminés 11 à 168 présents dans la partie extracellulaire du récepteur. Cependant, la simulation informatique de dynamique moléculaire de l'interface bDR4-TRAIL indique que la liaison de TRAIL-DR4b est conservée même en l'absence de ces acides aminés (**FIGURE 23**).

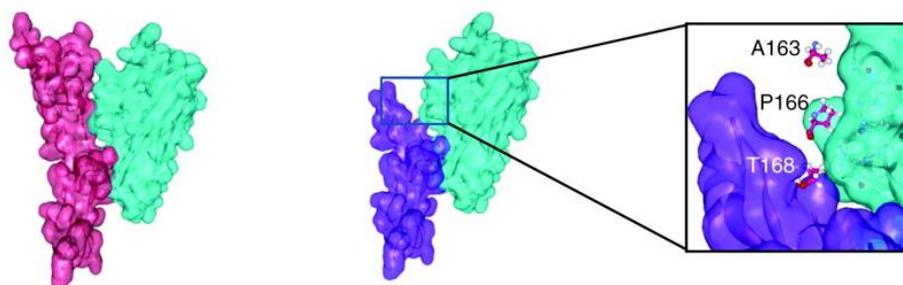


Figure 23 Schéma de la prédiction de la fixation de TRAIL (cyan) se liant à DR4a (rose) ou DR4b (violet). Les acides aminés Ala163, Pro166, et Thr168 présents dans l'interface DR4a-TRAIL, mais absents de la fixation DR4b-TRAIL sont indiqués. (Picarda et al., 2012a)

Les résultats de surexpression de DR4b dans une lignée initialement résistante à TRAIL indiquent que TRAIL est capable d'induire l'apoptose par sa fixation à l'isoforme DR4b tronquée. Il reste cependant à déterminer si sa présence dans les lignées de tumeurs osseuses pédiatriques ne modifie pas la dynamique des récepteurs de mort à la membrane de ces cellules.

4. Le microenvironnement des tumeurs osseuses pédiatriques, une niche pour la résistance à TRAIL ?

Dans le cadre du microenvironnement spécifique des tumeurs osseuses, il est primordial d'en étudier l'impact sur la résistance des tumeurs osseuses pédiatriques à TRAIL (Picarda et al., 2012b). Tout d'abord, le rôle de TRAIL dans le fonctionnement normal du tissu osseux doit être déterminé.

a. Rôle de TRAIL dans le fonctionnement normal du tissu osseux

Il a été montré que la voie de signalisation de TRAIL pourrait être impliquée dans le fonctionnement normal du remodelage osseux, en effet, il semble que TRAIL aurait un rôle positif sur la différenciation

des ostéoclastes via une signalisation dépendante de TRAF6 (Yen et al., 2012) mais ce fait reste contesté (Labrinidis et al., 2008).

Cependant, dans un contexte tumoral, que ce soit dans le cadre d'une tumeur osseuse primitive ou d'une métastase osseuse, il n'a jamais été démontré que les cellules tumorales modulaient l'activité des ostéoclastes par cette voie de signalisation de TRAIL, mais bien directement par l'expression de RANK-L. (Lau et al., 2007a, 2007b; Taylor et al., 2011).

Lorsque l'on veut considérer l'influence potentielle du microenvironnement osseux, les modèles de culture de cellules adhérentes *in vitro* de tumeurs osseuses pour tester les différentes options de (re)sensibilisation sont limités. En effet, de nombreux paramètres qui peuvent affecter la réponse des cellules tumorales à TRAIL doivent être pris en compte, comme l'hypoxie, l'environnement en trois dimensions, le milieu extracellulaire acide.... Un aperçu de ces différents paramètres est nécessaire pour avoir une vision intégrée de la réponse à TRAIL dans ce microenvironnement (**FIGURE 24**).

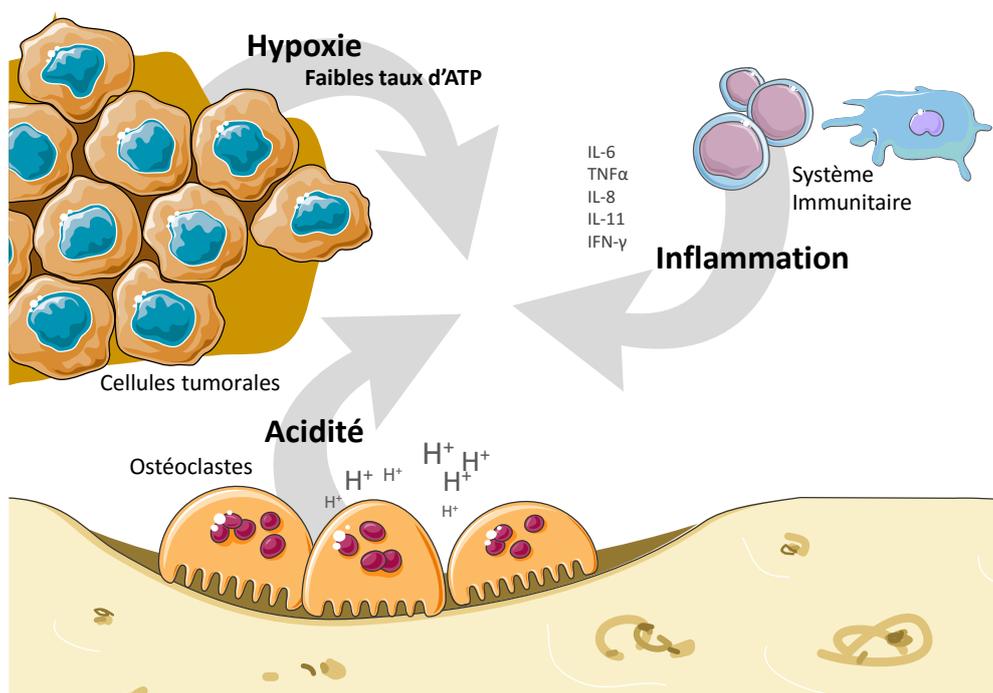


Figure 24 Caractéristiques du microenvironnement osseux tumoral ayant potentiellement un rôle dans la sensibilité/résistance des cellules tumorales à TRAIL.

b. Un microenvironnement hypoxique

L'hypoxie, la réduction drastique du niveau normal de la tension en oxygène des tissus, est un composant fréquent et important dans le microenvironnement de la tumeur osseuse. La croissance tumorale a besoin du développement d'un réseau vasculaire local qui fournit à la fois à l'oxygène et les éléments nutritifs aux cellules tumorales. Dans les sarcomes agressifs comme le sarcome d'Ewing et l'ostéosarcome, la masse très proliférative de cellules tumorales croît plus rapidement que le système vasculaire, et les cellules tumorales elles-mêmes se retrouvent rapidement dans une zone avasculaire déficiente en oxygène. Même si l'hypoxie est toxique à la fois pour les cellules normales et les cellules transformées, les cellules cancéreuses organisent plusieurs modifications génétiques d'adaptation qui leur permettent de survivre dans ces conditions défavorables. L'Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α est le facteur de transcription clef impliqué dans ce phénomène (Denko, 2008). Plusieurs études ont rapporté que les tumeurs primitives de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome présentent une accumulation du facteur de transcription HIF-1 α (Aryee et al., 2010; Knowles et al., 2010) suivie d'une augmentation de la survie des cellules tumorales, d'une résistance aux traitements pro-apoptotiques, notamment de TRAIL, et de l'échappement à cet environnement privé de nutriments (Garofalo et al., 2013; Kilic-Eren et al., 2013). La surexpression de protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 ou de c-IAP1 / 2 semble être impliquée dans la résistance des lignées cellulaires de sarcome d'Ewing dans des conditions hypoxiques (Kilic et al., 2007).

En plus du manque d'oxygène, la privation en nutriments est également une caractéristique du microenvironnement des sarcomes osseux. Cela induit des changements métaboliques dans les cellules cancéreuses et le passage de la glycolyse aérobie (phosphorylation oxydative dans les mitochondries) à la glycolyse anaérobie (fermentation du pyruvate en acide lactique), accompagné d'un potentiel de protection contre la mort cellulaire par la surexpression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (MacFarlane et al., 2012). Cependant, bien que l'apoptose des cellules tumorales peut être réduite, les cytokines pro-apoptotiques de la famille du TNF pourraient induire la nécroptose dans cet environnement hypoxique. En effet, les faibles niveaux d'ATP intracellulaire, dus au manque de nutriments, pourrait déplacer la mort cellulaire vers la voie de la nécroptose (Nikoletopoulou et al., 2013).

c. Un microenvironnement acide

La libération accélérée de protons par les ostéoclastes hautement activés près du site de la tumeur acidifie sensiblement le microenvironnement. Le pH extracellulaire acide est un paramètre important qui peut influencer sur la sensibilité à TRAIL. Il a en effet été montré qu'il favorise la nécroptose induite par TRAIL plutôt que l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines (Jouan-Lanhouet et al., 2012; Meurette et al., 2007).

d. Un environnement inflammatoire

Physiologiquement, les cytokines inflammatoires jouent un rôle essentiel dans la formation osseuse, la destruction, la réparation et le remodelage osseux (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-11, ...), et plusieurs sont dosées significativement plus élevées dans le sérum de patients atteints d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing que dans le sérum de volontaires sains. Elles favorisent ainsi la progression du cancer (Mori et al., 2013; Rutkowski et al., 2003). Cet environnement inflammatoire peut avoir un rôle important dans la sensibilité de la tumeur à TRAIL. Dans deux études sur des modèles *in vivo* et *in vitro* de sarcome d'Ewing, l'IFN- γ et le TNF- α ont démontré leur capacité à augmenter l'expression de DR5 et de la caspase-8 dans les cellules tumorales expliquant leur effet anti-tumoral synergique avec TRAIL (Abadie et al., 2004; Merchant et al., 2004).

e. La présence d'ostéoprotégérine

Dans le champ de recherche sur les tumeurs osseuses pédiatriques, l'ostéoprotégérine (OPG) peut jouer un double rôle : l'OPG exerce ainsi un effet anti-ostéolytique par sa capacité à fixer et inhiber l'activité de RANK-L, elle peut également limiter les effets pro-apoptotiques de TRAIL en agissant comme récepteur leurre (Hofbauer and Heufelder, 1997; Lamoureux et al., 2007, 2010).

Objectifs de la thèse

Les traitements actuels du sarcome d'Ewing et de l'ostéosarcome consistent en une polychimiothérapie néoadjuvante associée à une résection chirurgicale de la tumeur et en une polychimiothérapie adjuvante. Ces traitements ont largement contribué à l'amélioration des taux de survie à 5 ans des patients présentant une tumeur localisée, mais les patients qui présentent des métastases au moment du diagnostic ou une résistance à la chimiothérapie ont des chances de survie qui restent faibles.

L'ensemble des patients atteints de tumeurs osseuses pédiatriques, et notamment ces patients à haut-risque, n'ont pas vu d'amélioration dans les taux de survie à 5 ans depuis les années 1970. Dans ce cadre, de nouvelles thérapies sont envisagées, notamment en ciblant les cellules tumorales par l'intermédiaire des récepteurs de mort de la superfamille du TNFR.

L'objectif général de cette thèse a été d'évaluer le potentiel des thérapies basées sur l'activation de la voie de TRAIL dans les tumeurs osseuses pédiatriques. Comprendre les mécanismes de résistance à TRAIL dans ces pathologies est une étape primordiale avant de pouvoir proposer de nouvelles cibles thérapeutiques. Le microenvironnement tumoral osseux semble jouer un rôle important dans cette résistance et tiendra une place importante dans cette étude.

Ainsi, dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de résistance à TRAIL mis en œuvre dans nos modèles de tumeurs osseuses pédiatriques, notamment les modèles *in vivo* prenant en compte le microenvironnement particulier de ces tumeurs.

Dans une seconde partie, nous proposerons des stratégies de sensibilisation aux thérapies impliquant la voie de TRAIL.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

I. Modèles Cellulaires

1. Lignées cellulaires

De nombreuses lignées cellulaires humaines ont été utilisées au cours de cette étude, reflétant l'hétérogénéité observée chez les patients (degrés variables de différenciation ostéoblastique pour les lignées d'ostéosarcome, type de la translocation EWS-FLI1 pour les lignées de sarcome d'Ewing, statut p53, mutation p16, ...). Onze lignées cellulaires de sarcome d'Ewing et huit lignées d'ostéosarcome ont été cultivées à 37°C en atmosphère saturée en eau à 5% de dioxyde de carbone (CO₂). Les lignées utilisées sont répertoriées dans les **TABLEAU III ET IV**, ainsi que leurs caractéristiques, leur provenance et le milieu de culture utilisé. Les milieux de culture (Lonza) sont supplémentés avec 5% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Hyclone). Les lignées TC-71, EW-7 et STA-ET-1 requièrent une préparation de la surface de culture avec du collagène de type I (BD Science) pour adhérer. Quand les cellules arrivent à 90-95% de confluence, le tapis cellulaire est lavé avec du Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, Lonza) pour éliminer les traces de SVF. Les cellules sont décollées par un traitement de Trypsine-EDTA (Lonza). Les cellules sont réensemencées au nombre de 10 000 par cm².

LIGNEE	LOCALISATION	PATIENT	MILIEU DE CULTURE	ETABLISSEMENT
A-673	Sarcome osseux	Patiente 15 ans	DMEM	SA Aaronson
BRZ-IOR	Sarcome osseux		IMDM	Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologne, Italie
EW-24	Sarcome osseux	Patiente 20 ans	DMEM	Institut Curie, Paris, France
EW-7	Sarcome osseux		RPMI	Institut Curie, Paris, France
MHH-ES-1	Sarcome osseux	Patient 12 ans	RPMI	T Pietsch, E Göttert
RD-ES	Sarcome osseux	Patient 19 ans	RPMI	G Marshall, M Kirchen
SK-ES-1	Sarcome osseux	Patient 18 ans	DMEM	G Trempe, LJ Old
SK-N-MC	Métastase de sarcome extra-osseux	Patiente 14 ans	RPMI	G Trempe, LJ Old
STA-ET-1	Sarcome osseux		RPMI	Children's Cancer Research Institute, Vienne, Autriche
TC-32	Sarcome extra-osseux	Patiente	DMEM	St. James's University Hospital, Leeds, Royaume-Uni
TC-71	Sarcome osseux	Patient 22 ans	RPMI	Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologne, Italie

Tableau III Lignées cellulaires humaine de sarcome d'Ewing utilisées au cours de cette étude

LIGNEE	LOCALISATION	PATIENT	MILIEU DE CULTURE	ETABLISSEMENT
CAL-72	Sarcome osseux	Patient 10 ans	DMEM	Centre Antoine Lacassagne, Nice, France
G-292	Sarcome osseux	Patiente 9 ans	DMEM	PT Peebles
K-HOS	Sarcome osseux	Patiente 13 ans	DMEM	JS Rhim
MG-63	Sarcome osseux	Patient 14 ans	DMEM	A Billiau
MNNG-HOS	Sarcome osseux	Patiente 13 ans	DMEM	S Rhim
SAOS-2	Sarcome osseux	Patiente 11 ans	McCoy's	J Fogh, G Trempe
SJSA-1	Sarcome osseux	Patient 19 ans	RPMI	DN Shapiro
U-2-OS	Sarcome osseux	Patiente 15 ans	DMEM	Hellstrom

Tableau IV Lignées cellulaires humaines d'ostéosarcome utilisées au cours de cette étude

2. Modèles de reproduction des conditions du microenvironnement tumoral osseux *in vitro*

Le microenvironnement tumoral osseux tient une place importante dans la réponse des cellules tumorales aux traitements. Afin de comprendre les fonctions des différents composants de ce microenvironnement sur la réponse aux agents utilisés, il est nécessaire de les reproduire *in vitro* pour étudier leur rôle séparément.

a. Modèle d'hypoxie induite par la Déféroxamine (DFO)

En absence de chambre à hypoxie, il est possible de mimer *in vitro* l'induction des gènes de l'hypoxie régulés par le facteur de transcription clef Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α grâce à la Déféroxamine (DFO). Cette petite molécule, par son activité de chélation de l'ion Fe³⁺, permet la séparation du complexe HIF-1 α – protéine suppresseur de tumeur Von Hippel Lindau (pVHL) ce qui empêche l'ubiquitinylation de HIF-1 α et sa dégradation par le protéasome observées en conditions normales normoxiques. Grâce à la DFO, HIF-1 α stabilisé peut être alors importé dans le noyau où il joue son rôle de facteur de transcription pour les gènes de l'hypoxie (**FIGURE 25**).

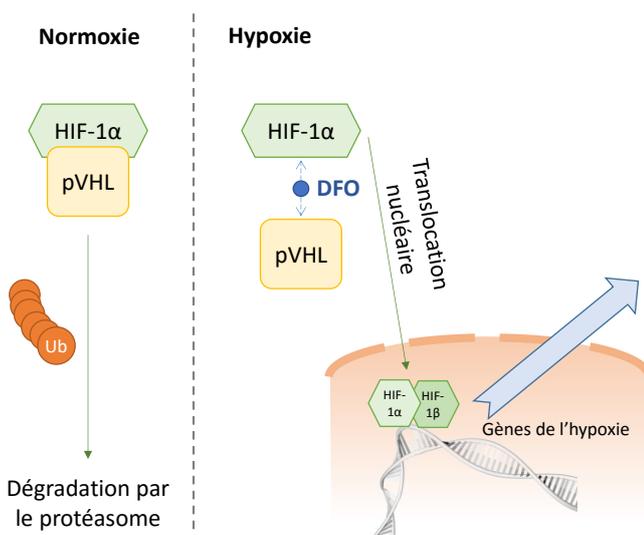


Figure 25 La voie de régulation des gènes induits par l'hypoxie. Dans des conditions normoxiques, Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α est complexé à la protéine suppresseur de tumeur Von Hippel Lindau (pVHL), conduisant à son ubiquitinylation (Ub) et à sa dégradation par le protéasome. En conditions hypoxiques (qui peuvent être imitées expérimentalement par la déféroxamine (DFO)) pVHL se dissocie de HIF-1 α , provoquant la stabilisation de HIF-1 α , sa translocation vers le noyau et la transcription de gènes conduisant à la traduction des protéines effectrices de l'hypoxie. Modifiée d'après (Weiss and Lin, 2006).

La DFO (Sigma) est utilisé en prétraitement pendant 24h puis durant les tests de prolifération utilisés aux concentrations de 0,1 ; 1 et 10 μM .

b. Modèle d'acidité du pH extracellulaire

Le milieu de culture DMEM est un milieu tamponné contenant un indicateur coloré du potentiel Hydrogène (pH) (rouge phénol), l'atmosphère de culture cellulaire de 5 % en dioxyde de carbone (CO_2) permet de conserver un pH constant à l'image de l'échange CO_2 -bicarbonate nécessaire à l'homéostasie du pH sanguin.

Pour rendre le pH de ce milieu plus acide, de l'acide chlorhydrique (HCl) 1N (Sigma) est ajouté au milieu. Le pH est mesuré par pH-mètre sous agitation et après équilibre. Une gamme croissante de volumes de HCl ajoutés est réalisée afin de déterminer les volumes nécessaires à l'obtention de DMEM pH=7 et pH=6,5 (FIGURE 26). Les pH des milieux après 72h de culture sont mesurés afin de déterminer si l'atmosphère de culture cellulaire de 5 % de CO_2 modifie les pH désirés.

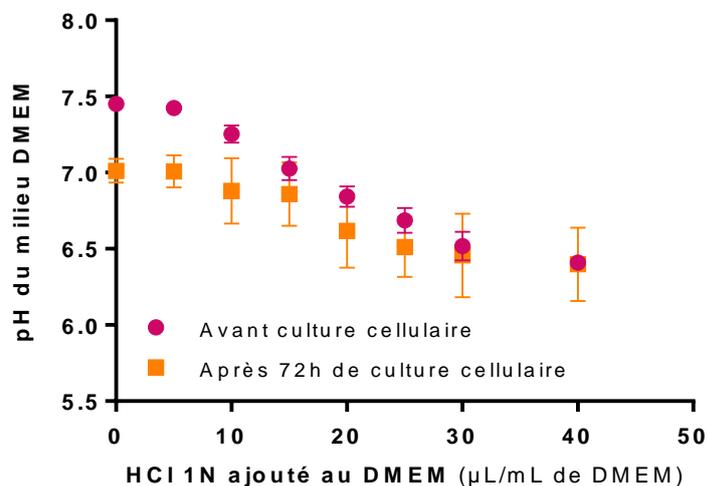


Figure 26 pH du milieu DMEM en fonction de la quantité de HCl 1N ajoutée (en μL de HCl par mL de DMEM) avant ou après 72h de culture cellulaire. Le pH est mesuré par pH-mètre.

Pour les tests de viabilité cellulaire, les DMEM à pH=7 et pH=6,5 sont obtenus par l'ajout respectivement de 15 μ L et 30 μ L de HCl 0,1N par mL de DMEM. Les cellules sont pré-incubées 24h dans ce milieu avant les expérimentations.

II. Modèles *in vivo*

Les tumeurs osseuses pédiatriques sont des cancers complexes, étroitement liés à leur environnement. Notre étude requiert donc l'utilisation de modèles *in vivo* pertinents. Les lignées cellulaires utilisées pour le développement de ces modèles sont toutes d'origine humaine et nécessitent ainsi des souris immunodéficientes pour leur implantation. Des souris NMRI/Nude (élevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) âgées de 4 semaines sont utilisées pour les expérimentations *in vivo*. Les animaux sont hébergés dans des conditions non pathogènes au sein de l'Unité de Thérapie Expérimentale (Faculté de Médecine, Nantes) en accord avec le comité d'éthique régional des Pays de Loire (CEEA.PdL.06).

Les cellules sont décollées, lavées au DPBS, comptées et préparées à la concentration souhaitée, selon les modèles. Les cellules sont injectées dans un volume de 50µL en site orthotopique para-tibial. L'injection intramusculaire nécessite l'activation du périoste tibial par abrasion avec l'aiguille de la seringue, sous anesthésie par mélange air-isoflurane (3% isoflurane, débit de 2L par minute). Grâce à la libération de facteurs osseux pro-tumoraux sécrétés par le périoste en réparation, une tumeur se développe au contact du tibia de quatre à dix jours après l'injection, suivant les modèles.

Le volume tumoral est mesuré deux fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse. La mesure de la tumeur selon trois axes perpendiculaires permet de calculer le volume tumoral suivant la formule :

$$Volume\ tumoral = \frac{L \times l \times h}{2}$$

Avec L : Longueur ; l : largeur ; h : hauteur.

1. Administration de traitements

Plusieurs voies d'injection sont utilisées dans cette étude. L'agoniste de DR5 AMG655 (AMGEN, Thousand Oaks, USA) est injecté par voie intraveineuse dans le sinus rétro-orbitaire. Les souris sont anesthésiées par isoflurane (3% isoflurane, débit de 2L par minute), l'AMG655 dilué dans du NaCl 0,9% stérile est injecté dans un volume final de 100 μ L à la concentration voulue de 5 ; 50 ou 100 μ g/dose pour des souris de 25g, soit de 0,2 ; 2 et 4mg/kg.

L'acide zolédronique est injecté par voie sous-cutanée dans un pli de peau du dos chez la souris vigile. L'acide zolédronique est dilué dans un volume final de 50 μ L de PBS stérile à la concentration voulue de 50 μ g/mL, soit 100 μ g/kg pour une souris de 25g.

2. Transfert de gène non viral par électro-transfert

Après anesthésie par inhalation d'un mélange air-isoflurane, 50 μ g d'ADN plasmidique dilué dans un volume final de 50 μ L de PBS sont injectés dans le muscle tibial antérieur gauche des animaux. La patte est enduite d'un gel conducteur (Aquasonic, Parker). Les impulsions électriques sont produites à l'aide du générateur ECM 380BTX (Genetronics) et appliquées au muscle 30 secondes après l'injection à l'aide de deux électrodes plates en acier inoxydable, distantes de 5mm (largeur de la patte). Les électrodes sont placées de part et d'autre de la patte de la souris (**FIGURE 27**). Les conditions utilisées pour le générateur sont de 8 impulsions de 180V/cm, d'une durée de 20 ms chacune et administrées à la fréquence de 5 Hz.

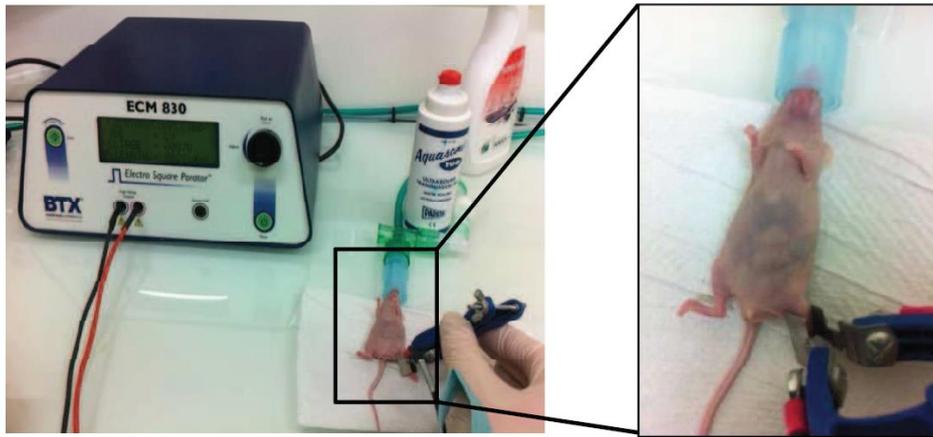


Figure 27 Electro-transfert d'ADN plasmidique chez la souris Nude.

III. Outils

1. Protéines recombinantes humaines

Le choix de la protéine recombinante TRAIL humaine (rhTRAIL) qui va être utilisée dans cette étude est capital. En effet, on sait que suivant l'organisme de synthèse, la présence de « tags » utilisés pour la purification ou la multimérisation, la pureté de la préparation ou la solution de reconstitution utilisée peuvent varier, et ainsi la réponse des cellules en sera modifiée. Nous avons ainsi fait le choix du rhTRAIL de R&D Systems (375-TL, R&D Systems, Etats-Unis) produit dans des cellules de myélome murin avec une méthionine en position N-terminale et un tag 6-His. La protéine recombinante est reconstituée selon les recommandations du fournisseur à 20 µg/mL dans du PBS stérile 0,1% BSA.

La protéine recombinante Fas-L utilisée provient de R&D Systems (126-FL, R&D Systems) produite dans une lignée ovarienne de cochon d'inde avec une méthionine en position N-terminale et un tag 6-His. La protéine recombinante est reconstituée selon les recommandations du fournisseur à 100 µg/mL dans du PBS stérile 0,1% BSA.

2. Variants de TRAIL sélectifs pour un des récepteurs de mort

Afin d'étudier le rôle de chacun des récepteurs de mort de TRAIL séparément et de limiter l'impact des récepteurs leurres, plusieurs équipes ont cherché à développer des variants de TRAIL, mutés ponctuellement, afin de modifier leur affinité envers les différents récepteurs. Des études bio-informatiques et des sélections par affinité ont ainsi permis à l'équipe irlandaise d'Eva Szegezdi de synthétiser plusieurs variants de TRAIL ayant une affinité très supérieure pour l'un ou l'autre des récepteurs de mort (van der Sloot et al., 2006; Tur et al., 2008).

Le variant sélectif pour DR5 utilisé dans cette étude est le D269H/E195R (van der Sloot et al., 2006).

Le variant sélectif pour DR4 utilisé est le 4C9 (Reis et al., 2010).

Ces deux variants sélectifs ont été gracieusement fournis en solution à 100 µg/mL. par Eva Szegezdi, Galway, Irlande.

3. Anticorps agoniste de DR5 – AMG655

L'AMG 655, commercialisé sous le nom de Conatumumab, est un anticorps humanisé, agoniste du récepteur de mort DR5, produit par la société AMGEN (Bajaj and Heath, 2011; Kaplan-Lefko et al., 2010). L'AMG655 est d'ores et déjà utilisé en phase d'essai clinique chez des patients atteints de différents types de cancers pour ses propriétés proapoptotiques ciblant spécifiquement les cellules tumorales.

L'AMG655 est dilué dans du DPBS pour les expérimentations *in vitro* à la concentration de 100µg/mL.

L'AMG655 est dilué dans du NaCl 0,9% pour les expérimentations *in vivo*.

4. Multiple agoniste des récepteurs de TRAIL –APG880

Afin d'augmenter l'activation de la voie proapoptotique de TRAIL, la société allemande APOGENIX a mis au point un agoniste des récepteurs de TRAIL capable de fixer 6 récepteurs. En effet, cet agoniste est une protéine de fusion humanisée dont la structure se compose d'un assemblage de deux chaînes de molécules de TRAIL trimérique fusionnées de manière covalente par le fragment Fc d'une immunoglobuline G humaine (Gieffers et al., 2013).

L'APG880 est dilué dans du DPBS pour les expérimentations *in vitro* à la concentration de 100µg/mL.

5. Cellules souches mésenchymateuses (CSM) utilisées comme source stable de TRAIL

Parmi les différentes stratégies pour augmenter l'effet thérapeutique de TRAIL, l'utilisation de cellules exprimant TRAIL à leur surface est prometteuse. Le plus souvent, ces cellules porteuses sont des cellules souches mésenchymateuses dérivées d'adipocytes (CSM-da), modifiées stablement par des vecteurs codant pour le gène humain de TRAIL. L'équipe italienne de Massimo Dominici a ainsi pu transduire par technique lentivirale des CSM-da avec un vecteur MIGR1 codant pour la GFP et le gène complet TRAIL humain (MIGR1-TRAIL-GFP). Des CSM-da transduites par un vecteur MIGR1 codant uniquement pour la GFP sont utilisées comme contrôles (Grisendi et al., 2010). Dans un souci de clarté, ces CSM seront nommées respectivement CSM-TRAIL et CSM-GFP.

Ces cellules sont cultivées suivant les protocoles décrits en **M&M I.1**. Le milieu de culture est l'αMEM (LONZA) supplémenté de 10% SVF, 2 mmol.L⁻¹ L-Glutamine et 2ng.mL⁻¹ basic Fibroblast Growth Factor (bFGF – R&D systems).

IV. Techniques

1. Etude de la prolifération et de la migration cellulaire

Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits à une concentration idéale pour chaque lignée, déterminée précédemment afin d'obtenir une confluence de 90% après 72h de culture dans les puits contrôles. Ces nombres de cellules par puits sont compris entre 5000 pour les lignées à long temps de doublement à 1500 pour les lignées les plus rapides. Les cellules sont cultivées en présence de concentrations croissantes de l'agent testé. La viabilité cellulaire après 72h est déterminée par le test de prolifération cellulaire au sel stable de tetrazolium WST-1 (Roche, Allemagne). Après la période de culture et l'ajout de réactif WST-1 durant 4h à 37°C, l'absorbance est lue à 490 nm sur le lecteur de plaque VICTOR2 (PerkinElmer, Etats-Unis).

a. Détermination des concentrations inhibitrices médianes (IC50)

L'étude de la prolifération cellulaire en présence de concentrations croissantes de la molécule d'intérêt permet la détermination de la concentration nécessaire pour inhiber la moitié de la prolifération du contrôle en un temps donné (IC50).

Les IC50 sont calculées grâce au logiciel GraphPad Prism (Graphpad Software Inc. v6.01) avec la simulation informatique courbe dose-réponse d'inhibition.

b. Etude de synergie entre un activateur des récepteurs de TRAIL et des agents potentiellement sensibilisants

Afin de déterminer s'il existe une synergie dans les effets d'un activateur des récepteurs de TRAIL (rhTRAIL, AMG655, ...) et ceux d'un agent potentiellement sensibilisant, la méthode du calcul l'index de combinaison (Combinaison Index - CI) de Chou et Talalay est utilisée (Chou, 2010). Les deux agents sont testés séparément puis en combinaison suivant un ratio de concentrations constant. Le graphe dit de Chou-Talalay ($CI=f(Fa)$), tracé à l'aide du logiciel CompuSyn (ComboSyn, Inc.), permet de déterminer si les effets des deux agents sont synergiques, additifs ou antagonistes. Le résultat est visuel sur le graphe, si la simulation informatique de combinaison suit la droite de $CI=1$, les effets des deux agents sont simplement additifs, si elle se trouve en dessous, leurs effets sont synergiques **(FIGURE 28)**.

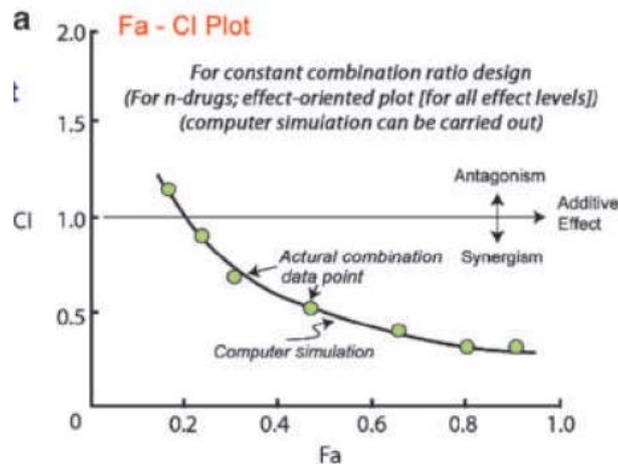


Figure 28 Exemple de graphe Chou Talalay de l'Index de Combinaison en fonction de Fa ($CI=f(Fa)$), la simulation informatique de combinaison est en dessous de la droite $CI=1$, les effets des deux agents sont donc synergiques (Chou, 2010).

c. Etude de la migration cellulaire

La migration cellulaire est étudiée sur des cellules soumises à un gradient de SVF à travers des pores de $8\ \mu\text{m}$ dans le modèle des chambres de Boyden. Les cellules sont prétraitées avec du milieu contrôle, les agents testés ou du TGF β 5ng/mL (rhTGF β -1, R&D Systems) utilisé comme contrôle positif d'inducteur de la migration. Les cellules sontensemencées dans la partie supérieure de la chambre de Boyden à pores de $8\ \mu\text{m}$ avec les traitements précédents dans du milieu sans SVF. La partie inférieure est remplie de milieu 5%SVF créant un gradient de SVF favorable à la migration vers la face inférieure de la membrane de la chambre de Boyden (Transwell $8\ \mu\text{m}$, Dominique Dutscher). Après 24h, les cellules de la face inférieure sont fixées au glutaraldéhyde 2% (Sigma) et colorées au Crystal Violet (Sigma). La surface recouverte de cellules ayant migré par rapport à la surface totale de la membrane est évaluée avec le logiciel ImageJ (**FIGURE 29**).

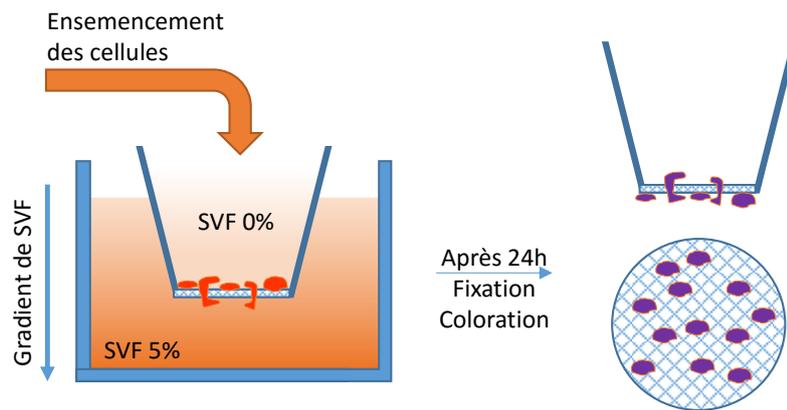


Figure 29 Schéma de l'étude de la migration cellulaire en fonction d'un gradient de SVF à travers des pores 8µm.

2. Etude de l'induction de l'apoptose

a. Test enzymatique d'activation des caspases

L'activité de la caspase-3, caspase effectrice de l'apoptose indique directement le déclenchement de l'apoptose et se mesure par une technique fluorométrique utilisant le kit CaspACE™ Assay System Fluorometric (Promega). Le substrat (peptide Asp-Glu-Val-Asp marqué avec le fluorochrome 7-amino-4-methylcoumarin) est clivé et le fluorochrome libéré lorsque la caspase-3 est activée. La fluorescence proportionnelle à la quantité de substrat clivé est alors détectée à 460 nm après une exposition aux UV à 360nm.

Les cellules sont ensemencées en plaque 6 puits à raison de $2 \cdot 10^4$ cellules par puits et cultivées pendant 24h avant un traitement par $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ de rhTRAIL sur une période de 8h, 16h ou 24h. Un contrôle positif est réalisé en traitant des cellules avec $1 \mu\text{M}$ de Staurosporine (STS - Sigma) pendant 8h. Les lysats cellulaires sont obtenus en utilisant le tampon de lyse (ANNEXE I). Le test d'activité est réalisé en plaque à fond noir 96 puits : $98 \mu\text{L}$ de mélange réactionnel (tampon caspase, DTT 100mM, et lysats protéiques) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est scellée et incubée 30 min à 37°C , puis $2 \mu\text{L}$ de substrat à $2,5 \text{ mM}$ sont ajoutés dans chaque puits. Après une nouvelle incubation de la plaque deux heures à 37°C , la fluorescence est mesurée. La quantité totale de protéines est déterminée en parallèle

par dosage protéique, les résultats sont exprimés en unités arbitraires de l'activité caspase-3 par μg de protéines.

b. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de discriminer les cellules en apoptose dans une population grâce au marqueur PhosphatidylSérine. Dans des conditions normales, ce phospholipide présent dans la membrane plasmique n'est exposé que sur le feuillet interne de la bicouche lipidique de la membrane plasmique, un des premiers événements de l'entrée en apoptose d'une cellule est l'exposition de la PhosphatidylSérine sur le feuillet externe de la membrane plasmique. La protéine Annexine V est une protéine possédant une forte affinité pour la phosphatidylsérine ; elle est couplée à un fluorochrome et permet de marquer les cellules en apoptose précoce. L'addition de l'agent intercalant iodure de propidium (IP) qui ne pénètre dans les cellules que lorsque la membrane plasmique est altérée en phase tardive d'apoptose permet de distinguer les cellules en nécrose de celles en apoptose (Annexine V et IP négatives : cellules vivantes ; Annexine V positives et IP négatives : phase précoce d'apoptose ; Annexine V et IP positives : phase tardive d'apoptose et/ou nécrose)

Le test utilisé est le test Annexin V-FITC de BD biosciences selon les instructions du fournisseur. Le pourcentage de cellules tumorales en apoptose est quantifié sur le cytomètre FC500 (Beckman Coulter).

3. Expression transcriptionnelle, traductionnelle et de surface

a. RT-qPCR

- **Extraction d'ARN**

Les cellules sont cultivées en plaque 6 puits. A 80% de confluence, l'extraction des ARN totaux des cellules est réalisée à l'aide du kit DirectZol (Bioscience) en suivant les recommandations du

fournisseur. La concentration en ARN extraits est ensuite mesurée à l'aide d'un spectromètre Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA), le rapport DO260/DO280 doit être compris entre 1,8 et 2 (pureté de l'échantillon).

- **Transcription inverse (Reverse Transcription - RT)**

La production d'ADN complémentaires (ADNc) par transcription inverse a été effectuée avec des oligonucléotides « Oligo(dT)₂₀ » (50 pmoles/réaction) fournis dans le kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ces oligonucléotides se positionnent au niveau de la queue polyA des ARN messagers (ARNm) et permettent par la suite la détection de transcrits multiples. L'enzyme utilisée dans ce kit est une reverse transcriptase d'origine aviaire, qui a été développée afin d'obtenir une grande stabilité thermique et pour rétrotranscrire des fragments d'ARNm de grande taille. Un µg d'ARN total est mis en présence de 1µL d'Oligo(dT)₂₀, de 2µL de dNTPs 10mM (1mM final) et d'eau afin d'obtenir un volume final de 12µL. Ce mélange a été chauffé 5 min à 65°C avant d'ajouter 4µL de tampon de réaction 5X (concentrations finales : 50mM TRIS acétate, 75mM d'acétate de potassium et 8mM d'acétate de magnésium), 1µL de DTT 0,1M (5mM final), 1µL de ThermoScript à 15U/µL (0,75U/µL final). Le volume final est de 20µL. La réaction est réalisée à 50°C pendant 30 minutes puis stoppée par chauffage à 85°C pendant 5 minutes. Les produits de RT sont ensuite utilisés pour la réaction d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction).

- **PCR quantitative**

La Polymerase Chain Reaction quantitative en Temps Réel (RT-qPCR) permet de quantifier le processus d'amplification en détectant la fluorescence émise par les produits d'amplification PCR. Les expériences de RT-qPCR ont été réalisées à l'aide de l'appareil CFX96 de Biorad permettant de travailler avec des plaques 96 puits. Dans chaque puits, 10ng d'ADNc sont déposés ainsi que 8µL du mélange [IQ SYBR Green Supermix (BioRad) et des primers sens et anti-sens du gène d'intérêt (300nM)]. Les séquences des primers utilisés sont présentées en **ANNEXE 2**. Les gènes de ménage GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et β2M (β2-Microglobuline) sont utilisés comme références internes pour analyser les différences d'expression potentielles.

b. Western Blot

La technique de Western Blot permet de détecter la présence d'une protéine d'intérêt en fonction de sa taille par l'utilisation d'anticorps spécifiques. Une étude semi-quantitative est possible en comparant l'intensité de la protéine d'intérêt à celle d'une protéine de référence présente de façon ubiquitaire et à concentration constante, ici la β -actine.

- **Extraction protéique**

De un à deux millions de cellules sont lavées au PBS (DPBS, Biowhittaker) afin d'éliminer toute trace de SVF puis lysées dans 200 μ L de tampon de lyse (SDS 1%, sodium orthovanadate 1mM, Tris-HCl pH 7,4 10mM). Après extraction, les protéines sont dosées par mesure de l'absorbance selon la méthode de coloration à l'Acide Bicinchroninique (BCA). Le principe de cette méthode repose sur la réduction de l'ion Cu^{2+} en Cu^+ en milieu alcalin par les protéines. Le BCA, réactif spécifique du Cu^+ , forme avec ce dernier un complexe pourpre dont l'absorbance est mesurée à 570 nm. Les différents extraits cellulaires sont dilués au 1/10^{ème} puis incubés 30 minutes à 37°C avec du Sulfate de Cuivre (Sigma) et du BCA (Sigma), la Densité Optique obtenue étant proportionnelle à la quantité de protéines présentes. La réalisation en parallèle d'une gamme étalon avec des quantités croissantes connues de Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma), de 0 à 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, permet de comparer et quantifier précisément la concentration en protéines présentes. Soixante μg de protéines en solution dans le tampon de lyse sont dénaturés à 95°C pendant 5 minutes dans du tampon Laemmli 4X (Tris pH 6,8 200mM, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 8%, Glycérol 40%, DTT : 400 μ M, bleu de bromophénol 0,04%, β -mercapto-éthanol 20%).

- **Migration et transfert**

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse sur gel dénaturant de SDS et polyacrylamide (10%). Une fois séparées, les molécules sont ensuite électro-transférées sur une membrane de PolyVinylidène Fluoride (PVDF, Immobilon-P membrane, Millipore) puis la révélation de la protéine d'intérêt est réalisée à l'aide d'un anticorps spécifique.

- **Hybridation et révélation**

La membrane est ensuite rincée dans le tampon de lavage. Puis, suite à une étape de saturation des sites antigéniques non spécifiques dans la solution de saturation 1, la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt durant une nuit à 4°C. Les anticorps utilisés sont présentés en **TABLEAU V** et dilués dans de la solution de saturation 1. Après trois lavages, la membrane est soumise à une deuxième étape de saturation dans la solution de saturation 2 puis à une incubation d'une heure avec un anticorps secondaire couplé à la HorseRadish Peroxydase (HRP) ciblant l'anticorps primaire. Les protéines d'intérêt sont révélées en incubant la membrane 5 minutes dans une solution d'Electro-Chimioluminescence (SuperSignal West Dura, Thermo Scientific) contenant le substrat de l'enzyme peroxydase, le luminol. Le résultat du western blot est révélé grâce au système d'imagerie G-box (Syngene, Cambridge). Pour chaque protéine, l'exposition peut varier de quelques secondes à une heure de façon à obtenir un signal détectable mais non saturé. Le logiciel utilisé est GeneSnap (Syngene).

	Cible	Phosphorylation	Fournisseur	Référence	Espèce	Masse moléculaire (kDa)
Forme phosphorylée	AKT	Thr308	Cell Signaling	cs9275	Lapin	60
	p38	Thr180/Tyr182	Cell Signaling	cs9211	Lapin	43
	NFκB-p105	Ser933	Cell Signaling	cs4806	Lapin	120
	c-Jun	Thr91	Cell Signaling	cs2303	Lapin	48
	STAT-3	Tyr705	Cell Signaling	cs9131	Lapin	80
Forme totale	AKT		Cell Signaling	cs9272	Lapin	60
	p38		Cell Signaling	cs9212	Lapin	43
	NFκB-p105		Cell Signaling	cs4717	Lapin	120
	c-Jun		Cell Signaling	cs60A8	Lapin	48
	STAT-3		Cell Signaling	cs4904	Lapin	80
	DR4		Santa Cruz	sc-7863	Lapin	46
	DR5		Santa Cruz	sc-7191	Chèvre	48
	RIPK1		Cell Signaling	cs4926	Lapin	78
	IAP1/2		Santa Cruz	sc-12410	Chèvre	65
	β-Actine		Sigma	A5060	Lapin	42
	GAPDH		Cell Signaling	cs2118	Lapin	37
	HIF-1α		Novus	NB100-134	Lapin	100

Tableau V Anticorps utilisés en Western Blot

c. Méthode immuno-enzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Un test ELISA en sandwich est utilisé pour mesurer la quantité de TRAIL présente dans des surnageants cellulaires, dans des lysats de cellules en culture, dans des lysats tissulaires ou le sérum murin (Kit DuoSet DY375, R&D Systems).

Une plaque 96 puits est préparée avec la fixation d'un anticorps polyclonal anti-TRAIL humain (0,2 µg/puits, 841142 R&D Systems) pendant une nuit à température ambiante, lavée et incubée pendant

1h avec une solution de blocage (1% d'albumine de sérum bovin (BSA) diluée dans du tampon phosphate salin (PBS)). Après lavage, les puits sont incubés à température ambiante avec l'échantillon à doser et une gamme de rhTRAIL permettant la quantification précise pendant 2h, suivie de 2h d'incubation avec un anticorps anti-TRAIL humain conjugué à la biotine (0,1 µg/puits, 841143 R&D Systems). La détection est réalisée par incubation des puits avec de la streptavidine-peroxydase (1:200; R&D Systems) pendant 30 minutes. La réaction est stoppée par l'addition de 50 µL de H₂SO₄ 1M, puis l'absorbance est mesurée à 410 nm en utilisant le lecteur de plaque VICTOR2 Multilabel (Perkin-Elmer). La limite de détection ELISA est de 0,02 ng/mL.

d. Cytométrie en flux

L'expression membranaire des récepteurs de TRAIL est évaluée par cytométrie en flux.

Les cellules sont décollées sans trypsine pour préserver les sites antigéniques extracellulaires avec du Versene-EDTA (Lonza), rincées au PBS-1% SVF permettant le blocage des sites aspécifiques. Les anticorps primaires utilisés pour le marquage des récepteurs de TRAIL sont produits dans des lignées murines chez Diaclone (France) et répertoriés dans le **TABLEAU VI**. Trois cent mille cellules sont incubées 20 min à 4°C avec 5µL d'anticorps primaire ou d'anticorps contrôle isotypique.

CIBLE	NOMENCLATURE	CLONE
DR4	Anti-CD261	B-N36
DR5	Anti-CD262	AB-K29
DCR1	Anti-CD263	B-D44
DCR2	Anti-CD264	B-R27
ISOTYPE CONTROLE	IgG1	B-Z1

Tableau VI Liste des anticorps primaires utilisés en cytométrie en flux (fournisseur : Diaclone)

Après deux lavages au PBS-1%SVF, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire dirigé contre les IgG1 de souris couplés à la Phycoérythrine. Après un dernier lavage, l'intensité de fluorescence de la population cellulaire est évaluée sur le cytomètre en flux FC500 (Beckman Coulter).

4. Modification transcriptionnelle des lignées par shRNA

Les vecteurs codant pour des shRNA sont intégrés au génome de la cellule tumorale par stratégie lentivirale et transcrits par l'ARN polymérase II, les produits obtenus imitant des pré-microARN pris en charge par la protéine Drosha, ils seront exportés du noyau. Les shRNA forment alors des structures tige-boucle et sont ensuite pris en charge par Dicer et chargés dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Le brin sens (brin passager) est dégradé. Le brin anti-sens (brin guide) dirige le complexe RISC vers les ARNm possédant une séquence complémentaire. Dans le cas d'une complémentarité parfaite, RISC clive l'ARNm ce qui entraîne l'extinction du gène ciblé.

a. Choix des séquences des shRNA et clonage en plasmide

Le choix de la séquence du brin guide est une étape primordiale qui déterminera l'efficacité de la stratégie. La séquence de 19 nucléotides complémentaires à l'ARNm du gène cible est choisie selon les principes édictés en 2004 par Reynolds et al. ((Reynolds et al., 2004)). La séquence doit ainsi contenir entre 40 et 50% de bases GC assurant une structure stable, ne doit comporter aucune répétitions supérieure à quatre d'une même base, avec de préférence un T ou un G en première position, un A en troisième, un U en dixième, pas de G en treizième, et au moins 3A ou T entre les positions 15 à 19. Une séquence ne ciblant aucun ARN messager murin est également produite afin d'être utilisée comme shRNA contrôle (shCT).

Les risques de reconnaissance non-spécifique sont évalués à l'aide du logiciel BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr>)

Cette séquence est synthétisée en double brin d'ADN intégrée dans la cassette tige-boucle présenté en **FIGURE 29**, entre les séquences des enzymes de restriction BglIII et HindIII.

Sens 5' GATCCCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCAAGAGAWWWWWWWWWWWWWWWWWTTTTTTGGAA 3'
 Anti-sens 5' AGCTTTCCAAAAA WWWWWWWWWWWWWWWWWWWTCTCTTGAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGG 3'

Figure 30 Schéma de l'intégration de la séquence de 19 nucléotides (N) complémentaire (W) à l'ARNm du gène cible dans la structure tige-boucle du shRNA. De part et d'autre de la cassette sont intégrées les séquences des enzymes de restrictions BglII et HindIII.

Le double-brin synthétisé est intégré dans le plasmide pSUPER (OligoEngine – **FIGURE 30**) permettant sa sélection par le gène de résistance à l'ampicilline, sa vérification par séquençage et son amplification dans des bactéries STBL-3 (Invitrogen).

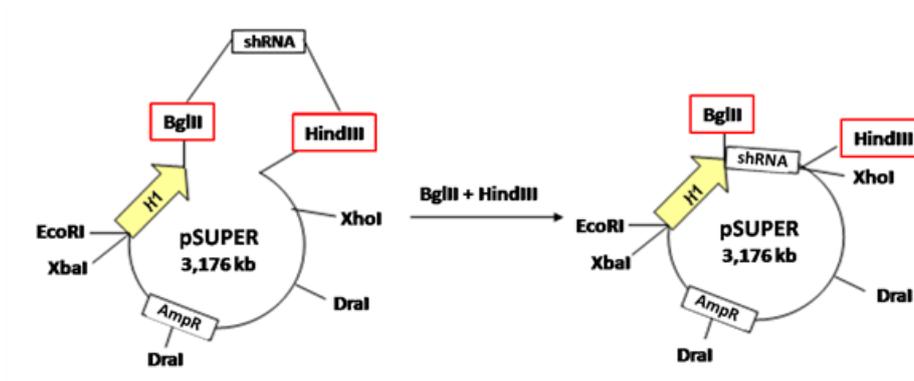


Figure 31 Intégration de la cassette contenant la séquence du shRNA dans le plasmide pSUPER linéarisé, entre les sites de restriction BglII et HindIII.

La cassette est ensuite transférée entre les sites de restriction XhoI et XbaI dans le plasmide pFG12 (**FIGURE 31**) permettant son intégration dans un vecteur lentiviral (Qin et al., 2003). Le plasmide pFG12 porte également le gène de la GFP permettant une sélection des cellules ayant intégré le plasmide par tri cellulaire.

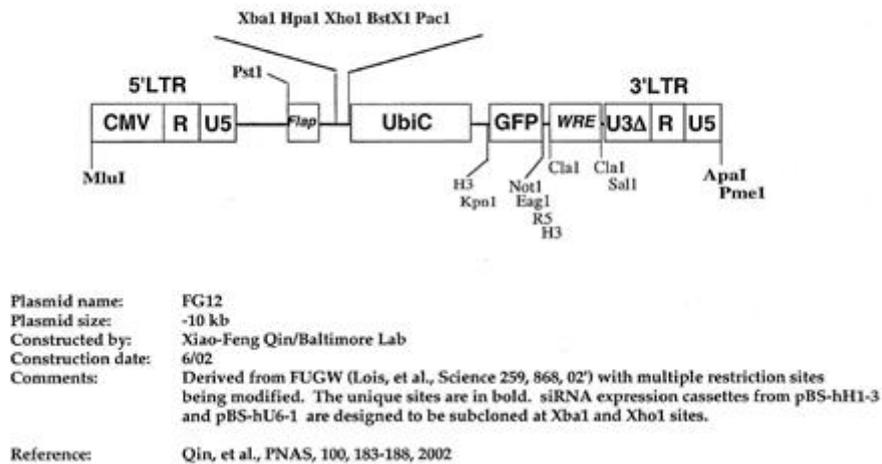


Figure 32 Séquence d'expression lentivirale du plasmide pFG12 comprenant le promoteur du shRNA, les séquences d'encapsidation et répllication lentivirales et le gène de la GFP

b. shRNA utilisés dans cette étude

Les ARNm des gènes *DR5*, *RIPK1* et *c-FLIP* sont ciblés par technique d'ARN interférence. Pour chaque gène plusieurs séquences sont proposées afin de sélectionner celle qui induit la plus forte inhibition de l'expression du gène cible. Les shRNA produits sont nommés respectivement shDR5, shRIP1 et shc-FLIP, les séquences proposées sont répertoriées dans le **TABLEAU VII**.

Les séquences des shRIP1 sont issues d'une collaboration avec le Professeur Simone Fulda, Goethe University Hospital, Frankfort, Allemagne.

DR5	shDR5-778	GAAGATTCTCCTGAGATGT
	shDR5-1537	GCAGAAGATTGAGGACCAC
	shDR5-1573	GTTCATGTATCTAGAAGGT
RIPK1	shRIP1-1	ATACCACTAGTCTGACGGA
	shRIP1-2	CTGAAGTGGACGCCTCACT
c-FLIP	shc-FLIP-1055	GGAGCAGGGACAAGTTAC

Tableau VII Liste des shRNA utilisés dans cette étude et leur séquence

c. Production de particules lentivirales et transduction des lignées

Les expérimentations nécessitant la manipulation de particules lentivirales sont réalisées dans un laboratoire de culture cellulaire classifié L3 répondant à toutes les normes de sécurité en vigueur du fait que le gène est classé dans la catégorie B, c'est-à-dire avec un danger potentiel pour l'homme (cible d'un gène humain mais qui n'est pas un suppresseur de tumeur).

La lignée cellulaire 293FT (Invitrogen), lignée commerciale exprimant l'antigène T du SV40, est utilisée pour produire les particules lentivirales. Elle est cultivée en milieu DMEM sans rouge phénol (Life Technologie) pour ne pas en concentrer ce colorant en même temps que les particules lentivirales, avec 10% de SVF et de la généticine à 500ng/ml pour entretenir l'expression de l'antigène T.

La production lentivirale est réalisée pour les shRNA clonés dirigés contre DR5, RIPK1 et pour le shRNA contrôle à l'aide du kit ViraPower™ Lentiviral Expression Systems (Invitrogen) en suivant les instructions du fournisseur. Le milieu de culture contenant les particules lentivirales est filtré à travers de filtres 0,45µm afin d'éliminer les débris cellulaires. Les particules sont ensuite concentrées par ultrafiltration avec des tubes AMICON (Millipore) puis sont conservées à -80°C.

La production lentivirale est ensuite titrée afin de connaître le nombre de particules par µl. Quarante mille cellules 293FT sont transduites par 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 ou 5µl de la production lentivirale. Le pourcentage de cellules transduites est évalué 72h après en analysant le pourcentage de cellules exprimant la GFP à l'aide d'un cytomètre en flux FC500 (Beckman Coulter). La concentration en particules lentivirales est calculée en considérant que chaque particule infecte une cellule.

Les cellules humaines de sarcome d'Ewing STA-ET-1 sont transduites par les particules lentivirales shCT, shDR5-778, shDR5-1537 et shDR5-1573. Vingt mille cellules sontensemencées en plaque 24 puits. Le lendemain, les cellules sont transduites par les particules lentivirales avec un ratio de 40 particules par cellule. Les cellules sont amplifiées puis triées au plateau technique de cytométrie en flux et de tri cellulaire de la SFR Santé François Bonamy par un cytomètre en flux FACSAria III (BD biosciences) afin de sélectionner uniquement les cellules exprimant la GFP et donc les shRNA. Quatre nouvelles lignées sont alors obtenues : STA-ET-1 shCT, STA-ET-1 shDR5-778, STA-ET-1 shDR5-1537 et STA-ET-1 shDR5-1573.

Les cellules humaines d'ostéosarcome K-HOS sont transduites par les particules lentivirales shCT, shRIP1-1 et shRIP1-2. Vingt mille cellules sontensemencées en plaque 24 puits. Le lendemain, les cellules sont transduites par les particules lentivirales avec un ratio de 40 particules par cellule. Les cellules sont amplifiées puis sélectionnées à la puromycine. Trois nouvelles lignées sont alors obtenues : K-HOS shCT, K-HOS shRIP1-1 et K-HOS shRIP1-2.

5. Histologie et analyse de la micro-architecture osseuse

Après fixation en formol 4% (Microm Microtech, France) pendant 48h, les échantillons murins (tumeurs, poumons) sont déshydratés grâce à des bains d'éthanol de concentrations croissantes (STP 120, Milestone), inclus en paraffine (EC 350, Microm Microtech) et des coupes de 3 μm d'épaisseur sont effectuées avec le microtome RM2255 (Leica, Allemagne).

a. Immunofluorescence

Une double coloration d'immunofluorescence par approche séquentielle a été utilisée pour démontrer la présence simultanée de caspase-3 clivée et de la GFP (CSM modifiées) dans la tumeur. Avant d'effectuer un double marquage, chaque anticorps primaire a été testé individuellement dans les mêmes conditions pour la titration. Les témoins négatifs sont réalisés en omettant l'anticorps primaire. Les produits utilisés sont listés dans le **TABLEAU VIII**.

Les sites de fixation aspécifiques des sections de 3 μm déparaffinées sont bloquées avec 5% de sérum de chèvre et 1% d'albumine de sérum bovin dans du TBS 1X pH = 7,4, Tween 0,05% et Triton 0,1%. Les antigènes sont démasqués dans un tampon citrate pH6. Au jour 1, les lames ont été incubées avec l'anticorps primaire ciblant la caspase-3 clivée 1h à température ambiante, avant incubation avec un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome A957. Jusqu'au jour 2, les lames sont incubées à 4 ° C avec des fragments d'IgG de chèvre anti-lapin afin de limiter le marquage non spécifique. Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire ciblant la GFP à température ambiante avant une

incubation avec un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome A488. Enfin, les lames sont montées dans le réactif Prolong Gold contenant du DAPI (Molecular Probes - P36935) et conservées à 4 ° C à l'obscurité.

		FOURNISSEUR	ESPECE	REFERENCE
ANTICORPS PRIMAIRES	Cleaved-caspase-3 clone 5A1E	Cell signaling	Rabbit α mouse	9664
	GFP - ChIP Grade	Abcam	Rabbit	ab290
ANTICORPS SECONDAIRES	Conjugué A594	Molecular	Goat α rabbit	R377117
	Conjugué A488	Probes	Goat α rabbit	R37116
AUTRES	IgG Fab	Jackson laboratory	Goat α rabbit	111-007-003

Tableau VIII Références des produits utilisés en immunofluorescence

b. La microscopie à fluorescence

La fluorescence a été visualisée en utilisant le système de microscopie Axiovert 200 M (Zeiss, Le Pecq, France) avec le module ApoTome (x63), ou avec le scanner de lame à fluorescence nanozoomer (Hamamatsu).

c. Analyse de la microarchitecture osseuse par microtomographie

L'analyse par microtomographie permet d'étudier l'architecture osseuse grâce à la reconstruction en trois dimensions. L'acquisition de chaque patte est réalisée grâce au microscanner Skyscan 1076 (Micro Photonics Inc.) et à son logiciel Skyscan. La caméra prend des images autour du sujet sur 180°, une image tous les 0,6°, la résolution des images est de 18 microns. Le logiciel NRecon permet de convertir les images obtenues afin de les analyser grâce aux logiciels CTVol et CTVox. Deux types de quantification du volume osseux sont réalisés sur les tibias au contact desquels se sont développées les tumeurs:

- volume total osseux spécifique exprimé en pourcentage de BV/TV (Bone volume/ Total Volume). La région d'intérêt est dessinée autour du tibia.
- volume osseux trabéculaire exprimé également en BV/TV (%). La région d'intérêt correspond au volume trabéculaire située en-dessous de la plaque de croissance de la tête tibiale (sur 10% de la longueur totale du tibia).

6. Analyses statistiques

Chaque expérience a été répétée au minimum trois fois de façon indépendante. Les résultats sont donnés sous forme de moyenne \pm écart-type (SD) pour des expériences *in vitro* et de moyenne \pm SEM pour des expériences *in vivo*. Ils ont été comparés en utilisant le test t non apparié ou le test ANOVA deux-voies suivi respectivement par le post-test de Bonferroni et par le test de comparaisons multiples de Tukey en utilisant le logiciel v6.01 Graph Pad Prism. Les courbes de survie sont comparées en utilisant un test Mantel-Cox.

Les résultats avec un $p < 0,05$ ont été considérés comme significatifs et représentés par un astérisque (*), $p < 0,01$ représentés par deux astérisques (**) et $p < 0,001$ représentés par trois astérisques (***)

Résultats

PARTIE I

Mécanismes de résistance à TRAIL des Tumeurs osseuses Pédiatriques

Partie I – Mécanismes de résistance à TRAIL des Tumeurs Osseuses Pédiatriques

La capacité de TRAIL à induire spécifiquement l'apoptose des cellules tumorales lui donne un intérêt thérapeutique potentiel, mais malgré cela, de nombreuses tumeurs malignes sont résistantes à cet effet pro-apoptotique (ostéosarcome, neuroblastomes, mélanomes, tumeurs pancréatiques,...). Plusieurs points de résistance étant décrits dans la voie de signalisation de TRAIL, il convient de comprendre ces mécanismes avant d'envisager une utilisation thérapeutique de TRAIL, ou d'un agoniste de ses récepteurs.

I. Caractérisation des Lignées

Afin de tenter de reproduire l'hétérogénéité tumorale des patients atteints de sarcome d'Ewing ou d'ostéosarcome, nous avons utilisé un panel de lignées cellulaires issues de patients atteints de ces pathologies. Ces lignées ont été caractérisées pour la sensibilité à l'effet pro-apoptotique de rhTRAIL ainsi que l'expression des récepteurs de mort et des inhibiteurs connus de la voie apoptotique de TRAIL afin de rechercher des corrélations.

Pour faciliter la présentation des résultats de caractérisation, quatre lignées seront utilisées comme modèles : une lignée sensible et une résistante par pathologie, les deux lignées de sarcome d'Ewing TC-71 et TC-32, et d'ostéosarcome MG-63 et K-HOS. Seulement les résultats synthétisés seront représentés pour l'ensemble des lignées.

1. Sensibilité à rhTRAIL

La sensibilité à rhTRAIL de nos lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome est évaluée par deux tests complémentaires : un test de prolifération WST-1 sur 72 heures permettant de déterminer la dose inhibitrice moyenne (IC50) de rhTRAIL pour chaque lignée (exemple pour les lignées modèles en **FIGURE 33**), permettant un classement des lignées en fonction de leur sensibilité (**FIGURE 34**), et un test spécifique de l'induction de l'apoptose par le suivi de l'activité enzymatique de la caspase-3 clivée,

confirmant que la baisse de viabilité observée est bien due à l'effet pro-apoptotique spécifique de TRAIL (FIGURE 35).

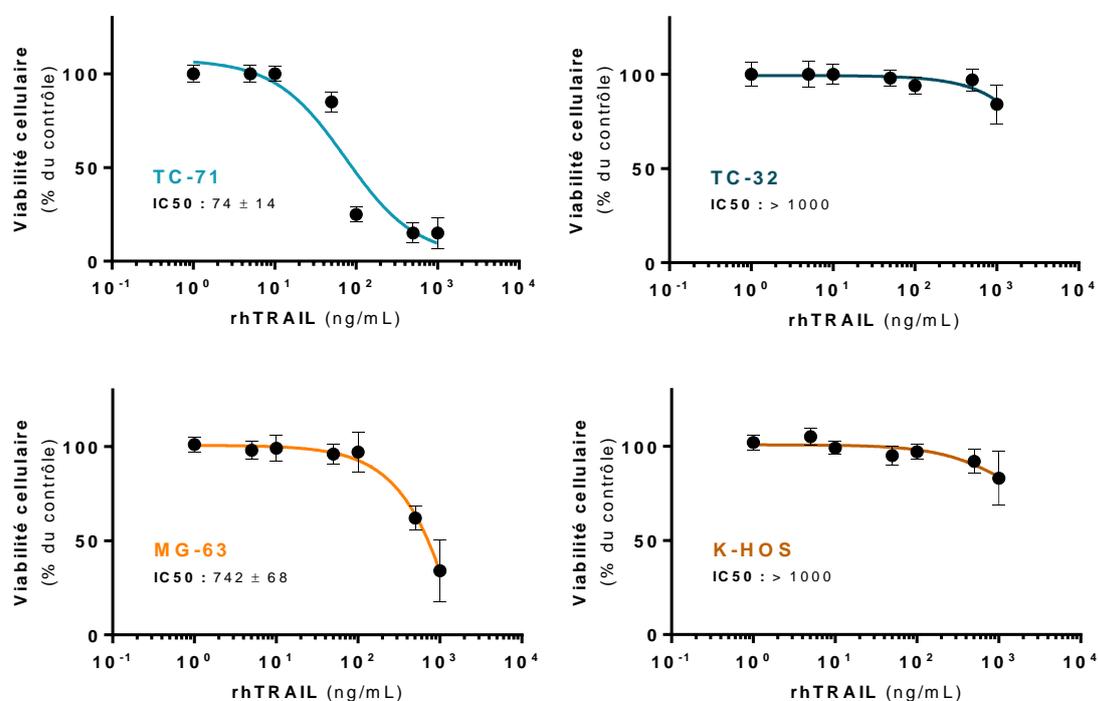


Figure 33 : Viabilité de lignées modèles en présence de rhTRAIL déterminée par test de prolifération WST-1. Les cellules sont cultivées 72h en présence de concentrations croissantes de rhTRAIL. Les IC₅₀ sont calculées avec le logiciel GraphPad Prism v6.01

Les lignées utilisées comme modèles n'ont pas la même sensibilité à TRAIL, et montrent ainsi la diversité de réponse à cette cytokine dans des lignées pourtant issues de patients ayant la même pathologie. La lignée de sarcome d'Ewing TC-71 est un exemple de lignée très sensible à l'effet pro-apoptotique de rhTRAIL, avec une IC₅₀ inférieure à 200 ng/mL de rhTRAIL (FIGURE 33 HAUT, GAUCHE) et présentant une forte activité de la caspase-3 dès 8h de traitement avec une dose relativement faible de rhTRAIL (FIGURE 35 HAUT, GAUCHE). Cette activité de la caspase 3 est très importante et très précoce pour une dose de 50ng de rhTRAIL. Au contraire, la lignée de sarcome d'Ewing TC-32 est un exemple de lignée résistante à l'effet pro-apoptotique de rhTRAIL avec une IC₅₀ non déterminée au-dessus de 1000ng de rhTRAIL et une activité de la caspase-3 proche de 0 UA/μg de protéines totales, même après 24h de traitement avec 100ng de rhTRAIL (FIGURE 33 HAUT, DROITE). Parmi les onze lignées de sarcome d'Ewing étudiées, la moitié est très sensible à rhTRAIL à l'image de la lignée TC-71 (STA-ET-1, TC-71,

RD-ES ; SK-N-MC et A-673), quatre sont sensibles dans une moindre mesure (BRZ-IOR, EW-7, SK-ES-1 et MHH-ES-1) et deux sont résistantes, TC-32 et EW-24 (**FIGURE 34, GAUCHE**).

Les lignées d'ostéosarcome présentent, elles aussi, des différences de sensibilité à rhTRAIL. La lignée modèle MG-63 a une IC50 de 742 ng/mL de rhTRAIL et montre une activité de la caspase-3 plus faible que la lignée TC-71 mais néanmoins présente dès 8h pour une dose de 100ng/mL de rhTRAIL. La lignée K-HOS est quant à elle résistante à rhTRAIL présentant les mêmes résultats de sensibilité que la lignée TC-32. Sur les huit lignées d'ostéosarcome étudiées, aucune n'est très sensible à rhTRAIL, la moitié est peu sensible, dont MG-63, CAL-72, U-2 OS et G-292. L'autre moitié représente les lignées résistantes à rhTRAIL comprenant K-HOS, MNNG-HOS, Saos-2 et SJS-1 (**FIGURE 34, DROITE**).

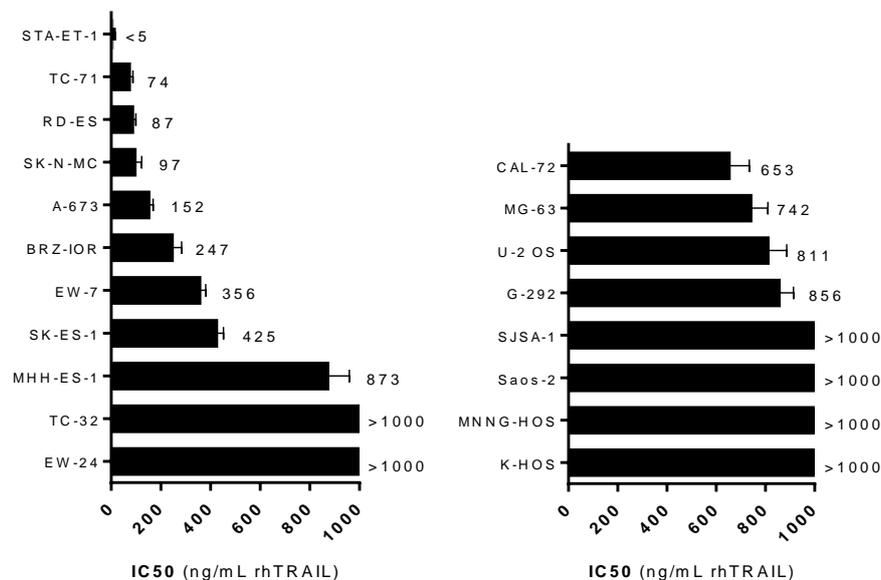


Figure 34 IC50 des lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome en réponse à rhTRAIL, exprimées en ng/mL de rhTRAIL. Les IC50 sont déterminées par le logiciel GraphPad Prism v6.01 d'après les tests de prolifération WST-1 de 72h en présence de concentrations croissantes de rhTRAIL.

Les lignées d'ostéosarcome sont donc globalement moins sensibles que les lignées de sarcome d'Ewing à rhTRAIL intrinsèquement, avec des IC50 en moyenne plus élevées et une proportion de lignées résistantes plus importante dans l'ensemble des lignées étudiées.

Afin de comprendre les raisons de ces différences entre les lignées issues de patients porteurs de la même pathologie et les différences entre les lignées issues de ces deux pathologies, une étude de la voie de signalisation apoptotique induite par TRAIL est menée par l'analyse de l'expression des différents protagonistes de cette voie.

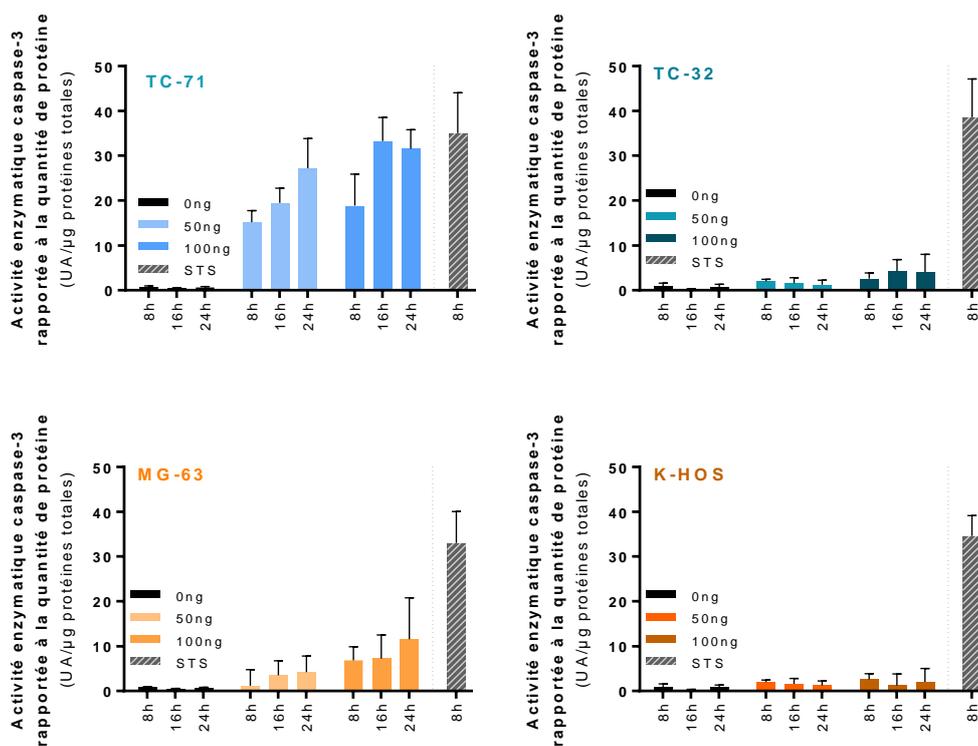


Figure 35 Sensibilité de lignées modèles à l'apoptose induite par rhTRAIL évaluée par test enzymatique spécifique de la caspase-3. Les lignées sont traitées par des doses de 0ng, 50ng ou 100ng de rhTRAIL, les cellules sont lysées et la totalité des protéines est extraite à 8h, 16h ou 24h après le début du traitement. L'activité enzymatique est mesurée par fluorescence avec le kit Caspase-Glo de Promega, les résultats sont rapportés en unités arbitraires par µg de protéines totales. La staurosporine (STS) 1µM pendant 8h est utilisée comme inducteur contrôlé de l'apoptose.

2. Expression des récepteurs de mort de TRAIL dans les lignées

Le premier niveau de régulation de la voie apoptotique de TRAIL est l'expression des récepteurs de mort DR4 et DR5 à la surface des cellules. Afin de déterminer ce niveau d'expression des récepteurs à la recherche de corrélation avec la sensibilité des lignées, plusieurs méthodes ont été utilisées : RT-

qPCR pour l'expression des transcrits, Western Blot pour l'expression protéique et cytométrie en flux sans perméabilisation pour l'expression en surface. Comme pour les études de sensibilisation, les lignées TC-71, TC-32, MG-63 et K-HOS ont été utilisées comme modèles de l'analyse complète de l'expression des récepteurs (**FIGURE 36**). Pour le récepteur DR4, trois valeurs d'expression transcriptionnelle ont été déterminées : DR4 total, et les deux isoformes DR4a (complète) et DR4b (tronquée). Les amorces de RT-qPCR ont été dessinées afin de discriminer ces isoformes. Les deux isoformes sont discriminées par la taille en Western Blot, de 46 kDa pour DR4a et 40 kDa pour DR4b. Il n'est pas possible de les discriminer en cytométrie en flux avec les anticorps à notre disposition. Pour les quatre lignées modèles, les résultats d'expressions transcriptionnelle et protéique sont superposables (**FIGURE 36 A ET B**). La lignée TC-71 exprime fortement DR4 et DR5, avec une prédominance de l'isoforme complète DR4a, la lignée TC-32 exprime DR5 avec la même intensité que TC-71 mais très peu de transcrits DR4 sont détectés, exclusivement l'isoforme DR4a, ce qui est confirmé en Western Blot par une expression protéique très faible de ce récepteur. La lignée K-HOS exprime fortement les deux récepteurs de mort, avec un équilibre entre les deux isoformes de DR4. La lignée MG-63 exprime DR5 de la même façon que K-HOS mais plus faiblement DR4.

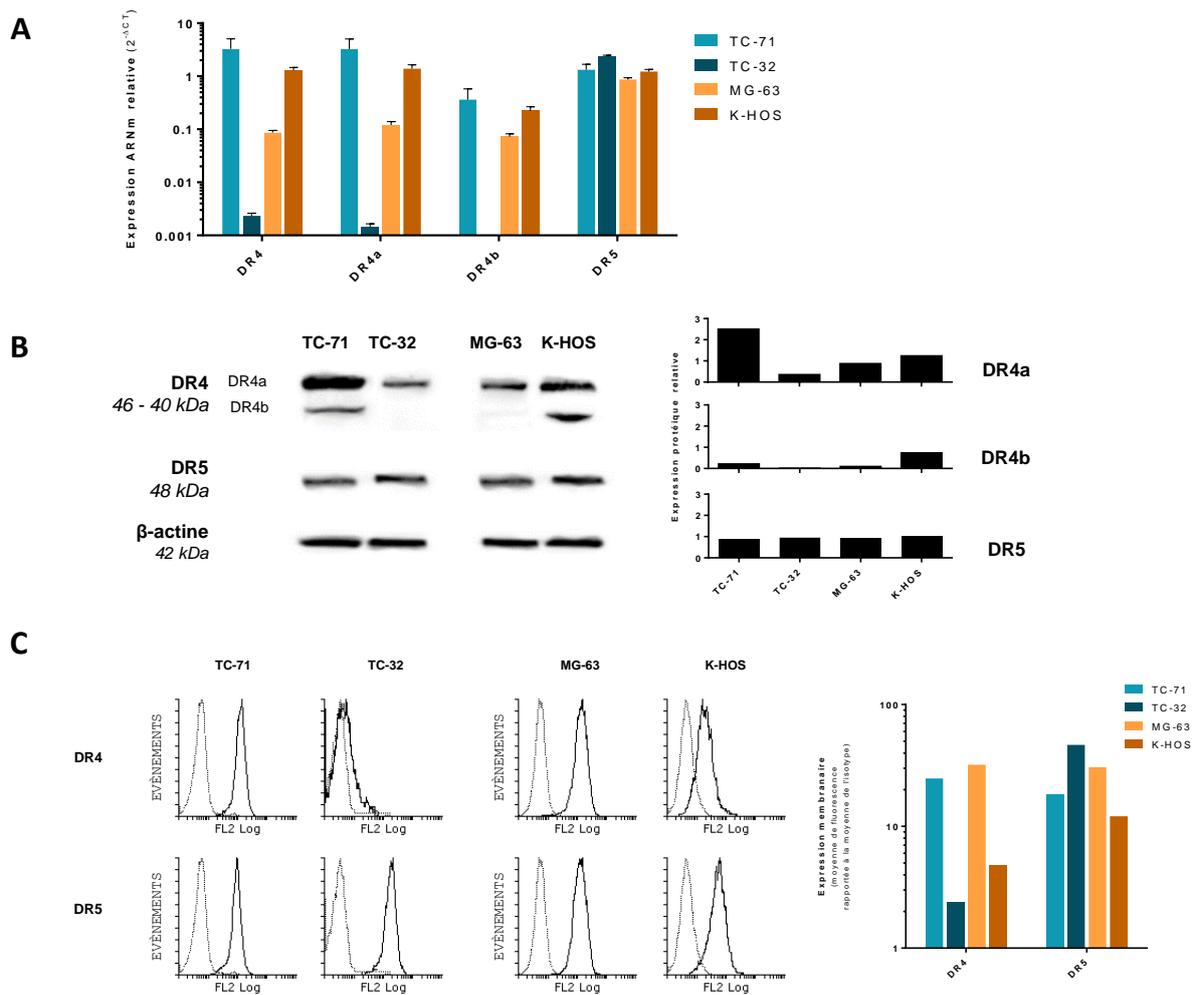


Figure 36 Expression des récepteurs de mort de TRAIL par les lignées modèles. Expression transcriptionnelle étudiée par RT-qPCR (gènes de référence : GAPDH et $\beta 2M$) (A). Expression protéique sur lysat total étudié en Western-Blot (gauche) et exprimée en intensité de signal (rapporté à l'intensité de la β -actine – droite) (B). Expression membranaire évaluée par cytométrie en flux (gauche) et exprimée en intensité de fluorescence par rapport à l'isotype contrôle (droite) (C)

L'analyse de l'expression des récepteurs en surface par cytométrie en flux révèle que la lignée K-HOS produisant pourtant fortement la protéine DR4 ne l'exprime que faiblement en surface. Ce résultat est peut-être dû à une mauvaise exportation des récepteurs à la membrane après la traduction mais peut être causé aussi par la présence importante de l'isoforme DR4b tronquée dans sa partie extracellulaire, qui n'est probablement pas reconnue par l'anticorps utilisé.

Globalement, l'expression transcriptionnelle est un bon indicateur de l'expression membranaire finale, elle est déterminée pour chaque lignée en **FIGURE 37**.

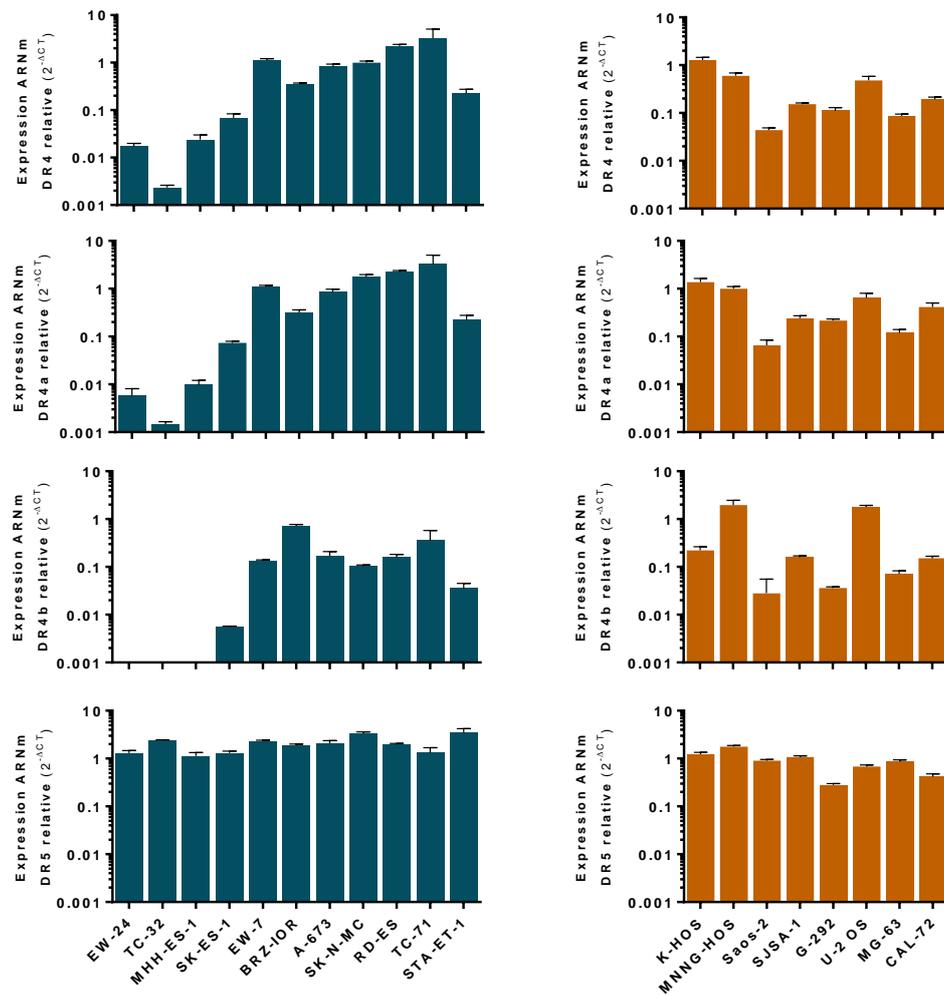


Figure 37 Expression transcriptionnelle des récepteurs de mort de TRAIL dans les lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome évaluée par RT-qPCR (gènes de référence : GAPDH et 62 microglobuline).

Si l'expression de DR5 est très stable entre les différentes lignées, celle de DR4 est très variable. L'expression de l'isoforme DR4b est le plus souvent corrélée à l'expression de la forme complète DR4a. Dans la **FIGURE 36**, les lignées sont classées de gauche à droite de la plus résistante à la plus sensible à rhTRAIL. Si ces variations de l'expression de DR4 entre les lignées d'ostéosarcome sont sans rapport avec la sensibilité, on peut déterminer pour les lignées de sarcome d'Ewing, une corrélation entre expression de DR4 et sensibilité à rhTRAIL, illustrée en **FIGURE 38**.

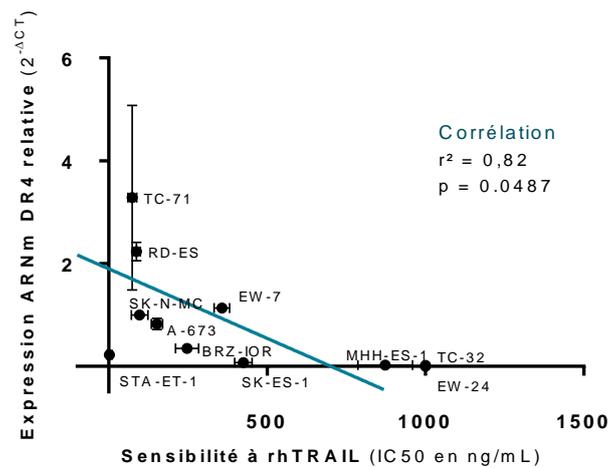


Figure 38 Corrélation entre l'expression de DR4 et la sensibilité à rhTRAIL dans les lignées de sarcome d'Ewing. L'expression de DR4 est déterminée par RT-qPCR (gènes de référence : GAPDH et $\beta 2$ microglobuline). La sensibilité à rhTRAIL est représentée par l'IC50 des lignées en ng/mL de rhTRAIL.

La lignée STA-ET-1 ne respecte cependant pas cette corrélation, n'exprimant que faiblement DR4 et étant extrêmement sensible à rhTRAIL (IC50 <5ng/mL). Afin de comprendre cette exception parmi les lignées de sarcome d'Ewing, des cellules de la lignée de STA-ET-1 ont été modifiées pour exprimer un shRNA ciblant le transcrite *DR5*, noté shDR5-1573. Le shDR5-1573 est capable d'inhiber 50% des transcrits DR5 dans la lignée STA-ET-1 (**FIGURE 39 GAUCHE**). Cependant, cette modification d'expression de DR5 ne modifie pas significativement la sensibilité à rhTRAIL de la lignée STA-ET-1 par rapport à un shRNA contrôle noté shCT (**FIGURE 39 DROITE**). Cette expérience montre que pour la lignée STA-ET-1 aussi, la sensibilité à rhTRAIL semble liée à DR4 plus qu'à DR5, même si cette lignée présente des caractéristiques de sensibilité très élevée pour une expression de DR4 faible par rapport aux autres lignées de sarcome d'Ewing étudiées.

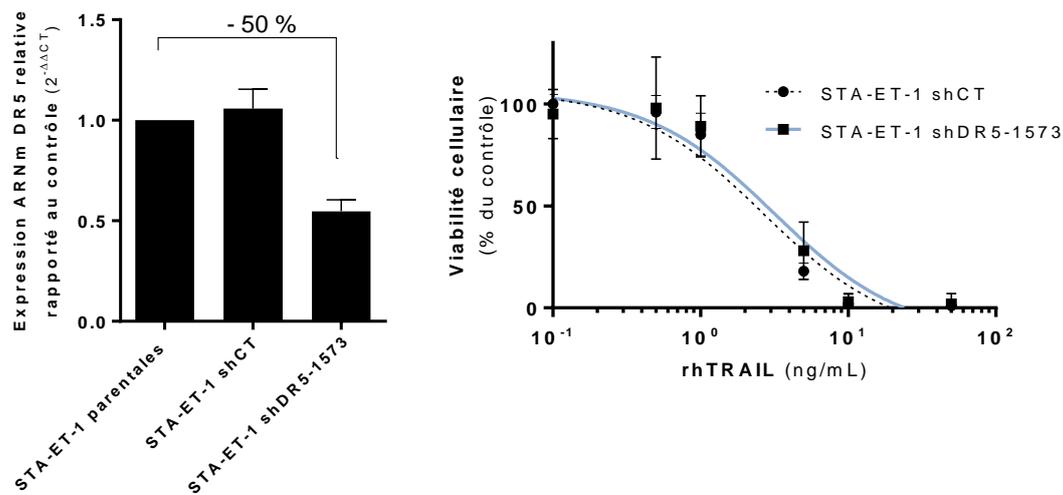


Figure 39 Effet de l'inhibition de DR5 dans la lignée STA-ET-1 sur la sensibilité à rhTRAIL. Des cellules de la lignée STA-ET-1 ont été transduites avec un shRNA contrôle (shCT) ou un shRNA ciblant DR5 (shDR5-1573). L'expression transcriptionnelle de DR5 est évaluée dans ces cellules par RT-qPCR (gènes de référence : GAPDH et β 2-microglobuline – gauche). La viabilité des cellules STA-ET-1 transduites avec le shCT ou le shDR5-1573 en présence de rhTRAIL est déterminée par test de prolifération WST-1. Les cellules sont cultivées 72h en présence de concentrations croissantes de rhTRAIL (droite).

3. Rôle des inhibiteurs de l'apoptose

Si dans les lignées de sarcome d'Ewing, l'expression de DR4 semble être liée à la sensibilité à rhTRAIL, aucune corrélation entre expression des récepteurs de mort et sensibilité n'a pu être déterminée dans les lignées d'ostéosarcome. La voie apoptotique de TRAIL met en jeu de nombreux inhibiteurs, spécifiques ou non à cette voie, agissant à plusieurs niveaux qui pourraient expliquer les différences de résistance à rhTRAIL des lignées d'ostéosarcome.

a. Expression des récepteurs leurres de TRAIL

Les récepteurs leurres (Dcr1, Dcr2 membranaires et OstéoProtéGérine (OPG) soluble) sont les premiers inhibiteurs spécifiques à la voie apoptotique de TRAIL, ils agissent en entrant en compétition

avec les récepteurs de mort pour la fixation de TRAIL et/ou en formant des hétérocomplexes inactifs avec les récepteurs de mort activés. L'expression des récepteurs leurres est déterminée pour les lignées modèles par RT-qPCR et cytométrie en flux uniquement pour les récepteurs membranaires DcR1 et DcR2 (**FIGURE 40 A ET B**).

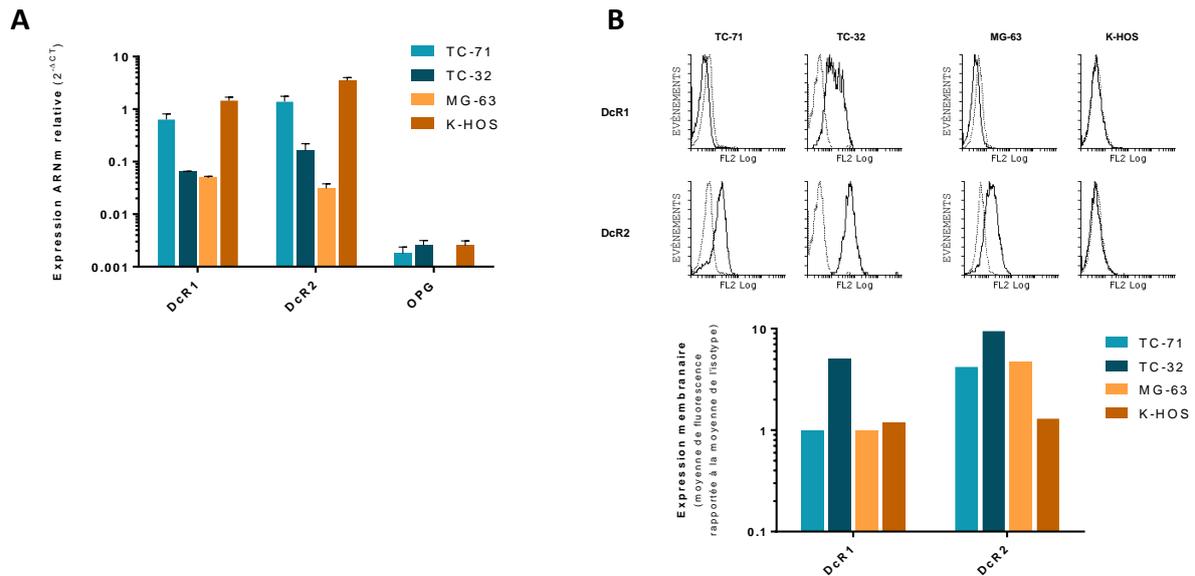


Figure 40 Expression des récepteurs leurres de TRAIL par les lignées modèles. Expression transcriptionnelle étudiée par RT-qPCR (gènes de référence : GAPDH et $\beta 2M$) (A). Expression membranaire de DcR1 et DcR2 évaluée par cytométrie en flux (B haut) et exprimée en intensité de fluorescence par rapport à l'isotype contrôle (B bas).

Contrairement à l'expression transcriptionnelle des récepteurs de morts qui reflète leur expression membranaire, l'expression transcriptionnelle des récepteurs leurres membranaires ne se superpose pas à l'expression membranaire des protéines correspondantes. En effet, seule la lignée TC-32 exprime à la membrane DcR1 (**FIGURE 40 B**) alors que cette lignée exprime moins d'ARNm *DcR1* que les lignées TC-71 ou K-HOS. De la même façon, parmi les quatre lignées modèles, les lignées TC-32 et MG-63 expriment la plus faible quantité de transcrits *DcR2*, et pourtant ces deux lignées sont celles qui présentent le plus DcR2 à la membrane. Pour ces deux récepteurs leurres, il y a donc une modification de l'expression post-transcriptionnelle ou post-translationnelle par la cellule tumorale.

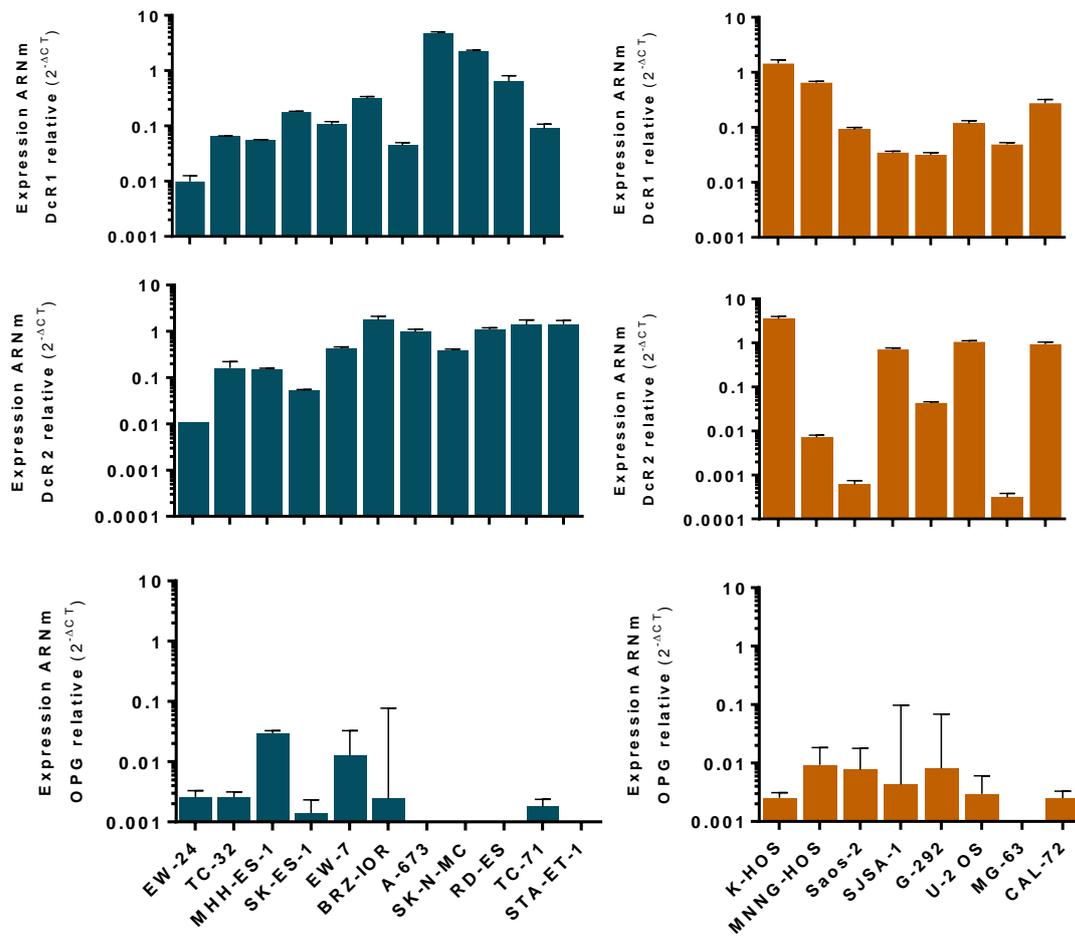


Figure 41 Expression transcriptionnelle des récepteurs leurres de TRAIL dans les lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome évaluée par RT-qPCR (gènes de référence : GAPDH et *β2 microglobuline*).

La **FIGURE 41** rapporte les expressions transcriptionnelles des récepteurs leurres de TRAIL dans les lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome. L'expression de l'ARNm de DcR1 et DcR2 déterminée par qPCR doit être interprétée avec précautions compte tenu des différences entre expression transcriptionnelle et expression à la surface observées dans les quatre lignées modèles. Nous pouvons seulement conclure qu'il n'est pas possible d'établir de lien entre l'expression transcriptionnelle de récepteurs leurres membranaires et la résistance de la lignée. En outre, les taux d'ARNm d'OPG mesurés par RT-qPCR sont très faibles dans les lignées de tumeurs osseuses pédiatriques.

b. Expression des inhibiteurs de l'apoptose

Il existe plusieurs inhibiteurs de l'apoptose, spécifiques ou non de la voie de signalisation induite par TRAIL. Ainsi, la protéine c-FLIP entre en compétition avec la caspase-8 dans le complexe DISC, les protéines c-IAP1 et c-IAP2 quant à elles inhibent l'activation des caspases initiatrices de l'apoptose.

L'expression transcriptionnelle de ces inhibiteurs ne diffère que très peu entre les lignées et ne permet pas d'expliquer le profil de sensibilité ou de résistance de la lignée à TRAIL (**FIGURE 42**).

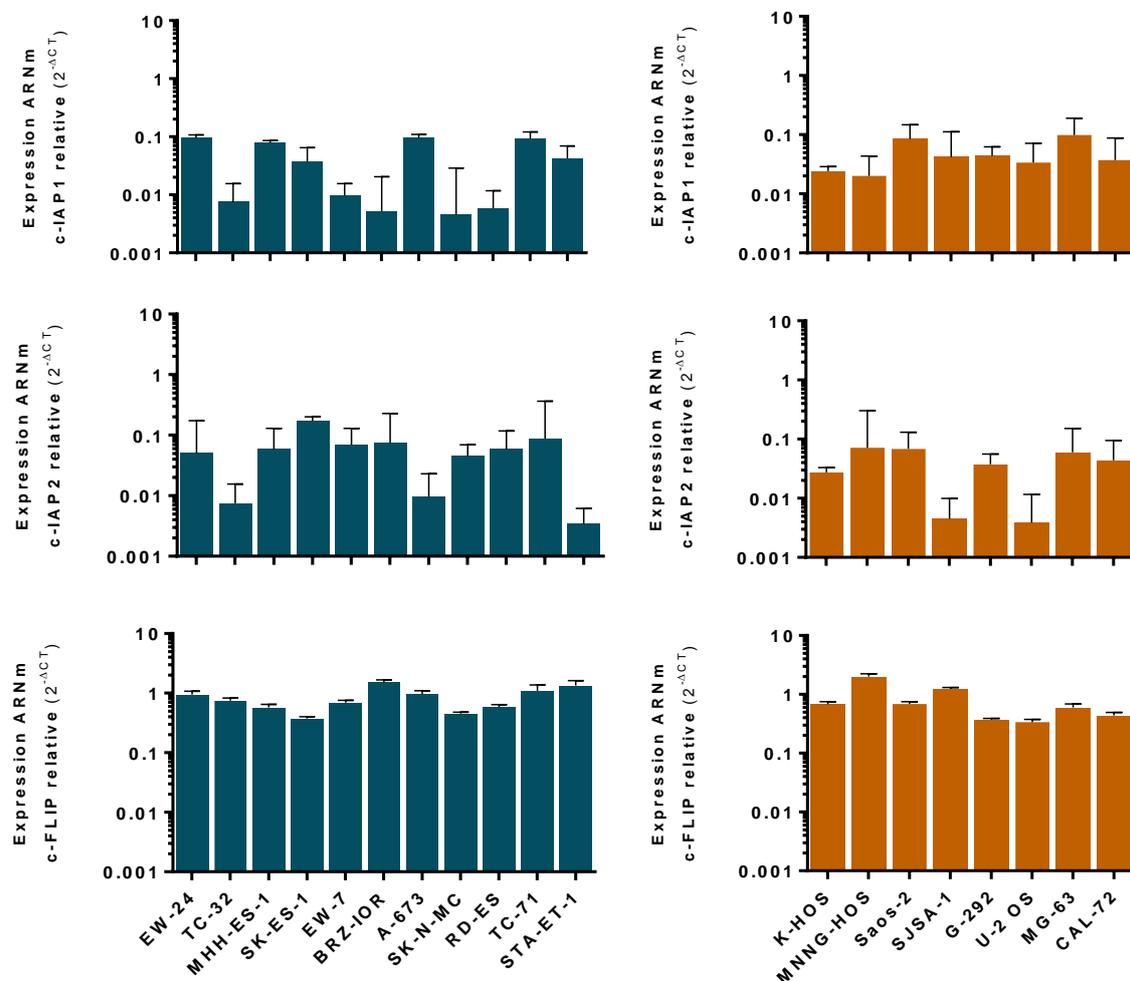


Figure 42 Expression transcriptionnelle de c-IAP1, c-IAP2 et c-FLIP dans les lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome évaluée par RT-qPCR (gènes de référence : GAPDH et b2M).

Néanmoins, ces inhibiteurs semblent agir en balance par rapport à l'effecteur correspondant dans la voie de signalisation apoptotique de TRAIL. Ainsi, pour explorer leur rôle potentiel dans la sensibilité à TRAIL, une stratégie permettant d'inhiber leur expression dans les lignées initialement résistantes à rhTRAIL a été mise en place.

c. L'inhibition de c-FLIP par shRNA ne sensibilise pas les lignées initialement résistantes à rhTRAIL

Il existe une forte corrélation entre la surexpression de c-FLIP et la résistance à l'apoptose induite par TRAIL, et plusieurs études *in vitro* ont démontré que l'inhibition directe ou indirecte de c-FLIP peut surmonter cette résistance. Ainsi, le ciblage de c-FLIP peut être une stratégie intéressante pour une thérapie anti-cancéreuse de combinaison avec TRAIL (Chawla-Sarkar et al., 2004).

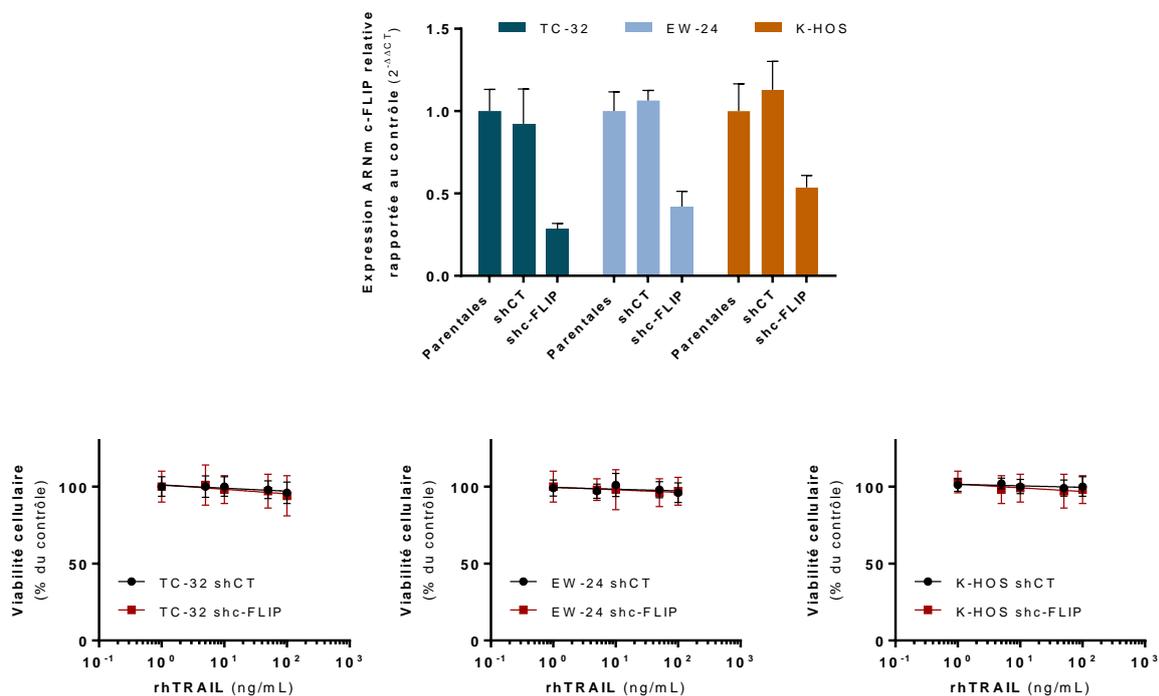


Figure 43 L'inhibition de c-FLIP par shRNA ne sensibilise pas les lignées initialement résistantes à rhTRAIL. Les lignées TC-32, EW-24 et K-HOS sont transduites avec les shc-FLIP ou shCT puis triées, les ARNm sont extraits et une RT-qPCR est réalisée pour quantifier l'expression de c-FLIP par rapport à la lignée parentale (haut). La viabilité des lignées modifiées shCT et shc-FLIP en présence de concentrations croissantes de rhTRAIL est évaluée par test de prolifération WST-1 après 72h (bas).

Les lignées TC-32, EW-24 et K-HOS initialement résistantes à rhTRAIL ont été transduites avec un shRNA ciblant c-FLIP (shc-FLIP) ou un shRNA contrôle (shCT). La présence de shc-FLIP dans ces lignées permet d'inhiber son expression de 60 à 70 % par rapport à l'expression initiale (**FIGURE 43 HAUT**). Néanmoins, cette inhibition de c-FLIP ne modifie pas la sensibilité des lignées à rhTRAIL (**FIGURE 43 BAS**). C-FLIP ne semble donc pas représenter une cible intéressante pour la (re)sensibilisation à TRAIL des lignées de tumeurs osseuses pédiatriques.

4. Sensibilité à Fas-L

Les cytokines pro-apoptotiques de la superfamille du TNF, TRAIL et Fas-Ligand, partagent la même voie de signalisation conduisant à l'apoptose de la cellule à partir de la formation du complexe membranaire DISC regroupant les récepteurs de mort (DR4 et DR5 pour TRAIL, Fas pour Fas-L) la protéine adaptatrice FADD et la caspase-8 ou -10. Si nous observons une différence de réponse d'une lignée à ces deux cytokines, nous pouvons émettre comme hypothèse que la cause de cette différence est un événement survenant en amont de la formation du complexe DISC, sans doute au niveau des récepteurs.

La sensibilité à rhFas-L est déterminée de la même façon que la sensibilité à rhTRAIL par un test de prolifération WST-1. Les cellules sont cultivées 72h en présence de concentrations croissantes de rhFas-L, les IC50 sont calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism v6.01 et présentées en **FIGURE 44**.

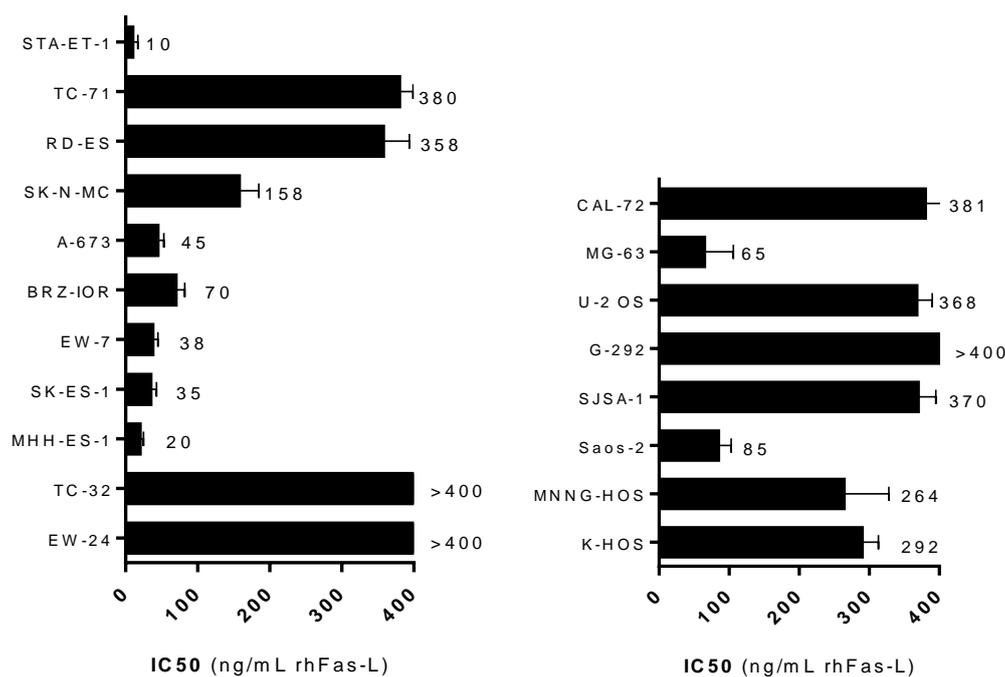


Figure 44 IC50 des lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome en réponse à rhFas-L, exprimées en ng/mL de rhFas-L. Les IC50 sont déterminées par le logiciel GraphPad Prism v6.01 d'après les tests de prolifération WST-1 de 72h en présence de concentrations croissantes de rhFas-L.

Comme pour l'étude de la sensibilité à rhTRAIL, l'étude de la sensibilité à rhFas-L révèle une diversité de réponse entre les lignées. De la même façon, il est possible de constituer 3 groupes de lignées triées en fonction de leur sensibilité à rhFas-L. Pour les onze lignées d'Ewing, sept lignées sont très sensibles à rhFas-L avec une IC50 inférieure à 200 ng/mL (STA-ET-1, SK-N-MC, A-673, BRZ-IOR, EW-7, SK-ES-1 et MHH-ES-1), deux lignées sont peu sensibles (IC50 inférieure à 400ng/mL – TC-71 et RD-ES) et deux lignées sont résistantes (EW-24 et TC-32). Pour les lignées d'ostéosarcome, deux sont très sensibles (Saos-2 et MG-63), cinq sont peu sensibles (CAL-72, U-2 OS, SJSA-1, MNNG-HOS et K-HOS) et une lignée est résistante (G-292). Les lignées d'ostéosarcome sont donc globalement moins sensibles à rhFas-L que celles de sarcome d'Ewing, avec des IC50 en moyenne plus élevées et une proportion de lignées résistantes et peu sensibles plus importantes dans l'ensemble des lignées étudiées.

L'étude comparative des sensibilités à rhTRAIL et à rhFAS (**FIGURE 45**) permet de déterminer plusieurs cas de figure : des lignées peu sensibles ou résistantes aux cytokines (TC-32, EW-24, la plupart des lignées d'ostéosarcome) qui présentent sans doute des phénomènes de résistance en aval de la

formation du complexe DISC ; des lignées sensibles aux deux cytokines (STA-ET-1, A-673, SK-N-MC) ne présentant pas ou peu de phénomènes de résistance ; des lignées sensibles à rhTRAIL et résistantes à rhFas-L (TC-71, RD-ES) et inversement (Saos-2, MG-63, MHH-ES-1) dont les phénomènes de résistance semblent se mettre en place au niveau des récepteurs spécifiques (expression de récepteurs leurres pour rhTRAIL, absence de récepteurs de mort ou récepteurs de mort inactifs).

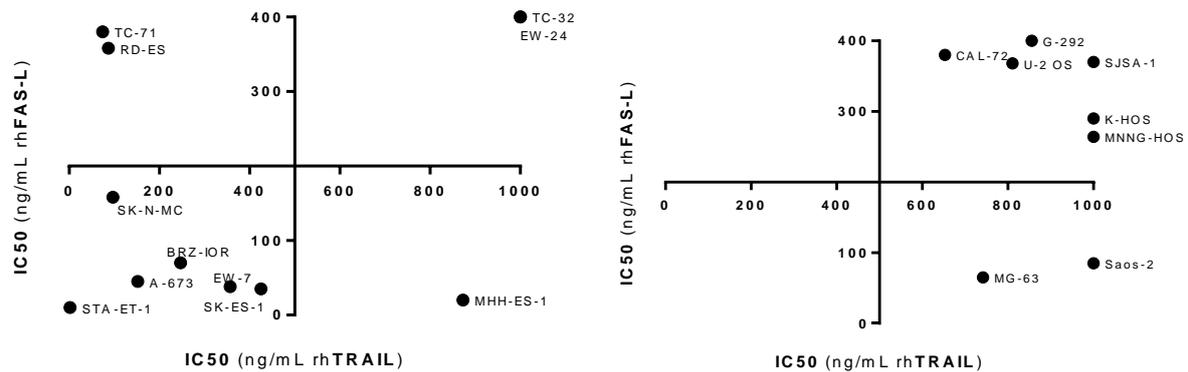


Figure 45 Sensibilité croisée des lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome à rhTRAIL et rhFas-L. La sensibilité aux cytokines est représentée par les IC₅₀ déterminées par test de prolifération WST-1.

5. Sensibilité aux variants de TRAIL sélectifs pour DR4 ou DR5

L'équipe irlandaise d'Eva Szegezdi a synthétisé plusieurs variants de TRAIL ayant une affinité très supérieure pour l'un ou l'autre des récepteurs de mort. Le variant sélectif pour DR5 utilisé dans cette étude est le D269H/E195R (van der Sloot et al., 2006) et celui sélectif pour DR4 utilisé est le 4C9 (Reis et al., 2010).

L'effet de ces variants est déterminé dans les lignées cellulaires TC-71 et K-HOS par tests de prolifération cellulaire en présence de ces variants ou de TRAIL « wild type » (WT) (**FIGURE 46**).

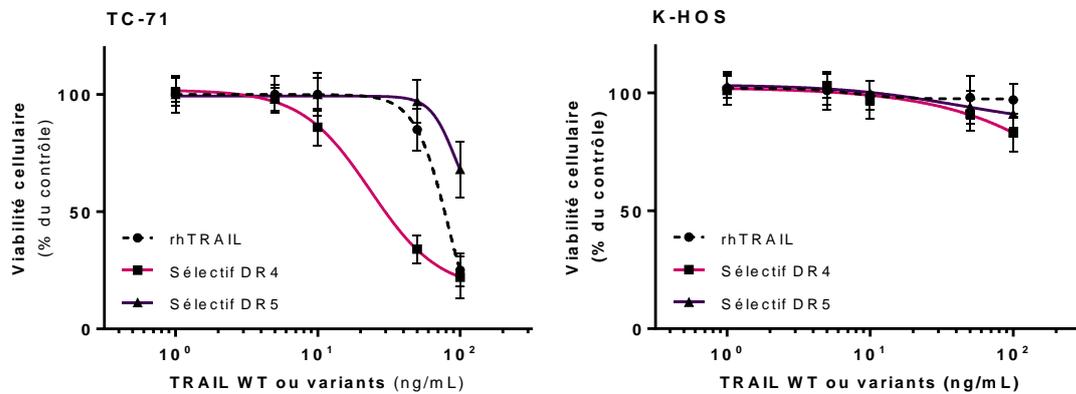


Figure 46 Effets des variants de TRAIL sélectifs pour DR4 ou DR5 par rapport à TRAIL WT dans les lignées TC-71 et K-HOS. Cet effet est déterminé par tests de prolifération cellulaires en présence de concentrations croissantes de ces variants pendant 72h.

Dans la lignée sensible TC-71, le variant de TRAIL sélectif pour DR4 induit la réduction de la prolifération cellulaire de façon plus importante que le TRAIL WT. A l'inverse, le variant de TRAIL sélectif pour DR5 la réduit plus faiblement.

Dans la lignée résistante K-HOS, les deux variants sélectifs présentent un effet de léger ralentissement de la prolifération cellulaire pour des concentrations élevées qui n'est pas observé pour TRAIL WT.

II. Mise au point des modèles d'étude *in vivo*

Historiquement au laboratoire, des modèles de transfert non-viral de gène humain de TRAIL ont été utilisés comme mode d'expression de TRAIL dans les manipulations *in vivo* (Picarda et al., 2010). Ces systèmes de transfert de gènes portés par des plasmides dans les cellules musculaires de la souris par l'intermédiaire de vecteurs synthétiques ont l'avantage d'un coût réduit par rapport à l'utilisation de protéines recombinantes mais l'expression de TRAIL est difficilement contrôlable et variable d'un animal à l'autre.

Le système de transfert de gène humain de TRAIL par système d'électro-transfert a également été envisagé pour exprimer TRAIL dans le muscle de l'animal sur la patte controlatérale par rapport à celle portant la tumeur. Lors d'une étude préliminaire sur quatre animaux, une souris contrôle électro-transférée avec un plasmide pVAX vide et trois souris électro-transférées avec le plasmide pVAX-TRAIL, un test ELISA a été réalisé afin d'évaluer la production de TRAIL dans le muscle électrotransféré (**FIGURE 47, GAUCHE**) et la quantité de TRAIL retrouvée dans le serum de l'animal (**FIGURE 47, DROITE**) 7 jours après le transfert de gène.

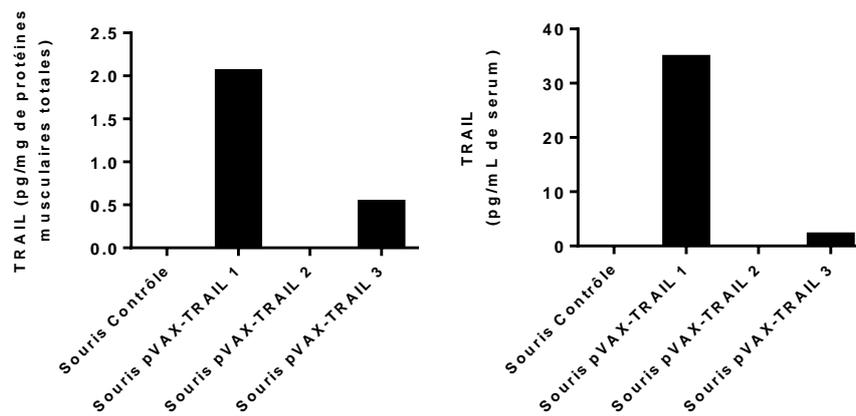


Figure 47 Expression protéique de TRAIL dans le muscle électro-transféré et dans le serum des animaux sept jours après le transfert de gène, évaluée par ELISA après extraction protéique du muscle, exprimée en pg de TRAIL par mg de protéines totales (gauche) et dans le serum de l'animal, exprimée en pg de TRAIL par mL de sérum (droite).

Comme dans les modèles de transfert de gène par vecteurs synthétiques, la méthode de l'électrotransfert n'est pas efficace de la même façon pour tous les animaux et l'expression de TRAIL est variable d'un animal à l'autre. D'autres moyens plus quantifiables et plus reproductibles d'induire l'activation de la voie de TRAIL ont donc été recherchés pour des applications dans nos modèles *in vivo*.

Les résultats des premiers essais précliniques avec de la protéine recombinante TRAIL ayant montré d'importants effets secondaires, notamment l'hépatotoxicité, attribuée plus tard au « tag » polyhistidine utilisé pour la purification, les industries pharmaceutiques se sont intéressées au développement d'anticorps agonistes des récepteurs de morts DR4 et DR5 capables d'activer la voie de signalisation de TRAIL. Ces anticorps présentent de multiples avantages comme le fait de ne pas se fixer aux récepteurs leurres et ainsi de se soustraire à leur effet inhibiteur ou une production plus économique.

Parmi les anticorps ainsi développés, le Conatumumab d'AMGEN, ou AMG655, est utilisé en essais cliniques et semble un candidat idéal pour une utilisation dans nos modèles *in vivo* de tumeurs osseuses pédiatriques.

1. Sensibilité des lignées de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome à l'AMG655

Afin de déterminer le potentiel de l'AMG655 comme traitement dans les tumeurs osseuses pédiatriques, des études de sensibilité ont été menées *in vitro* par des tests de prolifération WST-1 de 72h en présence de concentrations croissantes d'AMG655. Les IC50 sont ainsi déterminées pour chaque lignée par l'utilisation du logiciel GraphPad Prism v6.01. Les résultats de ces tests de sensibilité à l'AMG655 sont illustrés pour les lignées modèles TC-71, TC-32, MG-63 et K-HOS dans la **FIGURE 48**.

D'après nos premières observations, la sensibilité des lignées de sarcome d'Ewing à rhTRAIL est liée à l'expression de DR4, pourtant la lignée TC-71 est également sensible à l'anticorps agoniste de DR5 AMG655 avec une IC50 de 115 ng/mL. La lignée TC-32, résistante à rhTRAIL, est de la même façon résistante à l'AMG655. Pour les lignées d'ostéosarcome aussi, la réponse à l'AMG655 est similaire à celle de rhTRAIL, la lignée MG-63 peu sensible à rhTRAIL est aussi peu sensible à l'AMG655 et la lignée K-HOS résistante à rhTRAIL l'est également à l'AMG655.

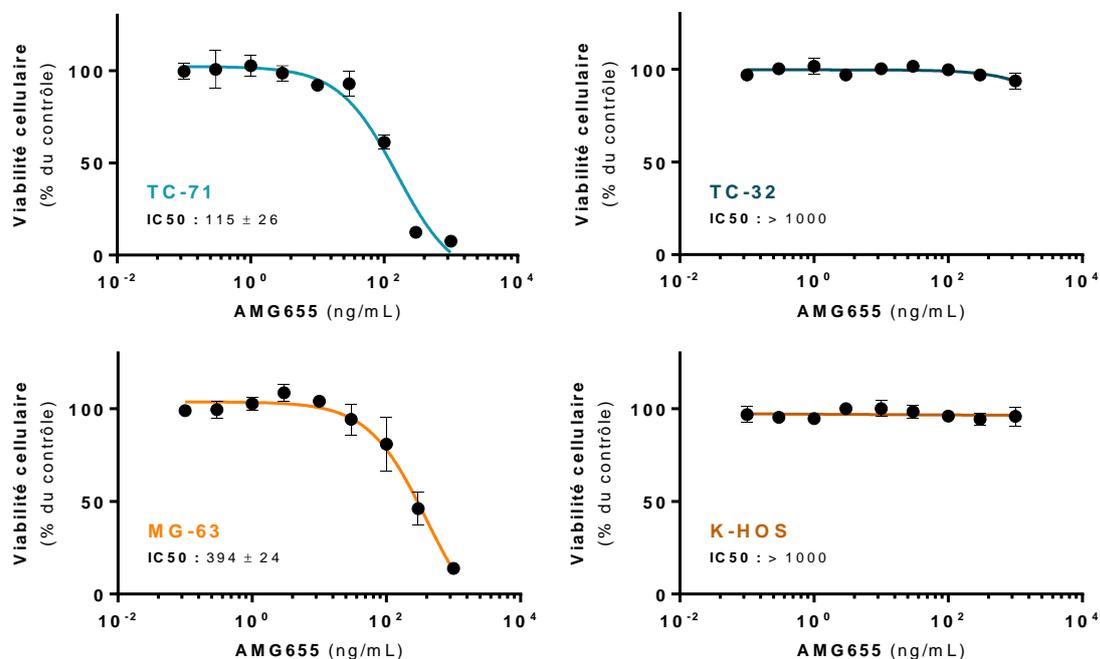


Figure 48 Sensibilité de lignées modèles à l'agoniste de DR5 AMG655 déterminée par test de prolifération WST-1. Les IC50 sont calculées avec le logiciel GraphPad Prism v6.01

2. Mise au point d'un modèle *in vivo* sensible à l'AMG655

L'effet de l'AMG655 sur la lignée TC-71 étant confirmé *in vitro*, cette lignée est choisie pour la mise au point d'un modèle de tumeur orthotopique para-tibiale induit par ces cellules pour analyser l'effet de l'AMG655 *in vivo*.

Quatre groupes de six souris sont injectés avec un million de cellules TC-71 comme décrit dans la section "*Matériels et Méthodes*" au jour 0 (J0). Les tumeurs deviennent palpables à J7. Le traitement à l'AMG655 débute à J1. Chaque groupe est injecté par voie intraveineuse deux fois par semaine avec 0; 0,2; 2 ou 4mg/kg d'AMG655. Les groupes injectés avec de l'AMG655 présentent tous un ralentissement significatif de la croissance tumorale dès J15 (**FIGURE 49 HAUT**). A J22, le groupe injecté avec 0,2 mg/kg d'AMG655 présente un volume tumoral moyen inférieur de 40% au groupe contrôle, les groupes injectés avec 2 ou 4 mg/kg présentent quant à eux un ralentissement de 60% du développement tumoral par rapport au groupe contrôle.

Cependant, toutes les souris des groupes injectés développent des tumeurs, l'injection d'AMG655 n'est donc pas suffisante pour abolir complètement l'occurrence d'une tumeur. Comme conséquence de ces observations, le taux de survie (déterminé lorsque le volume tumoral atteint 1200 mm³) est significativement plus important dans les groupes injectés (**FIGURE 49 BAS**) avec le meilleur pronostic pour le groupe traité à la dose de 2mg/kg d'AMG655. Pour les manipulations suivantes, la dose de 2mg/kg d'AMG655 sera utilisée.

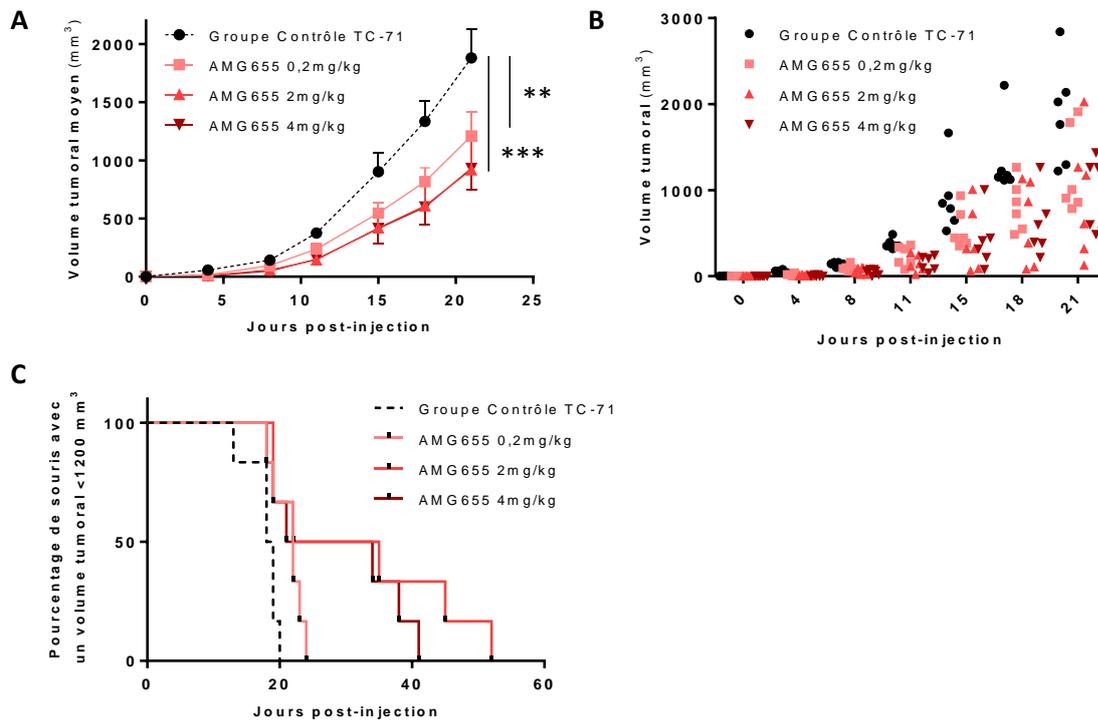


Figure 49 L'AMG655 ralentit le développement tumoral primitif du modèle de sarcome d'Ewing induit par les cellules TC-71. Quatre groupes de six souris sont injectés avec un million de cellules TC-71 comme décrit dans la section "Matériels et Méthodes". Chaque groupe est injecté deux fois par semaine avec 0; 0,2; 2 ou 4mg/kg d'AMG655. Volume tumoral moyen par groupe (A). Volume tumoral de chaque souris (B). Pourcentage de souris avec un volume tumoral inférieur à 1200mm³ pour les trois groupes (C). (** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$)

3. Mise au point d'un modèle *in vivo* résistant à l'AMG655

La lignée K-HOS s'étant révélée résistante à l'AMG655 *in vitro*, elle est utilisée pour l'induction d'un modèle de tumeur orthotopique para-tibiale résistant.

Deux groupes de sept souris sont injectés avec un million de cellules K-HOS comme décrit dans la section "Matériels et Méthodes" au jour 0 (J0). Les tumeurs deviennent palpables à J8. Le traitement à l'AMG655 débute à J1. Chaque groupe est injecté deux fois par semaine avec du NaCl 0,9% (groupe contrôle) ou avec 2mg/kg d'AMG655.

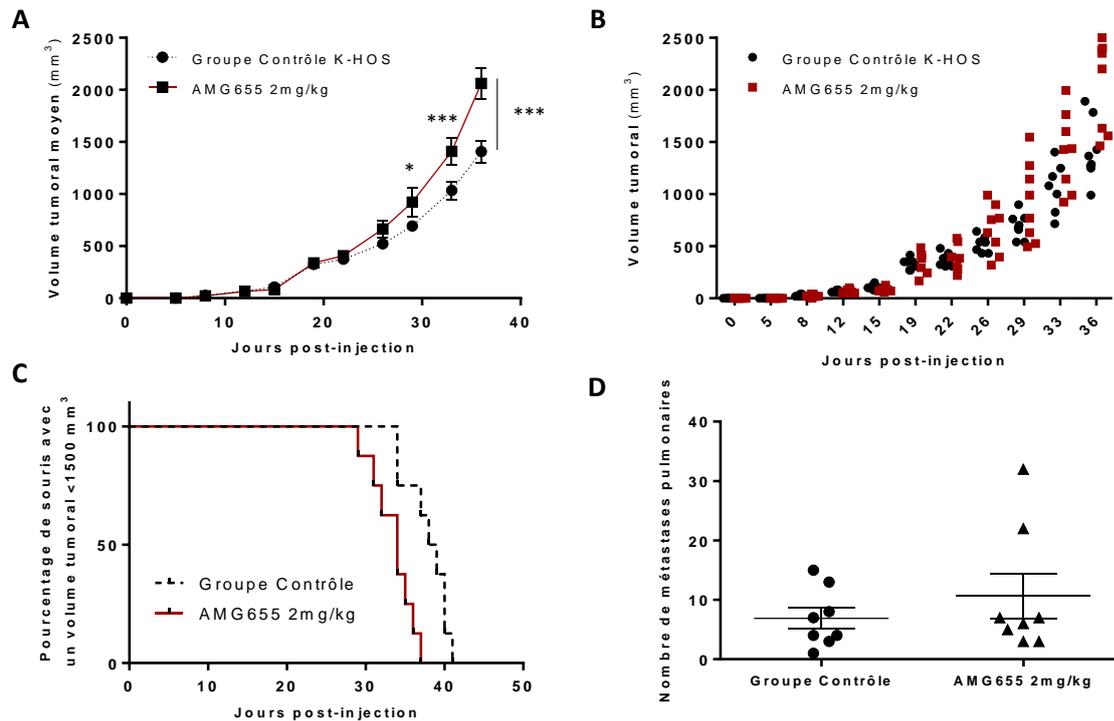


Figure 50 L'AMG655 accélère le développement tumoral primitif du modèle d'ostéosarcome induit par l'injection de cellules K-HOS. Deux groupes de sept souris sont injectés avec un million de cellules K-HOS comme décrit dans la section "Matériels et Méthodes". Chaque groupe est injecté deux fois par semaine avec 0 ou 2mg/kg d'AMG655. Volume tumoral moyen par groupe (A). Volume tumoral de chaque souris (B). Pourcentage de souris avec un volume tumoral inférieur à 1500mm³ pour les trois groupes (C). Nombre de métastases pulmonaires retrouvées à l'euthanasie pour un volume tumoral équivalent (D). (* $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

De façon inattendue, le groupe injecté avec l'AMG655 ne présente pas la même croissance tumorale que le groupe contrôle, ce qui signifierait une absence d'effet de l'AMG655 dans un modèle résistant, mais montre un développement tumoral accéléré avec un volume tumoral moyen significativement plus élevé dès J30 et jusqu'à 30% plus important que celui du groupe contrôle à J37 (**FIGURE 50 HAUT**). Ce développement tumoral accéléré se reflète également dans le taux de survie du groupe injecté avec l'AMG655 qui est significativement diminué (**FIGURE 50 BAS, GAUCHE**). Le nombre moyen de métastases pulmonaires retrouvées à l'euthanasie pour des souris présentant un volume tumoral équivalent n'est pas significativement augmenté dans le groupe traité à l'AMG655 dans les conditions de l'expérimentation, mais présente simplement une tendance à l'augmentation (**FIGURE 50 BAS, DROITE**).

Pour expliquer ce constat d'effet pro-tumoral de l'agoniste de DR5 dans le modèle *in vivo* induit par les cellules K-HOS, nous faisons l'hypothèse d'une activation de la voie non-apoptotique de TRAIL à la suite de la fixation de l'AMG655 sur DR5.

III. Activation de la voie non-apoptotique de TRAIL dans un modèle résistant d'ostéosarcome

Les résultats d'études précliniques récentes indiquent une activité de TRAIL en faveur de la survie, de la prolifération et même du développement métastatique, ce qui préconise une grande prudence lors d'un traitement avec les agonistes des récepteurs TRAIL, en particulier utilisés en thérapie unique (Azijli et al., 2013).

1. Des voies de signalisation non-apoptotiques induites par la fixation de TRAIL sur ses récepteurs de mort

De nombreuses voies de signalisation activées à la suite de la fixation de TRAIL ou d'agonistes sur les récepteurs de mort ont été décrites, à côté de la voie apoptotique bien connue. Elles sont résumées en **FIGURE 51**. Elles semblent capables de stimuler la survie, la prolifération et la migration de la cellule tumorale.

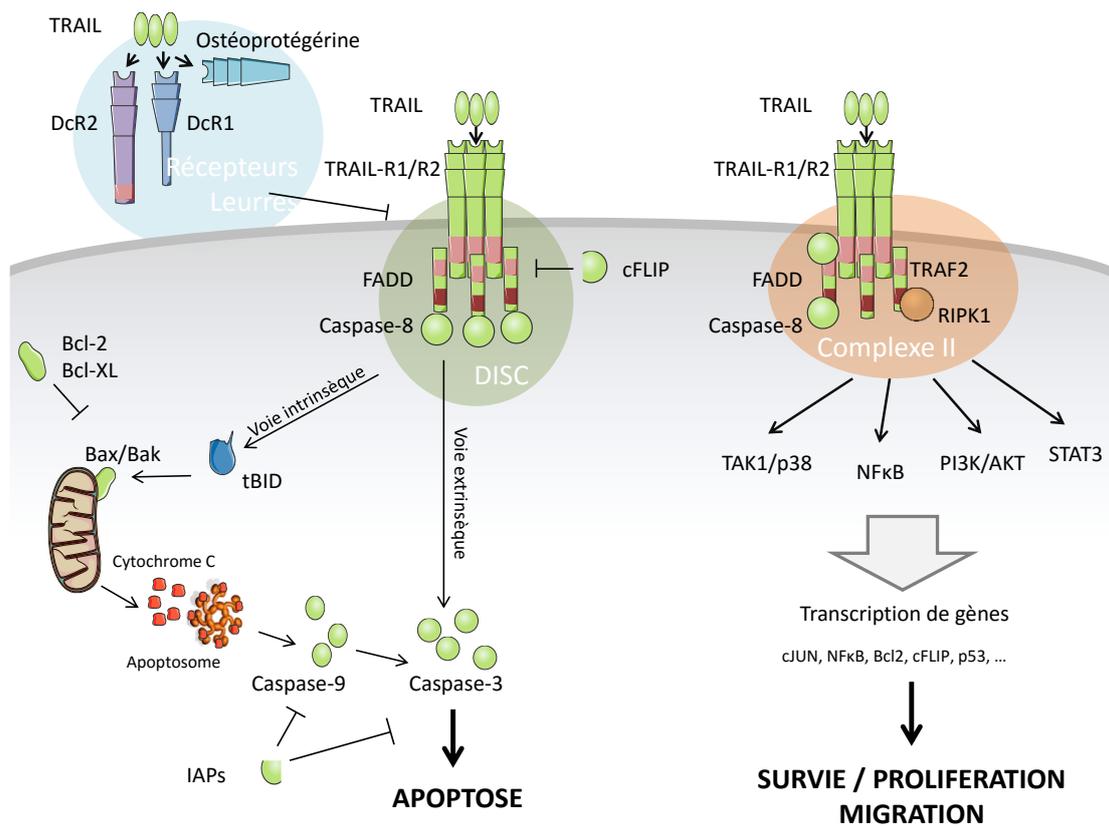


Figure 51 Comparaison des voies apoptotique et non-apoptotique de TRAIL. A gauche, les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose induites par la fixation de TRAIL sur ses récepteurs de mort formant le complexe DISC. A droite, la voie non-canonique de TRAIL, non-apoptotique et capable de stimuler la survie, la prolifération et la migration de la cellule tumorale à la suite de la fixation de TRAIL sur ses récepteurs de mort. D'après (Azijli et al., 2013)

a. Formation d'un complexe de signalisation secondaire

Les événements moléculaires précoces conduisant à la signalisation non-apoptotique sont complexes et toujours mal compris. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré la formation d'un complexe secondaire de signalisation à la suite de l'assemblage précoce du complexe DISC. Ce complexe secondaire semble être composé de RIPK1, TRAF2, NEMO (NF-κB Essential Modulator), FADD et de la caspase-8 active (Varfolomeev et al., 2005).

Dans ce contexte, la localisation des récepteurs de TRAIL dans la membrane cellulaire semble également avoir un rôle sur la formation du complexe. En particulier, la localisation des récepteurs de TRAIL dans des radeaux lipidiques permet l'activation de l'apoptose (Song et al., 2007). Les radeaux lipidiques sont des domaines de la membrane plasmique, riches en cholestérol et glycosphingolipides.

Ils fonctionnent comme des plates-formes qui favorisent la co-localisation de composants nécessaires à la signalisation. L'assemblage du complexe secondaire à l'extérieur des radeaux est quant à lui associé à la signalisation non-apoptotique, médiée par RIPK1 et c-FLIP. Il reste à déterminer si la localisation des récepteurs TRAIL dans les radeaux lipidiques est une cause ou une conséquence de la formation du complexe DISC. Des niveaux supplémentaires de régulation interviennent par l'expression d'inhibiteurs du complexe DISC, par exemple c-FLIP, et la phosphorylation et / ou l'ubiquitination de protéines interagissant avec les récepteurs de TRAIL, y compris la caspase-8 et RIPK1 (Pennarun et al., 2010; Vucic et al., 2011).

b. Voies de signalisation de survie et de prolifération

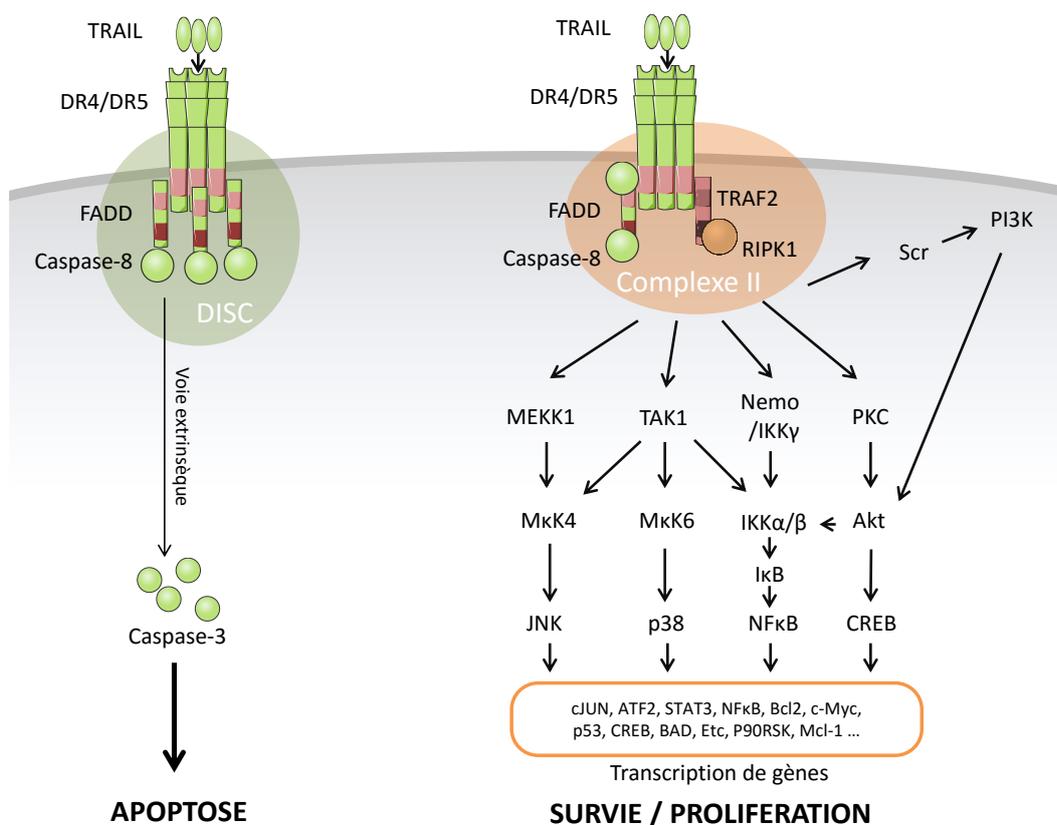


Figure 52 Voies de signalisation favorisant la survie et la prolifération cellulaire à la suite de l'activation des récepteurs de mort de TRAIL D'après (Azijli et al., 2013)

- **Voie de signalisation NF- κ B**

L'activation des voies pro-inflammatoires et de survie cellulaire contrôlées par le facteur de transcription NF- κ B a été l'un des premiers signaux non-apoptotiques induits par TRAIL à être rapporté dans la littérature (Chaudhary et al., 1997; Schneider et al., 1997). Il a en effet été montré que les deux récepteurs de mort de TRAIL peuvent activer NF- κ B de façon dépendante de TRADD et de RIPK1. NEMO a été décrit comme composant du complexe secondaire, capable de recruter le complexe de signalisation IKK α / β provoquant la phosphorylation et la dégradation par le protéasome de l'inhibiteur de κ B (I κ B), entraînant la libération et l'accumulation de NF- κ B (Varfolomeev et al., 2005). Ensuite, la translocation de NF- κ B vers le noyau permet l'activation de la transcription des gènes anti-apoptotiques comme c-FLIP, Bcl-xL, Mcl-1 ou cIAP1 et 2 (**FIGURE 52**) (Henson et al., 2003).

- **Voies de signalisation des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK)**

Les MAPK sont des enzymes qui contrôlent des processus physiologiques importants, comme l'expression génique, la motilité, le métabolisme, la mitose ou de la mort cellulaire programmée. Il a été montré dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses que TRAIL pouvait activer les kinases JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Mühlenbeck et al., 1998), p38 (Lee et al., 2002) et ERK1/2 (extracellular regulated kinases 1/2) (Milani et al., 2003) ayant des effets opposés, mais qui contribuent surtout à la prolifération et à la survie cellulaire. Cette activation des MAPK est sans doute consécutive au recrutement au sein du complexe secondaire de signalisation des protéines MEKK1 (MAPK/ERK kinase kinase 1) et TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) qui vont induire une cascade de phosphorylations (Choo et al., 2006; Song and Lee, 2008).

- **Voie Phosphatidylinositide 3-Kinase (PI3K)/Akt**

Akt est l'une des kinases les plus importantes dans la régulation de la survie cellulaire. Une activité accrue de la voie PI3K / Akt est retrouvée dans de nombreuses tumeurs malignes et est associée à la stimulation de la croissance tumorale (Fresno Vara et al., 2004). Il a été rapporté que l'exposition à

TRAIL de divers types de cellules tumorales a induit la phosphorylation d'Akt et de son substrat, la sérine / thréonine kinase mTOR par l'intermédiaire de PI3K (Xu et al., 2010).

Akt peut également être activée par la Protéine Kinase C (PKC) (Gillespie et al., 2005).

c. Voies de signalisation induisant la migration et l'invasion

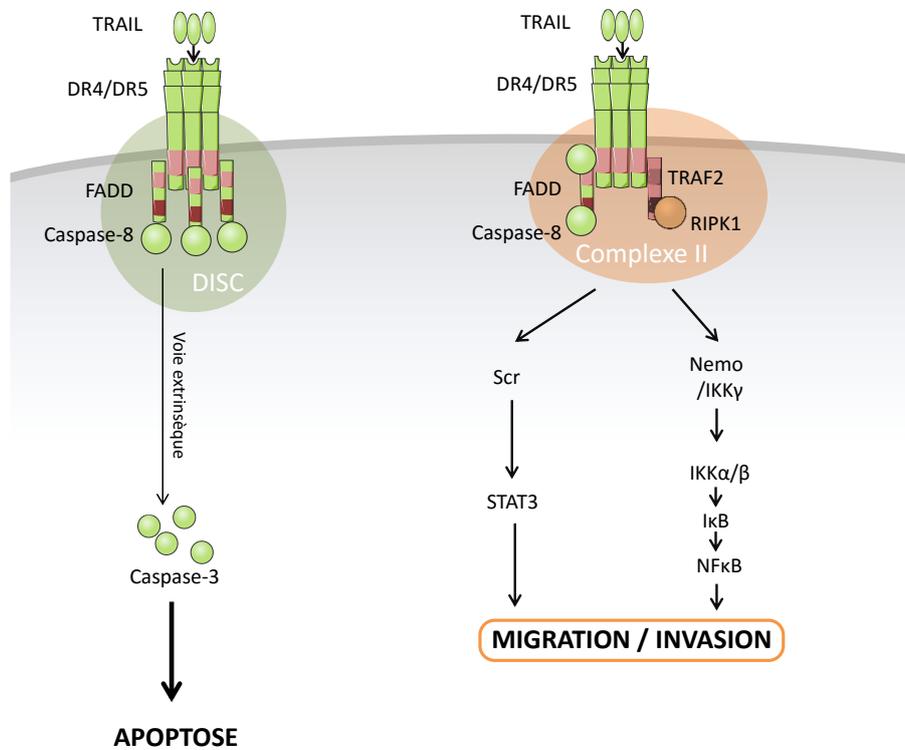


Figure 53 Voies de signalisation favorisant la migration cellulaire et l'invasion à la suite de l'activation des récepteurs de mort de TRAIL. D'après (Aziji et al., 2013)

Lorsque l'on considère la fonction physiologique de TRAIL de surveillance immunitaire contre le développement de la tumeur, que ce soit de la tumeur primitive et des métastases, les effets favorisant l'invasion plus récemment trouvés sont surprenants (**FIGURE 53**) (Grosse-Wilde et al., 2008). Ainsi, l'étude d'une forme de cholangiocarcinome résistant à l'apoptose a montré que l'activation de NF-κB

après activation des récepteurs de mort de TRAIL peut promouvoir l'invasion et la formation de métastases (Ishimura et al., 2006). De même, il a été démontré dans un modèle préclinique d'adénocarcinome pancréatique lui aussi résistant que le traitement avec TRAIL accélère la formation de métastases (Trauzold et al., 2006). Plus récemment, l'axe RIPk1 / Src / STAT3 a été identifié pour expliquer la migration et l'invasion induite par TRAIL. Il semble que les cellules tumorales aient altéré l'activité anti-métastatique de TRAIL en un signal inverse de stimulation de l'invasion, utilisant ainsi cette voie de mort à leur avantage.

2. Rôle des voies non-apoptotiques de TRAIL dans la survie et la prolifération de la lignée K-HOS

a. Activation de voies non-apoptotiques de TRAIL par l'AMG655 dans la lignée K-HOS

Afin de vérifier l'hypothèse de l'activation de voies induisant la survie et la prolifération des cellules de la lignée K-HOS à la suite du traitement avec l'anticorps agoniste de DR5 AMG655, un Western Blot a été réalisé permettant de suivre au cours du temps la phosphorylation, et donc l'activation, des kinases et des effecteurs potentiellement impliqués dans les voies déjà décrites dans la littérature (**FIGURE 54**). Les cellules sont déprivées de SVF pendant 16h, elles sont ensuite traitées avec 500ng/mL d'AMG655 suivant une cinétique de 0 ; 5 ; 15 ; 30 à 60 minutes. La présence de SVF pendant 1h sert de contrôle positif de l'activation des voies de survie/prolifération. La totalité des protéines est extraite en présence d'inhibiteurs de kinases/phosphatases pour préserver les phosphorylations.

Le suivi des phosphorylations des kinases AKT (Thréonine 308) et p38 (Thréonine 180/Tyrosine 182) permet de déterminer l'activation des voies de PI3K/Akt et des MAPK passant par TAK1. Le suivi des phosphorylations des effecteurs NF- κ B (p105 Serine 933) et c-JUN (Thréonine 91) permet de vérifier l'activation des voies NEMO/ NF- κ B et des MAPK passant par JNK.

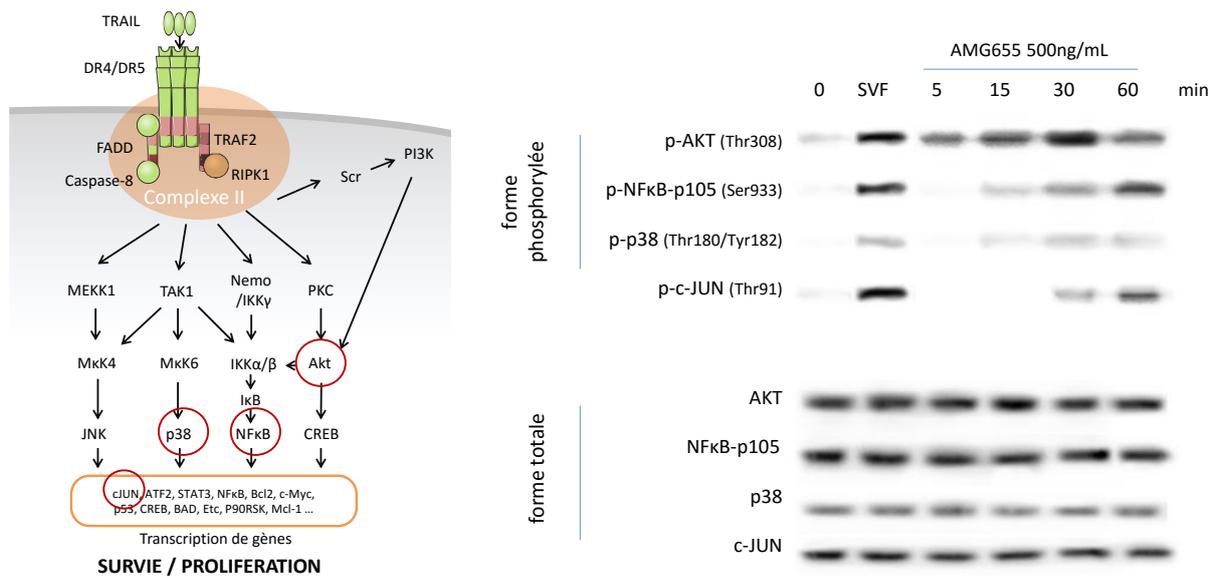


Figure 54 Activation des voies pro-prolifératives dans la lignée K-HOS après traitement à l'AMG655 révélée par Western Blot. Les cellules sont déprivées de SVF pendant 16h. Elles sont ensuite traitées avec 500ng/mL d'AMG655 pendant 0 ; 5 ; 15 ; 30 ou 60 minutes. Le SVF 5% est utilisé comme contrôle positif de l'activation des voies de survie/prolifération. La totalité des protéines est extraite en présence d'inhibiteurs de kinases/phosphatases pour préserver les phosphorylations. La révélation des formes totales des protéines est utilisée comme contrôle de chargement.

Le traitement au SVF pendant une heure est un bon contrôle qui permet l'activation par phosphorylation de toutes les kinases et effecteurs étudiés.

La forme phosphorylée de la kinase Akt est observée dès cinq minutes de traitement des cellules K-HOS avec l'AMG655. Cette activation est maintenue durant au moins une heure après le traitement. On retrouve également les phosphorylations de la MAPK p38 et du facteur de transcription NF-κB (p105) après quinze minutes de traitement à l'AMG655. Ces activations semblent s'intensifier à 30 minutes de traitement. Après 60 minutes de traitement, l'activation de NF-κB est encore amplifiée alors que celle de p38 se maintient. Enfin, le facteur de transcription c-JUN est activé à partir de 30 minutes de traitement à l'AMG655 et cette activation s'accroît au bout d'une heure de traitement.

Si l'AMG655 permet d'activer certaines voies de signalisation non-apoptotiques de TRAIL, il reste à déterminer son effet sur la prolifération cellulaire des cellules K-HOS.

a. *In vitro*, l'AMG655 diminue le temps de doublement des cellules K-HOS

Pour déterminer l'effet de l'AMG655 *in vitro* sur la prolifération de la lignée K-HOS, les cellules sont traitées en absence ou en présence de 500ng/mL d'AMG655 pendant cinq semaines. A la suite de ce traitement, les cellules sontensemencées en plaques 6 puits, décollées et comptées et ce, plusieurs fois durant trois jours (**FIGURE 55 GAUCHE**). Le temps de doublement est évalué par l'équation de croissance exponentielle du logiciel GraphPad Prism (**FIGURE 55 DROITE**).

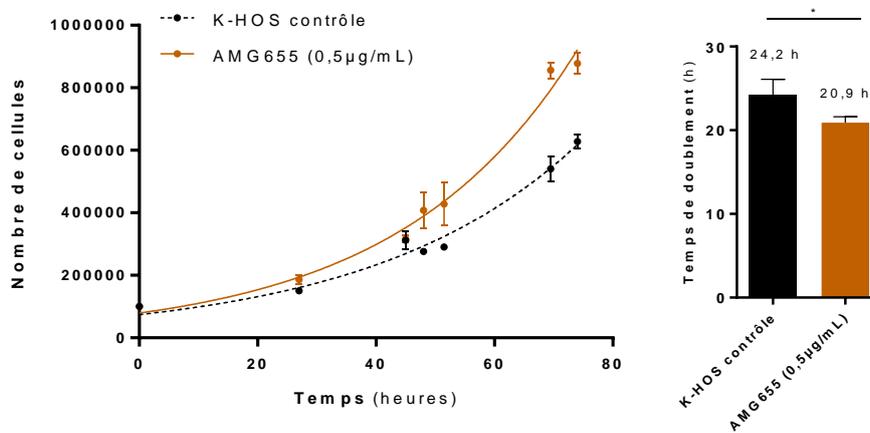


Figure 55 Temps de doublement de la lignée K-HOS avant et après traitement à l'AMG655. Les cellules K-HOS sont traitées avec ou sans AMG655 (0,5 µg/mL) pendant cinq semaines. Après les 5 semaines de traitement, les cellules sontensemencées en plaques 6 puits et sont comptées plusieurs fois durant trois jours (gauche). Le temps de doublement est évalué par l'équation de croissance exponentielle du logiciel GraphPad Prism (droite).

Le temps de doublement des cellules traitées à l'AMG655 pendant 5 semaines est significativement diminué de 13 % par rapport aux cellules non-traitées. L'AMG655 a donc un effet pro-prolifératif *in vitro*.

b. In vivo, AMG655 diminue le temps de doublement des cellules K-HOS

De la même façon qu'*in vitro*, l'effet de l'AMG655 sur la prolifération des cellules K-HOS est évalué *in vivo* par estimation du temps de doublement des cellules tumorales issues de xéno greffes de cellules K-HOS en site para-osseux. Deux groupes de trois souris sont formés, un groupe contrôle et un groupe injecté deux fois par semaine avec 2mg/kg d'AMG655. Quand les tumeurs atteignent 1200 mm³, elles sont reséquées, les cellules tumorales sont isolées par traitement de la tumeur à la collagénase, filtrées à travers des pores de 50µm etensemencées en plaques 6 puits. Les cellules dans les différents puits sont décollées et comptées et ce, plusieurs fois durant trois jours (**FIGURE 56 GAUCHE**). Le temps de doublement est évalué par l'équation de croissance exponentielle du logiciel GraphPad Prism (**FIGURE 56 DROITE**).

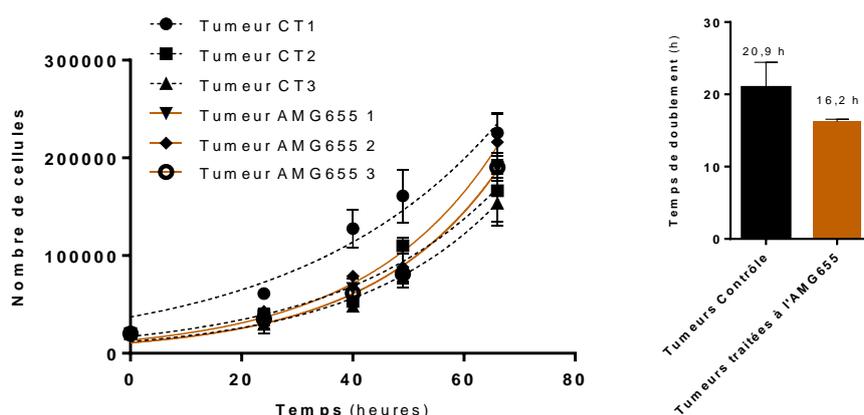


Figure 56 Temps de doublement de cellules tumorales isolées à partir de tumeurs induites chez la souris nude par les cellules K-HOS traitées ou non par 2mg/kg d'AMG655. Deux groupe de 3 souris, un groupe contrôle et un groupe injecté deux fois par semaine avec 2mg/kg d'AMG655. Les cellules isolées quand le volume tumoral atteint 1200mm³ sontensemencées en plaques 6 puits et sont comptées plusieurs fois durant trois jours (gauche). Le temps de doublement est évalué par l'équation de croissance exponentielle du logiciel GraphPad Prism (droite).

Le temps de doublement des cellules isolées de tumeurs K-HOS d'animaux traités à l'AMG655 est diminué par rapport aux cellules isolées à partir de tumeurs K-HOS non-traitées. Ce temps de doublement réduit peut expliquer l'effet pro-tumoral de l'AMG655 observé précédemment.

3. Activation de la voie non-apoptotique de TRAIL induisant la migration de la lignée K-HOS

Comme observé précédemment, le nombre moyen de métastases pulmonaires retrouvées à l'euthanasie des souris traitées par l'AMG655 est plus important que celui des souris non-traitées, sans que la différence ne soit significative dans les conditions de l'expérimentation *in vivo* (FIGURE 50 BAS, DROITE). Il est donc nécessaire de vérifier dans un modèle de migration *in vitro* si l'AMG655 est capable d'augmenter la migration des cellules K-HOS. Les cellules sont prétraitées avec du milieu contrôle, rhTRAIL (50ng/mL), AMG655 (100 ou 500ng/mL) ou du TGF β (5ng/mL) utilisé comme contrôleur positif d'inducteur de la migration. Les cellules sont ensemencées dans la partie supérieure d'une chambre de Boyden à pores de 8 μ m avec les traitements précédents dans du milieu sans SVF. La partie inférieure est remplie de milieu 5%SVF créant un gradient de sérum favorable à la migration cellulaire vers la face inférieure de la membrane de la chambre de Boyden (SCHEMA FIGURE 57 GAUCHE). Après 24h, les cellules se trouvant sur la face inférieure sont celles ayant migré. Elles sont fixées et colorées au crystal violet (FIGURE 57 DROITE, HAUT). La surface recouverte de cellules ayant migré est évaluée avec le logiciel ImageJ et rapportée à la surface totale de la chambre de Boyden (FIGURE 57 DROITE, BAS).

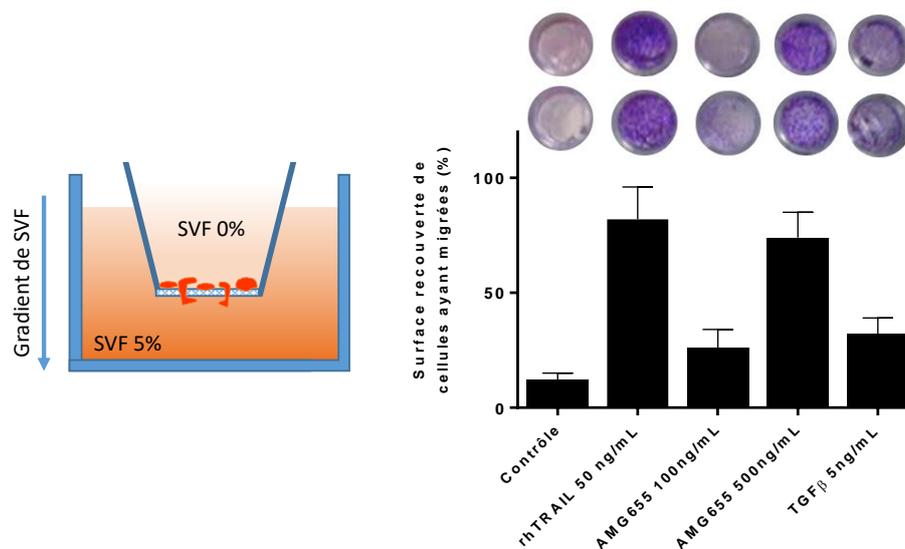


Figure 57 rhTRAIL et l'AMG655 augmentent la migration des cellules K-HOS soumises à un gradient de SVF à travers des pores de 8 μ m. Les cellules sont prétraitées avec du milieu

contrôle, rhTRAIL (50ng/mL), AMG655 (100 ou 500ng/mL) ou du TGF β (5ng/mL) utilisé comme contrôle positif d'inducteur de la migration. Les cellules sont ensemencées dans la partie supérieure d'une chambre de Boyden à pores de 8 μ m avec les traitements précédents dans du milieu sans SVF. La partie inférieure est remplie de milieu 5%SVF créant un gradient de sérum favorable à la migration vers la face inférieure de la membrane de la chambre de Boyden (schéma à gauche). Après 24h, les cellules de la face inférieure sont fixées et colorées au crystal violet (droite, haut). La surface recouverte de cellules ayant migré est évaluée avec le logiciel ImageJ (droite, bas).

Ces tests de migration *in vitro* des cellules K-HOS soumises à un gradient de SVF montrent que l'AMG655 augmente la migration de ces cellules de façon dose-dépendante. Cinquante ng/mL de rhTRAIL sont également capables d'augmenter la migration cellulaire des K-HOS. Ces deux activateurs des récepteurs de mort DR4 et DR5 induisent une migration plus importante que le TGF β (5ng/mL) utilisé comme contrôle positif.

Afin de tenter d'expliquer cet effet pro-migratoire de l'AMG655, un Western Blot a été réalisé permettant de suivre au cours du temps la phosphorylation, et donc l'activation, des facteurs de transcription NF- κ B et STAT3, potentiellement impliqués dans les voies déjà décrites dans la littérature (FIGURE 58).

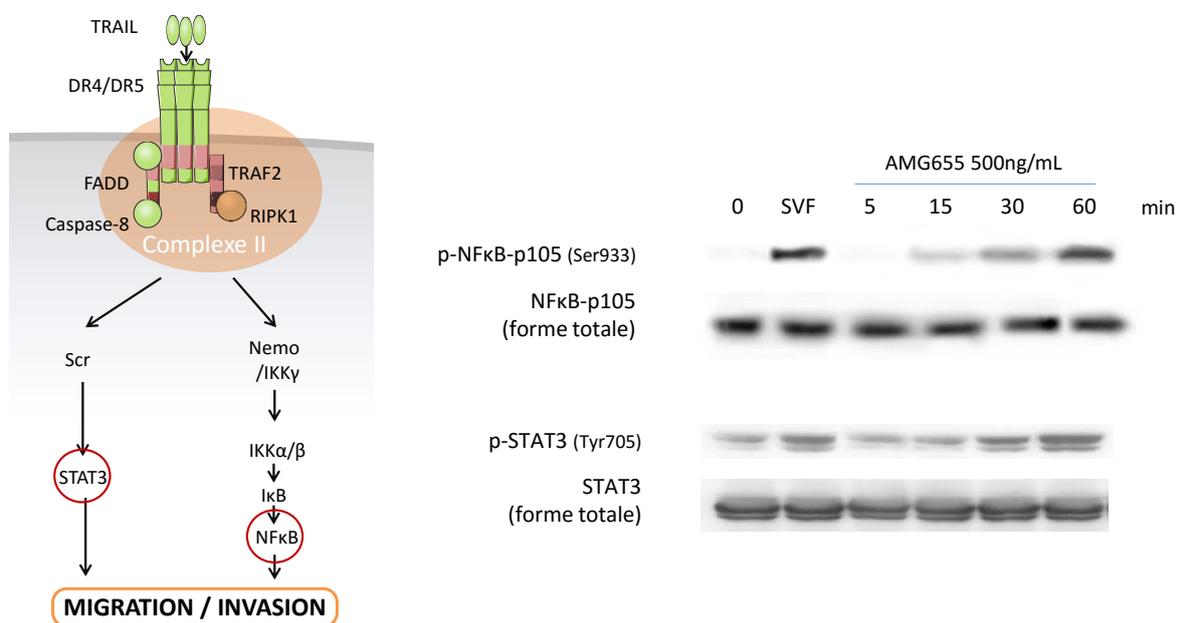


Figure 58 L'AMG655 induit l'activation de voies de migration et d'invasion de la cellule tumorale. Les cellules sont déprivées de SVF pendant 16h. Elles sont ensuite traitées avec 500ng/mL d'AMG655 pendant 0 ; 5 ; 15 ; 30 ou 60 minutes. Le SVF 5% est utilisé comme contrôle positif de l'activation des voies de migration et d'invasion. La totalité des protéines est extraite en présence d'inhibiteurs de kinases/phosphatases pour préserver les phosphorylations.

Comme observé précédemment, le facteur de transcription NF- κ B (p105) s'active après quinze minutes de traitement à l'AMG655. Cette activation semble s'intensifier à 30 minutes puis 60 minutes de traitement. La phosphorylation de STAT3 est également observée.

Les deux voies décrites dans la littérature pour leur capacité potentielle à induire la migration sont donc activées dans les cellules K-HOS suite à un traitement par l'AMG655.

IV. Rôle du microenvironnement des tumeurs osseuses pédiatriques sur la sensibilité à l'AMG655

Le microenvironnement tumoral osseux particulier des tumeurs osseuses pédiatriques jouant un rôle important dans l'apparition de phénomènes de résistance à TRAIL de ces pathologies (section *Introduction* III, 4), il pourrait expliquer pour partie l'effet pro-prolifératif de l'AMG655 dans le modèle de xénogreffe K-HOS.

Afin d'appréhender l'implication potentielle de plusieurs composants de ce microenvironnement sur la sensibilité à l'AMG655 des cellules tumorales d'ostéosarcome K-HOS, deux expérimentations reproduisant *in vitro* les conditions de la tumeur *in vivo* ont été mises en place.

1. Etude de la sensibilité à l'AMG655 dans un modèle d'induction de HIF-1 α

Le microenvironnement tumoral osseux est caractérisé par une forte hypoxie due d'une part à la croissance de la masse tumorale mais également à l'architecture de la moelle osseuse où des taux d'oxygène variant de 7 à moins de 1% peuvent être mesurés. Les cellules tumorales répondent à un environnement hypoxique par l'accumulation du facteur de transcription HIF-1 α qui va contrôler l'expression de nombreux gènes et leur permettre de s'adapter à ces conditions défavorables.

Un traitement des cellules par la DFO permet de mimer ce phénomène d'hypoxie *in vitro* par l'induction de l'accumulation de HIF-1 α . Un Western Blot permet de confirmer cette accumulation dose-dépendante (**FIGURE 59 GAUCHE**). Les cellules de la lignée K-HOS sont prétraitées ou non durant 24h à la DFO à 0,1 ; 1 ou 10 μ M. La prolifération cellulaire en présence de concentrations croissantes d'AMG655 est ensuite étudiée toujours en présence de DFO pendant 72h (**FIGURE 59 DROITE**).

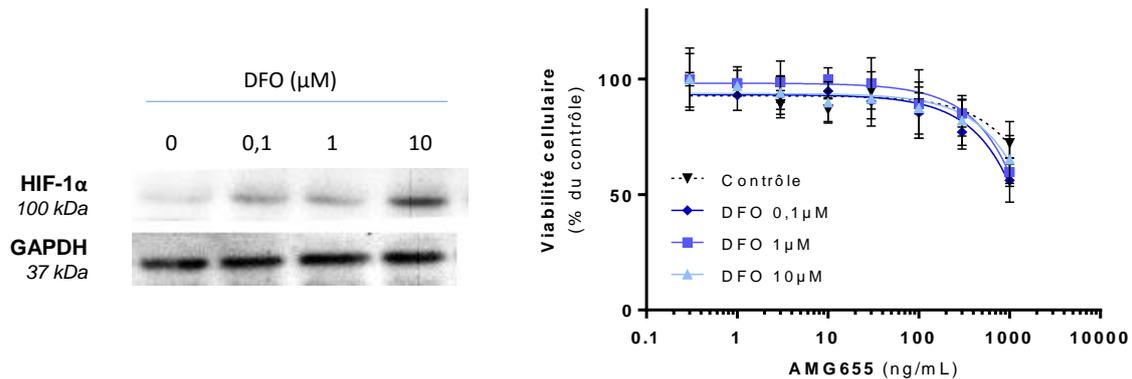


Figure 59 L'hypoxie simulée par la déféroxamine (DFO) ne modifie pas la sensibilité des cellules K-HOS à l'AMG655. La DFO est utilisée pour induire l'accumulation d'HIF-1 α vérifiée par Western Blot (gauche). La prolifération de la lignée K-HOS en présence de concentrations croissantes d'AMG655 est déterminée avec ou sans prétraitements de 24h à la DFO à 0,1 ; 1 ou 10 μ M puis durant 72h de traitement.

Ces tests montrent que l'accumulation de HIF-1 α mimant un environnement hypoxique ne modifie pas la réponse de la lignée K-HOS à l'AMG655.

2. Rôle du pH extracellulaire acide sur la sensibilité à l'AMG655

La libération importante de protons par les ostéoclastes près du site tumoral acidifie sensiblement le microenvironnement. Le pH extracellulaire acide est un paramètre important qui peut influencer sur la sensibilité des cellules tumorales à TRAIL.

Les milieux de culture des cellules de la lignée K-HOS sont acidifiés pour obtenir un pH extracellulaire de 7 ou 6.5 durant 24h. A la suite de ce traitement, la prolifération cellulaire en présence de

concentrations croissantes d'AMG655 est déterminée durant 72h, toujours en présence de milieux de culture acides (**FIGURE 60 GAUCHE**). Cette étude révèle que lorsque le milieu extracellulaire est acide (pH=6.5), les faibles concentrations d'AMG655 3ng/mL et 10ng/mL augmentent significativement la prolifération des cellules K-HOS.

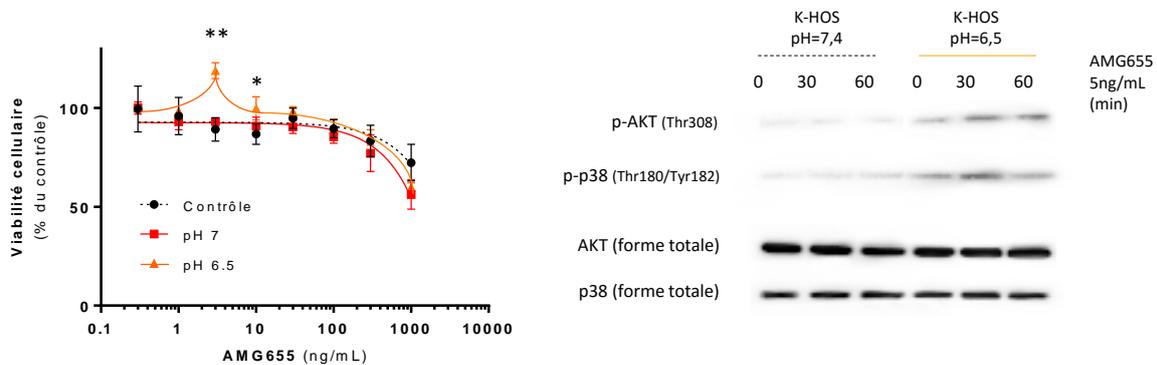


Figure 60 Un pH extracellulaire acide augmente l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL par l'AMG655 dans les cellules K-HOS. Les cellules K-HOS sont cultivées en milieu à pH=6,5 ; 7 ; ou physiologique pendant 24h. La prolifération est ensuite déterminée en présence de concentrations croissantes d'AMG655 durant 72h dans un milieu au pH correspondant (gauche). L'activation de voies non apoptotiques de TRAIL après traitement avec 5ng/mL d'AMG655 est déterminée par étude des phosphorylations des kinases p38 et Akt en conditions contrôle ou en milieu extracellulaire acide (droite).

Afin de vérifier si cette augmentation de la prolifération dans ces conditions particulières est liée à l'activation de voies non-apoptotiques de TRAIL, l'étude de la phosphorylation des kinases Akt et p38 est réalisée après traitement avec 5ng/mL d'AMG655 en condition contrôle ou en milieu extracellulaire acide (pH=6.5). Le Western Blot permet de déterminer que, cultivées dans un milieu acide, les cellules K-HOS voient leurs taux constitutifs d'Akt et de p38 phosphorylées augmenter. Après un traitement de 30 minutes à l'AMG655, ces taux augmentent encore alors qu'à cette concentration d'AMG655, il n'y a pas de phosphorylation de ces kinases à pH physiologique (**FIGURE 60 DROITE**).

Ce modèle *in vitro* d'acidification du pH extracellulaire permet de déterminer qu'un microenvironnement acide pourrait contribuer à l'effet pro-prolifératif de l'AMG655 dans le modèle *in vivo* d'ostéosarcome induit par les cellules K-HOS.

Conclusions de la première partie

- **Une compréhension des mécanismes de résistance à TRAIL des tumeurs osseuses pédiatriques encore imparfaite**

Avant d'envisager une utilisation clinique de TRAIL ou d'un agoniste des récepteurs de morts DR4 et DR5 dans les tumeurs osseuses pédiatriques, il est primordial de mieux caractériser et comprendre les mécanismes de résistance à TRAIL observés dans les cellules tumorales correspondantes. La littérature regorge d'exemples de ces mécanismes potentiels décrits dans de multiples types de cancers, cependant il paraît vraisemblable que la sensibilité à TRAIL et les dispositifs de résistance impliqués soient différents d'un type de cancer à l'autre et une étude complète doit être menée pour chacun.

Dans le cadre des tumeurs osseuses pédiatriques, il apparaît que les modèles *in vitro* de sarcome d'Ewing ne répondent pas de la même façon à TRAIL que ceux d'ostéosarcome, démontrant ainsi que des mécanismes différents sont mis en œuvre dans les cellules tumorales de l'une et l'autre de ces pathologies. Ainsi, dans les lignées de sarcome d'Ewing, il semble s'établir une forte corrélation entre la sensibilité de la lignée et l'expression du récepteur de mort DR4, suggérant un rôle prépondérant de l'absence de ce récepteur dans la résistance à TRAIL du sarcome d'Ewing. Ce constat est par ailleurs confirmé par l'utilisation de variants de TRAIL sélectifs pour l'un ou l'autre des récepteurs de mort DR4 et DR5 dans la lignée modèle de sarcome d'Ewing TC-71, démontrant que le variant sélectif pour DR4 est plus efficace pour réduire la prolifération cellulaire de la lignée que celui sélectif pour DR5.

Dans la littérature, la corrélation entre l'expression d'un récepteur de mort et la sensibilité à TRAIL dans des lignées de sarcome d'Ewing est controversée. Par exemple, dans une étude de 2001 décrivant que 9 lignées utilisées sur 10 étaient sensibles à l'apoptose induite par TRAIL, les auteurs constataient que les 9 lignées sensibles exprimaient à la fois DR4 et DR5 (Mitsiades et al., 2001). Seule la lignée résistante n'exprimait pas DR5 et cette résistance pouvait être levée par la restauration de l'expression de ce récepteur par transfection. Ces écarts par rapport à nos propres résultats peuvent peut-être être expliqués par l'origine des lignées cellulaires étudiées, leurs conditions de culture ou les concentrations de TRAIL utilisées. Dans la même étude, les niveaux de DcR1, DcR2 ou les niveaux de la protéine inhibitrice c-FLIP n'étaient pas corrélés à la résistance à TRAIL, ce qui conforte nos propres données, notamment l'incapacité de sensibiliser les lignées résistantes par l'inhibition de c-FLIP. Cependant, une exception a été observée dans les lignées de sarcome d'Ewing ; en effet, la lignée STA-ET-1 ne semble pas répondre à TRAIL de la même façon que les autres lignées issues de cette tumeur. Cette lignée se révèle particulièrement sensible à TRAIL alors qu'elle n'exprime pas DR4, et cette sensibilité n'est pas affectée par une inhibition de moitié de l'expression de DR5, seul récepteur de mort exprimé à sa surface. Cette lignée extrêmement sensible à TRAIL est également très sensible à beaucoup de composés (chimiothérapies, agents altérant le métabolisme) et à la radiothérapie (Greve et al., 2012; Lanvers-Kaminsky et al., 2005; Szekeres et al., 1993) ce qui en fait sans doute un modèle à utiliser avec précaution.

En ce qui concerne les lignées d'ostéosarcome, aucune corrélation du même type n'a pu être établie, ce qui révèle des mécanismes de résistance à TRAIL différents entre les deux types de tumeurs osseuses pédiatriques.

La variété de mécanismes de résistance mis en évidence entre différents modèles de la même pathologie se reflète aussi dans les différences de sensibilité croisée entre TRAIL et Fas-L. En effet, plusieurs cas de figure ont été observés en réponse à ces deux cytokines pro-apoptotiques de la famille du TNF qui partagent une partie de leur voie apoptotique. Des phénomènes de résistance en aval de la formation du complexe DISC semblent être responsables de la double résistance à TRAIL et à Fas-L de la plupart des lignées d'ostéosarcome, peut-être la balance caspases / inhibiteurs des caspases très largement en faveur des inhibiteurs. Seules les lignées d'ostéosarcome Saos-2 et MG-63 se démarquent avec des mécanismes de résistance qui semblent mettre en jeu les récepteurs de TRAIL, ces lignées étant sensibles à Fas-L. Il a été démontré précédemment que ces mêmes cellules d'ostéosarcome MG-63 sont hétérozygotes pour une mutation dominante négative dans le domaine de mort de DR4 qui pourrait conférer cette résistance à TRAIL (Locklin et al., 2007). La prise en compte

du fait que certains récepteurs pourraient être présents mais non fonctionnels complexifie encore ce genre d'étude.

- **Le rôle de signalisations non-apoptotiques induites par l'activation des récepteurs de mort de TRAIL dans les modèles résistants d'ostéosarcome**

Afin de tenter d'expliquer l'effet pro-tumoral de l'anticorps agoniste de DR5, AMG655, utilisé *a priori* comme inducteur de la voie extrinsèque de l'apoptose, dans le modèle résistant d'ostéosarcome, il a été nécessaire de prendre en compte un versant différent de la signalisation de TRAIL. Les voies de signalisation non-apoptotiques induites par l'activation des récepteurs de mort de TRAIL semblent en effet capables de provoquer l'augmentation de la prolifération de la lignée K-HOS *in vivo* mais aussi *in vitro* après cinq semaines de traitement à l'AMG655.

La migration cellulaire semble aussi être augmentée par l'AMG655 *in vitro*, même si l'effet sur les métastases pulmonaires dans le modèle de xénogreffe induit par les cellules K-HOS n'est pas significatif dans les conditions de l'expérimentation *in vivo*.

Nous constatons ainsi que les cellules tumorales ont mis en place une façon de s'adapter aux mécanismes d'immunosurveillance du cancer, dont TRAIL est un composant essentiel, non seulement en ignorant les signaux qui devraient conduire à leur apoptose, mais aussi en prenant cette signalisation à leur avantage, leur conférant survie, prolifération, mais aussi migration et invasion.

L'existence de ces voies de signalisation et leurs effets prouvés dans plusieurs études précliniques et maintenant dans notre modèle d'ostéosarcome doivent appeler une précaution supplémentaire dans l'utilisation d'inducteurs de l'activation des récepteurs de mort de TRAIL en clinique.

- **Le microenvironnement tumoral osseux joue un rôle dans la résistance de l'ostéosarcome à TRAIL**

Le développement de modèles *in vivo* permet la prise en compte du microenvironnement osseux tumoral particulier des pathologies qui nous intéressent. C'est dans ce modèle d'ostéosarcome induit par la lignée cellulaire K-HOS que l'on a mis en évidence l'existence d'un effet pro-tumoral de l'AMG655, que l'on a pu reproduire partiellement *in vitro*.

L'étude du paramètre d'hypoxie, par une méthode d'imitation de l'accumulation de HIF-1 α , n'a pas donné de résultats satisfaisants quant à un rôle de l'hypoxie sur la sensibilité à l'AMG655 des cellules de la lignée K-HOS. Cependant, ce modèle présente beaucoup de limites, dont celle de ne pas prendre en compte la privation des nutriments en plus de l'oxygène en conditions tumorales. Cette privation de nutriments, notamment de glucose, force la cellule tumorale à modifier drastiquement son métabolisme de façon indépendante de HIF-1 α . C'est peut-être par ce mécanisme indépendant de HIF-1 α que les cellules d'ostéosarcome modifient également leur sensibilité à l'AMG655 comme semble le montrer sans pouvoir l'expliquer la littérature (Kilic-Eren et al., 2013).

L'étude de l'impact d'un pH extracellulaire acide sur la sensibilité de la lignée K-HOS à l'AMG655 a porté ses fruits. En effet, nous montrons qu'à un pH extracellulaire acide (6,5), de très faibles concentrations d'AMG655 favorisent la prolifération tumorale, sans doute par l'activation de voies non-apoptotiques de signalisation dépendantes de Akt et de la MAPK p38. Un rôle des ostéoclastes dans le développement des tumeurs osseuses primitives et les métastases osseuses était déjà démontré par l'existence d'un cercle vicieux s'établissant entre progression tumorale et ostéolyse. A côté de ce rôle bien connu, nous pouvons maintenant ajouter qu'en acidifiant le microenvironnement osseux tumoral, les ostéoclastes participent sans doute à l'échappement de la tumeur au système immunitaire. Le pH extracellulaire acide entraîne peut-être un changement de la réponse à TRAIL, produit par les lymphocytes effecteurs de l'immunosurveillance du cancer, la cytokine passant du rôle d'inducteur de l'apoptose au rôle de facteur de signaux de survie, de prolifération et de migration.

Résultats

PARTIE II

Vers une sensibilisation des Tumeurs Osseuses Pédiatriques aux thérapies impliquant la voie de TRAIL

Partie II - Vers une sensibilisation des Tumeurs Osseuses Pédiatriques aux thérapies impliquant la voie de TRAIL

Comme suggéré dans la partie I, les causes de la résistance des tumeurs osseuses pédiatriques à l'effet pro-apoptotique de TRAIL semble être doubles. En effet, d'une part cette résistance pourrait être liée à la capacité intrinsèque des cellules tumorales à privilégier la voie non-apoptotique de TRAIL par un ensemble de mécanismes cellulaires, mais aussi être liée au microenvironnement particulier des tumeurs osseuses primitives. Dans cette partie, nous proposerons d'explorer de nouvelles hypothèses pour une (re)sensibilisation de ces tumeurs particulières.

I. Inhibition de la voie non-apoptotique de TRAIL : Une preuve de concept par l'utilisation de shRNA ciblant RIPK1

Le recrutement de la protéine RIP1K dans le complexe membranaire à la suite de la fixation de TRAIL sur ses récepteurs de mort semble être l'étape clef de l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL, conduisant à la survie de la cellule, et déclenchant des mécanismes pro-prolifératifs et pro-migratoires. Afin de bloquer cette voie dans les cellules d'ostéosarcome K-HOS, une inhibition de l'expression de RIPK1 a été réalisée par l'utilisation de petits ARN en épingle à cheveux (shRNA) intégrés au génome par stratégie lentivirale (**SECTION MATERIELS & METHODES IV.4.**). Deux séquences nucléotidiques ciblant l'ARNm de RIPK1 sont utilisées, nommées shRIP1-1 et shRIP1-2. Les vecteurs intégrés au génome contiennent également deux gènes de sélection par résistance aux antibiotiques puromycine et zéocyne permettant une sélection des cellules ayant intégré le shRNA. Cette sélection n'étant pas neutre pour la cellule, un shRNA dont la séquence ne cible aucun ARNm est utilisé comme contrôle (nommé shCT).

1. Vérification de l'inhibition de l'expression de RIPK1 dans la lignée K-HOS transduite avec shRIP1

Après sélection des lignées transduites par l'utilisation de la puromycine, des analyses transcriptionnelle et traductionnelle sont réalisées respectivement par RT-qPCR et par Western Blot afin de quantifier l'expression résiduelle potentielle de RIPK1 (**FIGURE 61**). L'expression de l'ARNm de *RIPK1* dans les cellules de la lignée K-HOS transduites avec le shRIP1-1 est ainsi réduite de 70% par rapport aux cellules transduites avec le shCT. Les cellules ayant intégré le shRIP1-2 ont une expression de transcrits RIPK1 moins réduite, d'environ 40%. Cette observation est confirmée au niveau protéique par Western Blot, l'analyse de l'intensité du marquage RIPK1 rapporté à celui de la protéine de référence GAPDH révélant une importante inhibition de l'expression de RIPK1 dans les cellules shRIP1-1 et une inhibition moindre dans les cellules shRIP1-2. Ces observations confirment la capacité des shRNA RIP1-1 et RIP1-2 à diminuer l'expression de la protéine RIPK1.

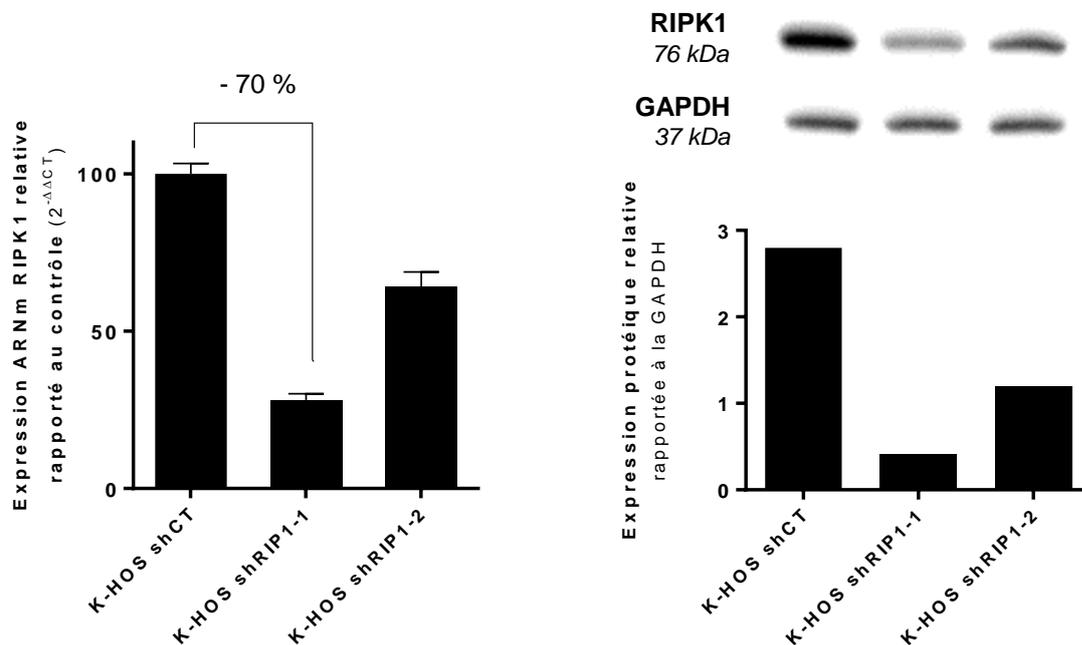


Figure 61 Inhibition de l'expression de RIPK1 dans la lignée K-HOS transduite avec des shRNA ciblant RIPK1 (K-HOS shRIP1-1 et shRIP1-2). L'expression transcriptionnelle est évaluée par RT-qPCR (gènes de référence : GAPDH et β -2 microglobuline) et rapportée aux K-HOS transduites avec un shRNA contrôle (K-HOS shCT). L'expression protéique est évaluée par Western Blot, l'intensité des bandes est estimée et rapportée à l'intensité de la GAPDH.

2. L'inhibition de l'expression de RIPK1 par shRNA ne modifie pas la sensibilité de la lignée K-HOS à l'apoptose induite par l'AMG655

Afin de vérifier si l'inhibition de RIPK1 influe sur la voie apoptotique de TRAIL, un test de prolifération et un test d'activité de la caspase-3 en présence d'AMG655 sont réalisés sur les lignées K-HOS shCT, K-HOS shRIP1-1 et K-HOS shRIP1-2 (**FIGURE 62**). Ces tests révèlent d'une part que la sensibilité à l'AMG655 n'est pas différente entre les trois lignées, que ce soit pour les faibles concentrations d'AMG655 ou pour les plus fortes. D'autre part, l'activité enzymatique de la caspase-3 en présence de 500ng/mL d'AMG655 pendant 24h n'est pas significativement modifiée par les shRIP1.

Ces observations démontrent l'absence d'activation de la voie apoptotique de TRAIL par l'AMG655 dans la lignée K-HOS même en cas d'inhibition de RIPK1.

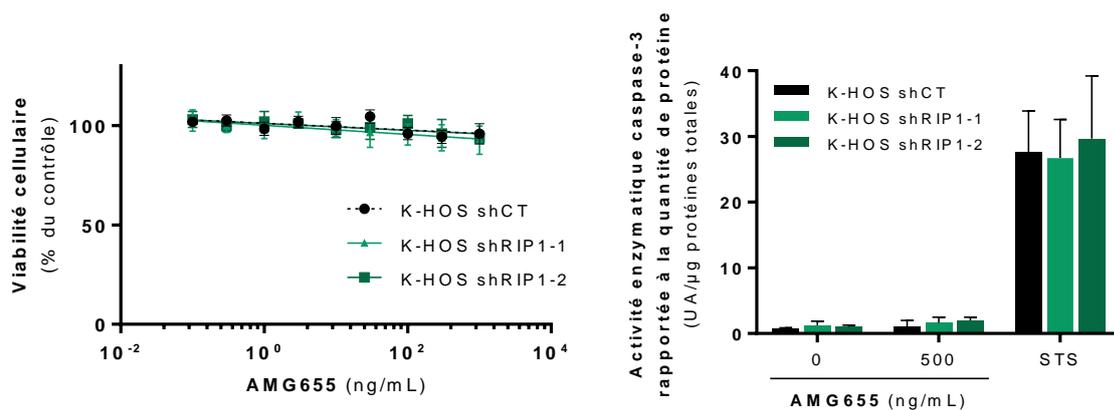


Figure 62 Absence d'activation de la voie apoptotique de TRAIL dans les lignées K-HOS shCT, K-HOS shRIP1-1 et K-HOS shRIP1-2, validée par test de prolifération en présence de concentrations croissantes d'AMG655 (à gauche) et par test d'activité de la caspase-3 en UA rapportée à la quantité de protéines totales en présence de 0 ou 500ng/mL d'AMG655 pendant 24h, la staurosporine (STS) 1μM pendant 8h est utilisée comme contrôle positif.

3. L'inhibition de l'expression de RIPK1 par shRNA bloque l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL induite par l'AMG655

Nous souhaitons confirmer que l'inhibition du recrutement de RIPK1 dans le complexe de signalisation secondaire pourrait être une piste pour éviter l'effet pro-prolifératif de l'AMG655 dans notre modèle d'ostéosarcome. La vérification de l'absence d'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL dans les lignées K-HOS shRIP1-1 et shRIP1-2 est la première étape de cette confirmation.

L'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL à la suite de la fixation de l'AMG655 sur DR5 dans les lignées K-HOS shCT, shRIP1-1 et shRIP1-2 est déterminée par le suivi de la phosphorylation de la kinase Akt à 0 ; 30 et 60 minutes après traitement avec 500ng/mL d'AMG655 (**FIGURE 63 GAUCHE**). L'intensité de marquage de phospho-AKT est rapportée au marquage de la forme totale grâce au logiciel GeneTools (**FIGURE 63 DROITE**) ce qui permet d'évaluer la cinétique d'activation.

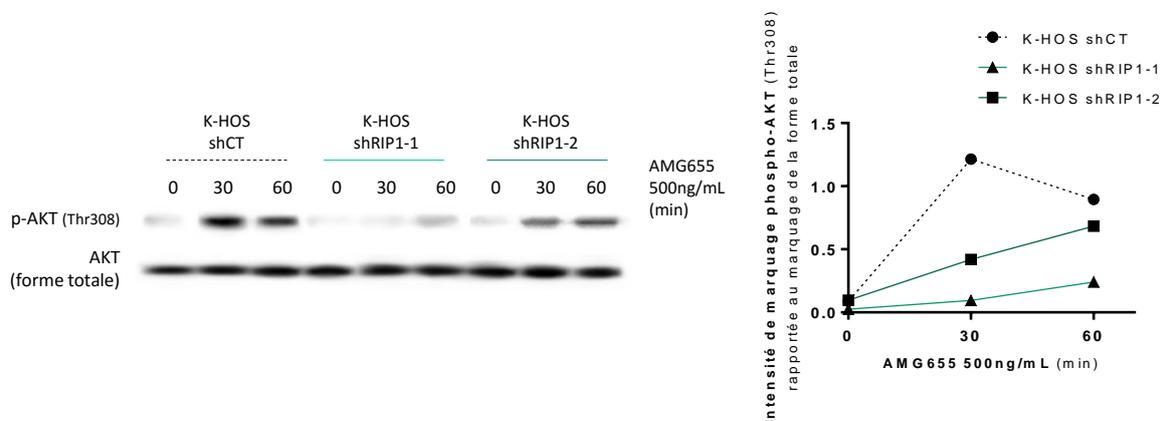


Figure 63 Blocage de l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL induite par l'AMG655 par les shRNA ciblant RIPK1 dans la lignée K-HOS, observé par Western Blot révélant la forme phosphorylée d'AKT (Thr308) à 0, 30 ou 60 min de traitement par 500ng/mL d'AMG655 (gauche). L'intensité de marquage de p-AKT est rapportée au marquage de la forme totale grâce au logiciel GeneTools (droite).

La lignée K-HOS shCT présente un pic d'activation de la voie Akt à 30min qui se prolonge à 60min. La lignée K-HOS shRIP1-2, qui présente une inhibition de 40% de l'expression de RIPK1, montre un

ralentissement de l'activation d'Akt dans le temps avec un pic à 60min mais une intensité de phosphorylation proche de celle de la lignée contrôle. Dans la lignée K-HOS shRIP1-1, dont l'expression de RIPK1 est diminuée de 70%, l'activation d'Akt à la suite du traitement avec l'AMG655 est presque abolie. L'inhibition de l'expression de RIPK1 dans la lignée K-HOS permet donc de limiter l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL, de façon dose-dépendante.

4. *In vivo*, l'inhibition de RIPK1 permet de sensibiliser la lignée K-HOS à l'AMG655

La lignée K-HOS shRIP1-1, qui a montré la plus forte inhibition de l'expression de RIPK1 et un important blocage de l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL à la suite d'un traitement à l'AMG655, est choisie pour l'induction de tumeurs en site orthotopique para-tibial chez la souris nude.

Quatre groupes de six souris sont formés, dans deux groupes sont développées des tumeurs induites par l'injection intramusculaire d'un million de cellules K-HOS shCT, dans les deux autres groupes sont développées des tumeurs induites par l'injection d'un million de cellules K-HOS shRIP1-1. Pour chaque type de shRNA, un groupe est injecté deux fois par semaine avec du NaCl 0,9% (groupe contrôle) et l'autre groupe avec 2mg/kg d'AMG655 (**FIGURE 64**).

Compte tenu de l'hétérogénéité du groupe contrôle shCT, l'effet pro-tumoral de l'AMG655 n'est pas retrouvé significativement dans le groupe induit par les cellules K-HOS shCT. Dès J28, les tumeurs induites par les cellules K-HOS shRIP1-1 et traitées avec l'AMG655 présentent un ralentissement significatif du développement, démontrant un effet anti-tumoral de l'AMG655 en absence de la protéine RIPK1 (**FIGURE 64 A ET B**). Ce ralentissement du développement tumoral est associé à une amélioration de la survie des animaux (**FIGURE 64 C**). Le nombre de métastases pulmonaires retrouvés dans les quatre groupes ne présente pas de différences significatives (**FIGURE 64 D**).

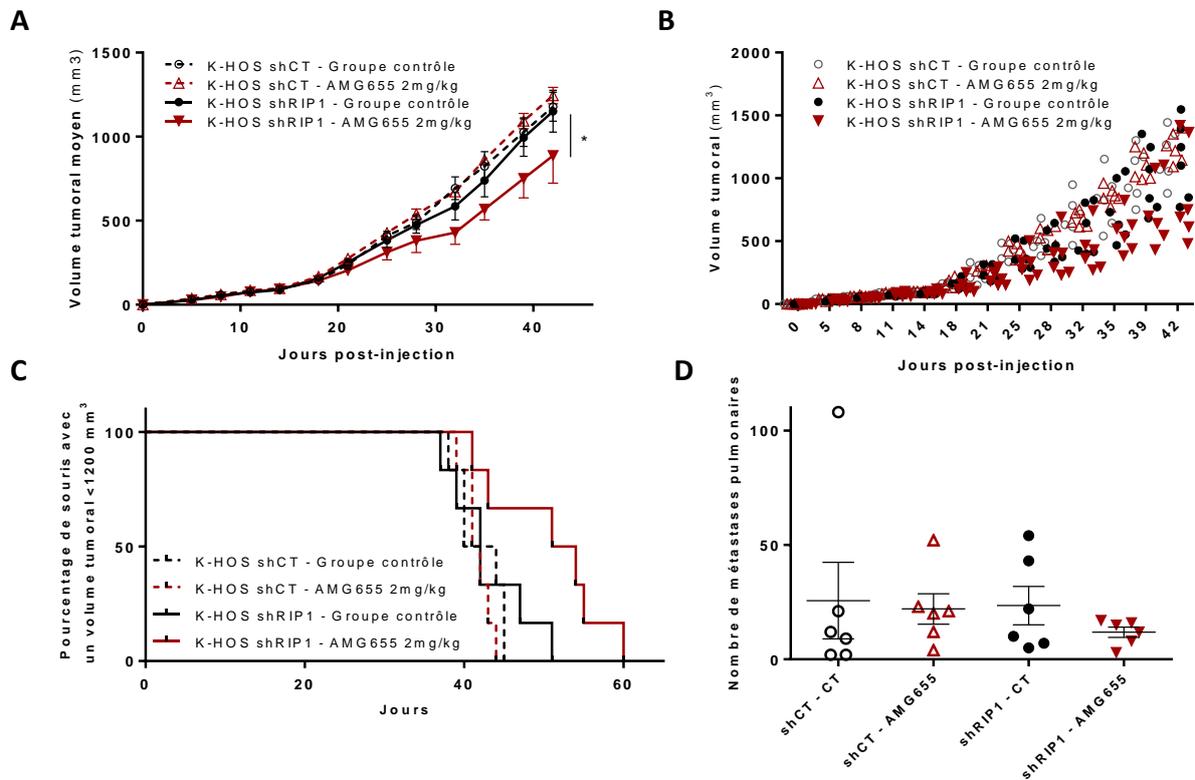


Figure 64 L'inhibition de RIPK1 par shRNA sensibilise les tumeurs induites par les cellules K-HOS à l'effet anti-tumoral de l'AMG655. Quatre groupes de 6 souris sont formés, deux groupes reçoivent l'injection intramusculaire d'un million de cellules K-HOS shCT, les deux autres groupes l'injection d'un milieu de cellules K-HOS shRIP1-1. Pour chaque type de shRNA, un groupe est injecté deux fois par semaine avec du NaCl 0,9% (groupe contrôle) et l'autre groupe avec 2mg/kg d'AMG655. Le volume tumoral moyen par groupe (A) et le volume tumoral individuel (B) est calculé deux fois par semaine. La survie est évaluée par le pourcentage de souris avec un volume tumoral inférieur à 1200mm³ (C). Le nombre de métastases pulmonaires est déterminé à volume équivalent (D).

II. Des cellules souches mésenchymateuses comme source stable de TRAIL

Parmi les différentes stratégies visant à augmenter l'effet thérapeutique de TRAIL, l'utilisation de cellules utilisées comme « vecteurs » de la cytokine semble une piste prometteuse en cancérologie (Barti-Juhász et al., 2011; Carlo-Stella et al., 2006; Ciavarella et al., 2012; Grisendi et al., 2010; Loebinger et al., 2009; Mohr et al., 2008; Yuan et al., 2015) afin d'une part d'avoir une source de TRAIL membranaire et d'autre part de vectoriser la cytokine plus facilement jusqu'au site tumoral. Ces cellules porteuses sont le plus souvent des CSM dérivées d'adipocytes, modifiées par des plasmides codant pour le gène humain de TRAIL. Si cette stratégie apporte des résultats encourageants dans des modèles de myélome, de cancer du sein ou de certains sarcomes, nous discuterons ici de leur efficacité dans nos modèles de tumeurs osseuses pédiatriques.

1. Des CSM transduites exprimant fortement la GFP et TRAIL

Les CSM sont transduites stablement par stratégie lentivirale avec un vecteur codant pour le gène complet humain de TRAIL et celui de la GFP (MIGR1-TRAIL-GFP) ou avec un vecteur contrôle, codant uniquement pour la GFP (MIGR1-GFP). La microscopie optique à fluorescence et l'analyse par

cytométrie en flux confirment que plus de 98% des CSM transduites sont positives pour la GFP (**FIGURE 65**).

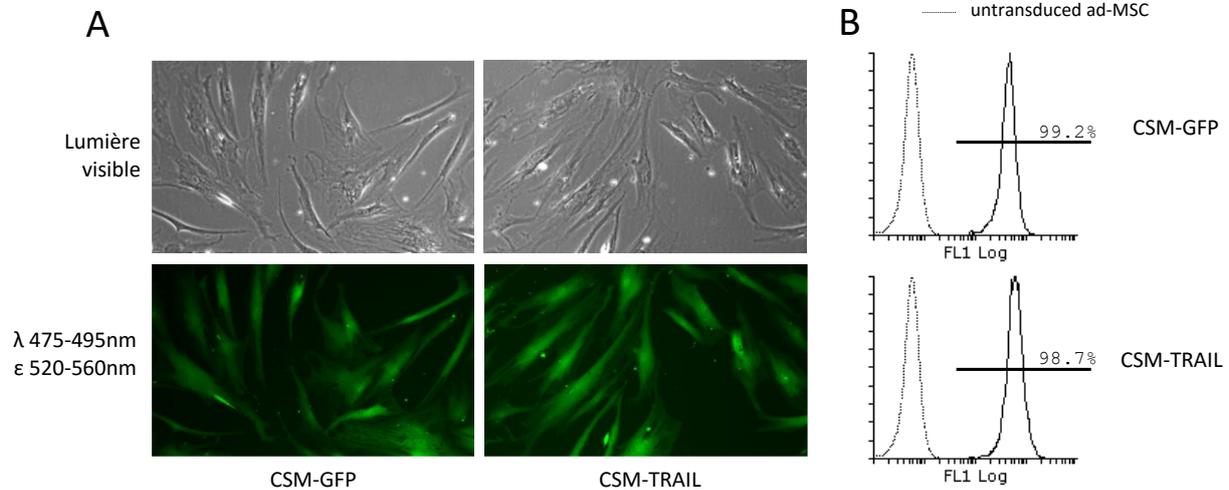


Figure 65 Caractérisation de l'expression de la GFP des CSM transduites en microscopie optique à fluorescence (A) et en comparaison à des CSM naïves en cytométrie en flux (B)

De plus, l'analyse transcriptionnelle par RT-qPCR révèle que les CSM-GFP expriment constitutivement l'ARNm de TRAIL (**FIGURE 66 A**) mais son expression protéique est en-dessous de la limite de détection du test ELISA utilisé (**FIGURE 66 B**). Au contraire, la modification génétique des CSM par le vecteur codant pour TRAIL permet l'expression dans ces cellules d'un fort taux d'ARNm et d'une importante quantité de protéine (8ng/mg d'extrait protéique total). Cependant, de très faibles concentrations de TRAIL soluble, environ 0,1 ng/mL après 48h, sont retrouvées dans le surnageant (**FIGURE 66 C**), indiquant ainsi que TRAIL est presque exclusivement produit sous forme membranaire *in vitro*.

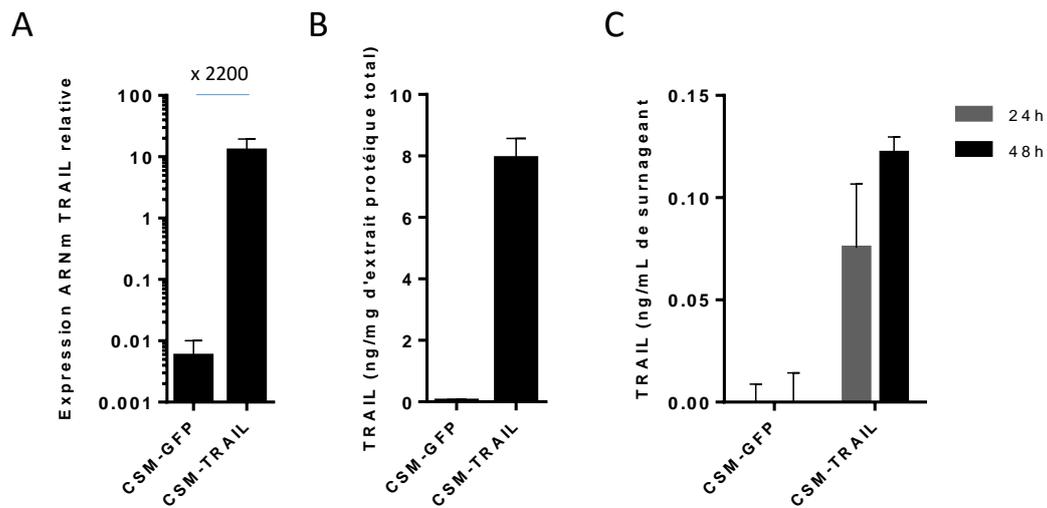


Figure 66 Quantification transcriptionnelle par RT-qPCR (A) ou traductionnelle par ELISA (B) de l'expression de TRAIL par les CSM transduites. La sécrétion de TRAIL par ces cellules est également évaluée par ELISA à 24 ou 48h (C).

2. Les lignées d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing sont sensibles à TRAIL par contact direct avec les CSM-TRAIL

Comme observé dans la partie précédente, les tests de prolifération en présence de rhTRAIL montrent que toutes les lignées étudiées ne répondent pas de la même façon à rhTRAIL (FIGURE 34). En effet, sur six lignées de sarcome d'Ewing et six lignées d'ostéosarcome présentées en FIGURE 67, les lignées TC-71 et RD-ES sont très sensibles à l'effet pro-apoptotique de rhTRAIL ($IC_{50} < 200$ ng/mL de rhTRAIL), les lignées MG-63, G-292 et A-673 sont moins sensibles avec une $IC_{50} < 1000$ ng/mL de rhTRAIL. Les autres lignées cellulaires (K-HOS, Saos2, SJSA-1, U-2 OS, EW-24, SK-ES-1 et TC-32) sont résistantes à rhTRAIL ($IC_{50} > 1000$ ng/mL).

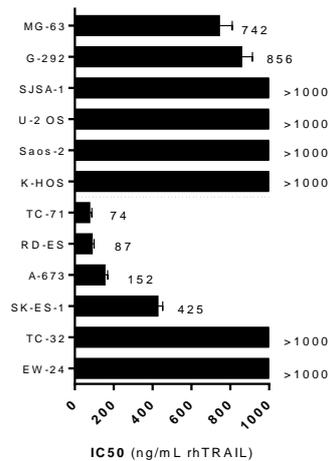


Figure 67 IC50 pour rhTRAIL des 12 lignées étudiées dans l'étude CSM-TRAIL (6 ostéosarcomes en haut ; 6 sarcome d'Ewing en bas) déterminés par test de viabilité après 72h de culture (en ng/mL de rhTRAIL)

Cependant, toutes ces lignées cellulaires sont sensibles à l'apoptose induite par contact direct avec les CSM-TRAIL (FIGURE 68), mais à différents niveaux, indépendamment de leur sensibilité à rhTRAIL. En effet, certaines des lignées de sarcome d'Ewing sensibles à rhTRAIL sont aussi très sensibles aux CSM-TRAIL (TC-71, RD-ES, A-673) mais la lignée EW-24 résistante à rhTRAIL est sensible de la même façon aux CSM-TRAIL.

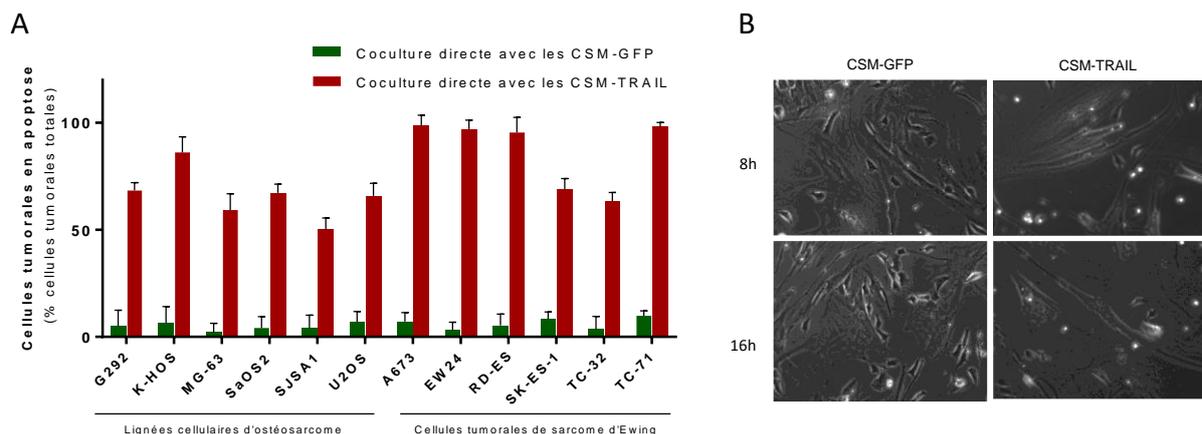


Figure 68 Coculture des cellules tumorales avec les CSM-GFP ou CSM-TRAIL. Apoptose des lignées d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing en coculture avec les CSM-GFP (barres vertes) ou CSM-TRAIL (barres rouges) évaluée par le test Annexine V en cytométrie après 48h de coculture (A). Observation en microscopie des CSM-GFP et CSM-TRAIL en coculture avec des cellules K-HOS résistantes à rhTRAIL (ratio cellules tumorales/CSM de 3:1), à 8h ou 16h après le contact (B).

Les lignées d'ostéosarcome sont globalement moins sensibles au contact direct avec les CSM-TRAIL que celles de sarcome d'Ewing, la lignée MG-63 incluse. La lignée K-HOS est la lignée d'ostéosarcome la plus sensible aux CSM-TRAIL. Cette sensibilité est illustrée en **FIGURE 68 B**, les cellules K-HOS forment des corps apoptotiques et meurent dès huit heures de contact avec les CSM-TRAIL, alors qu'elles continuent leur prolifération au contact des CSM-GFP.

3. La quantité de TRAIL sécrétée par les CSM-TRAIL n'est pas suffisante pour induire l'apoptose des lignées étudiées

Les expérimentations en chambres de Boyden montrent que la quantité de TRAIL sécrétée par les CSM-TRAIL n'est pas suffisante pour réduire la prolifération de toutes les lignées testées (**FIGURE 69**). Les cellules tumorales dans les chambres au dessus des CSM-TRAIL ne voient pas leur prolifération réduite en comparaison avec les CSM-GFP (illustration pour les lignées K-HOS et TC-71). Au contraire, pour certaines lignées, ces très faibles quantités de TRAIL soluble semblent augmenter la prolifération des cellules tumorales. Ces résultats confirment qu'un contact direct entre CSM-TRAIL et cellules tumorales est nécessaire pour induire leur mort cellulaire.

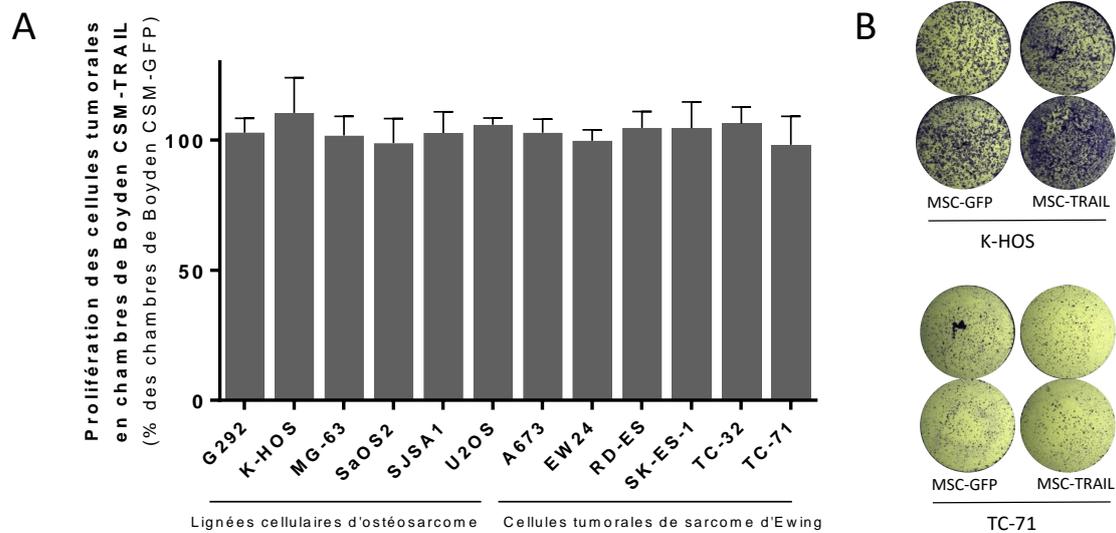


Figure 69 Prolifération des cellules tumorales dans les chambres de Boyden au-dessus de CSM-TRAIL. Après 48h, la prolifération est évaluée par coloration au Crystal Violet et rapportée en pourcentage de la surface totale des chambres de Boyden au-dessus de CSM-GFP (A). Exemple de cellules tumorales K-HOS (haut) et TC-71 (bas) colorées au Crystal Violet dans les chambres de Boyden (B).

4. *In vivo*, la co-injection de CSM-TRAIL avec les cellules de sarcome d'Ewing TC-71 ralentit la progression tumorale

Les cellules TC-71 ayant montré une forte sensibilité à rhTRAIL et aux CSM-TRAIL *in vitro*, nous avons développé un modèle de tumeur en site orthotopique para-tibial induit par ces cellules afin d'analyser l'effet des MSC-TRAIL *in vivo*. Un million de cellules TC-71 seules ou combinées avec un million de CSM-TRAIL ou CSM-GFP sont injectées au jour 0 (J0). Les tumeurs deviennent palpables à J7. Le groupe inoculé avec les CSM-GFP montre la même progression tumorale que le groupe contrôle, alors que le groupe injecté avec les CSM-TRAIL présente un ralentissement significatif de la croissance tumorale de 75% dès J20 (**FIGURE 70 A ET B**). Cependant, toutes les souris du groupe CSM-TRAIL développent des tumeurs, la co-injection de CSM-TRAIL n'est donc pas suffisante pour complètement abolir l'occurrence d'une tumeur. Comme conséquence de ces observations, le taux de survie (déterminé lorsque le volume tumoral atteint 1500 mm³) est significativement plus élevé dans le groupe coinjecté avec les CSM-TRAIL et les cellules de la lignée TC-71 (**FIGURE 70 C**).

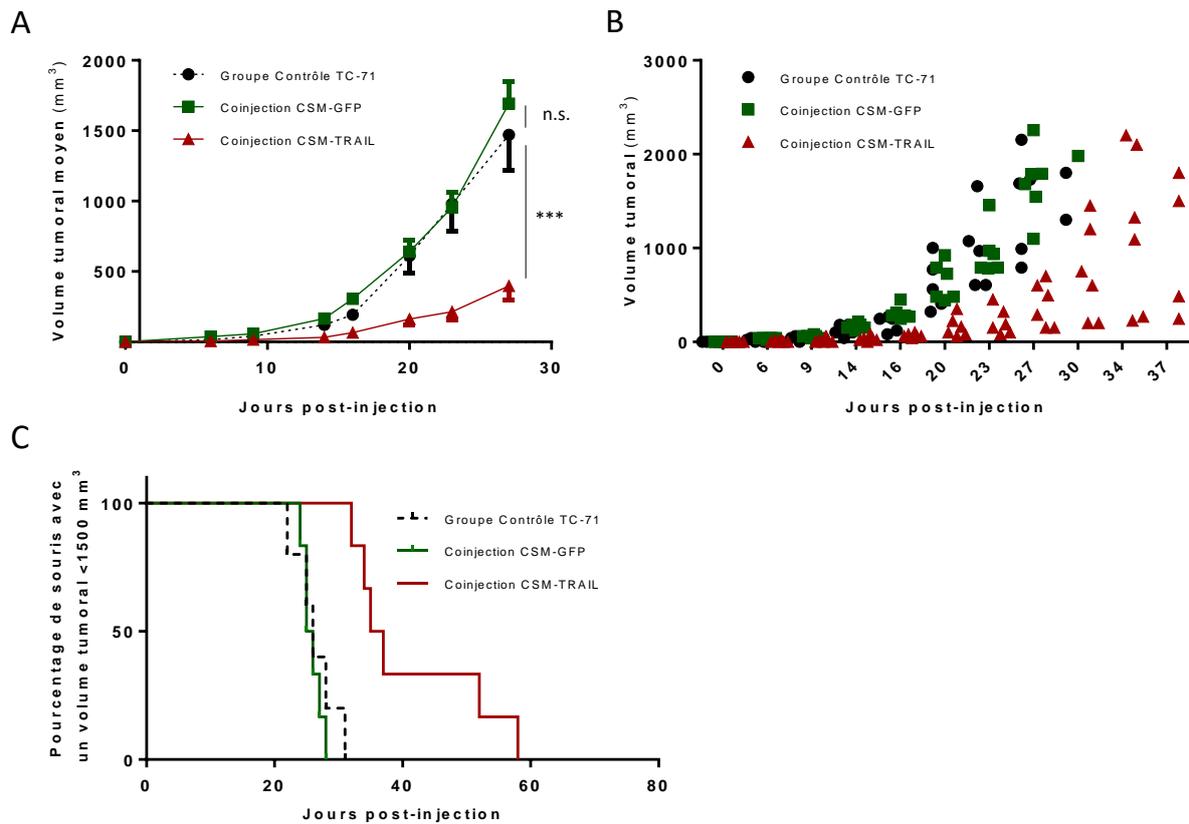


Figure 70 La co-injection de CSM-TRAIL avec les cellules tumorales prévient le développement tumoral et augmente la survie des souris dans le modèle de xénotgreffe orthotopique de sarcome d'Ewing TC-71. Trois groupes de six souris sont injectés avec un million de cellules TC-71 avec ou sans un million de CSM-GFP ou -TRAIL comme décrit dans la section "Matériels et Méthodes". Volume tumoral moyen par groupe (A). Volume tumoral de chaque souris (B). Pourcentage de souris avec un volume tumoral inférieur à 1500mm³ pour les trois groupes (C). (** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$)

5. La co-injection de CSM-GFP et de cellules de sarcome d'Ewing A-673 accélère la progression tumorale *in vivo*, les CSM-TRAIL sont capables de contrecarrer cet effet et de ralentir la progression tumorale.

Un million de cellules humaines de sarcome d'Ewing A-673 seules ou combinées avec un million de CSM-TRAIL ou CSM-GFP sont injectées à J0. Les tumeurs deviennent palpables à J6. Contrairement au modèle TC-71, le groupe co-injecté avec les CSM-GFP montre une accélération significative de la

progression tumorale par rapport au groupe contrôle (**FIGURE 71 A ET B**). Malgré cela, les CSM-TRAIL en co-injection permettent de contrôler la croissance tumorale : jusqu'à J20, les tumeurs sont à peine détectables dans le groupe CSM-TRAIL avec un volume tumoral inférieur à 80 mm³. Pourtant, comme dans le premier modèle, toutes les souris finissent par développer une tumeur après J20. En conséquence, le taux de survie du groupe co-injecté avec les CSM-TRAIL est significativement augmenté (**FIGURE 71 C**).

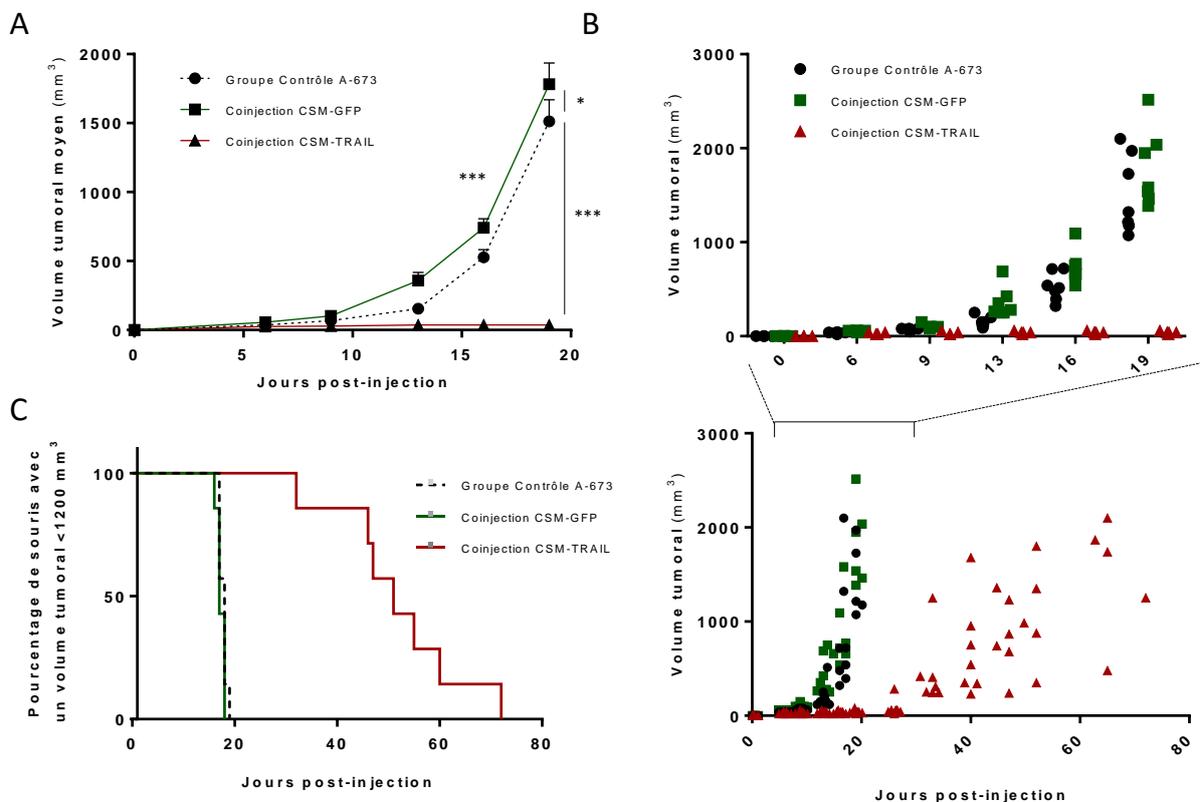


Figure 71 La coinjection de CSM-TRAIL prévient le développement tumoral et augmente la survie des souris dans le modèle de xénogreffe orthotopique de sarcome d'Ewing A-673. Trois groupes de six souris sont injectés avec un million de cellules A-673 avec ou sans un million de CSM-GFP ou -TRAIL comme décrit dans la section "Matériels et Méthodes". Volume tumoral moyen par groupe (A). Volume tumoral de chaque souris sur une période de 20 jours (partie haute) ou de 80 jours (partie basse) (B). Pourcentage de souris avec un volume tumoral inférieur à 1200mm³ pour les trois groupes (C). (** p<0.005 ; *** p<0.001)

Les deux modèles murins de sarcome d'Ewing ne développant pas de métastases, nous ne pouvons donc pas conclure sur l'effet des CSM-TRAIL sur l'occurrence des métastases dans ces modèles.

6. Les CSM-TRAIL induisent l'apoptose des cellules tumorales de sarcome d'Ewing adjacentes

Pour comprendre l'effet des CSM-TRAIL *in situ*, des souris sont injectées avec des cellules A-673 pour développer une tumeur. Quand le volume tumoral atteint 200 mm³, un million de CSM-GFP ou CSM-TRAIL sont injectées en site intratumoral. Les analyses par histo-immunofluorescence révèlent que les CSM-TRAIL injectées sont capables d'induire l'apoptose des cellules de sarcome d'Ewing A-673, ceci étant démontré par la détection de la forme clivée de la caspase-3 (**FIGURE 72 A**). Cet effet reste pour autant local, le marquage de caspase-3 active étant seulement localisé autour des CSM-TRAIL sur une coupe histologique entière (**FIGURE 72 B**). Les CSM-GFP n'induisent pas l'apoptose des cellules tumorales adjacentes.

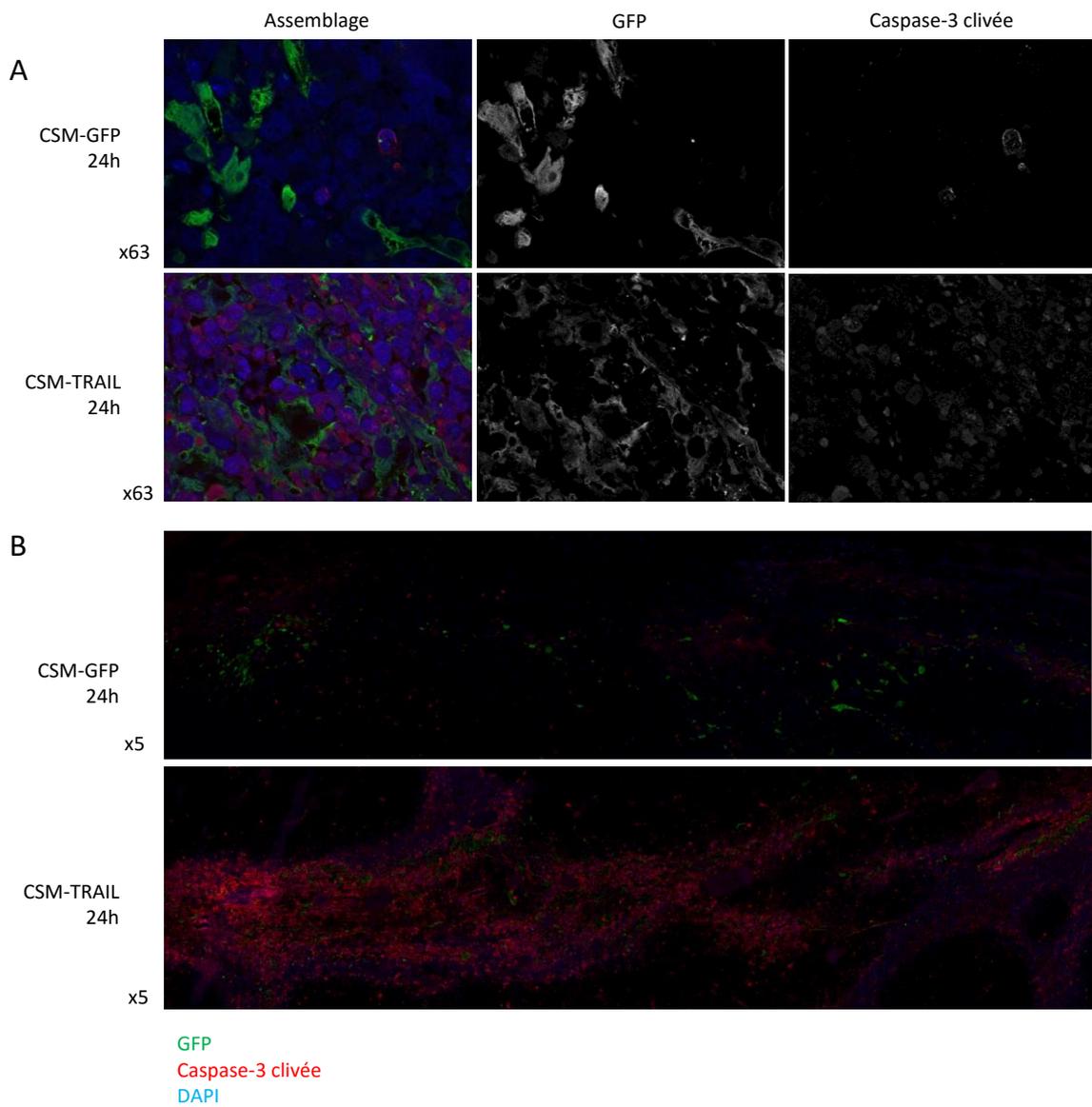


Figure 72 Les CSM-TRAIL induisent l'apoptose des cellules tumorales A-673 adjacentes. Un million de CSM-TRAIL ou CSM-GFP sont injectées dans des tumeurs A-673 établies. Après 24 h, les souris sont sacrifiées et les tumeurs osseuses fixées, incluses en paraffine et une double coloration par immunofluorescence est effectuée pour analyser la présence simultanée de Caspase-3 clivée et de GFP. Observation à l'apoteome grossissement x63 (A) Scan complet au nanozoomer grossissement x5 (B).

7. La co-injection des CSM-GFP dans le modèle d'ostéosarcome K-HOS accélère la progression tumorale, les CSM-TRAIL ne peuvent pas contrecarrer cet effet

Un million de cellules humaines d'ostéosarcome K-HOS seules ou combinées avec un million de CSM-TRAIL ou de CSM-GFP sont injectées à J0. Les tumeurs deviennent palpables à J3. Les deux groupes de sept souris injectées avec des CSM-GFP ou des CSM-TRAIL montrent une accélération significative de la croissance tumorale, respectivement de 100% et 25% plus élevée que le groupe contrôle (**FIGURE 73 A ET B**). Par conséquent, aucun bénéfice des CSM-TRAIL n'est observé sur les taux de survie dans ce modèle (**FIGURE 73 C**). De plus, aucune différence d'occurrence des métastases pulmonaires n'est détectée entre les trois groupes (**FIGURE 73 D**).

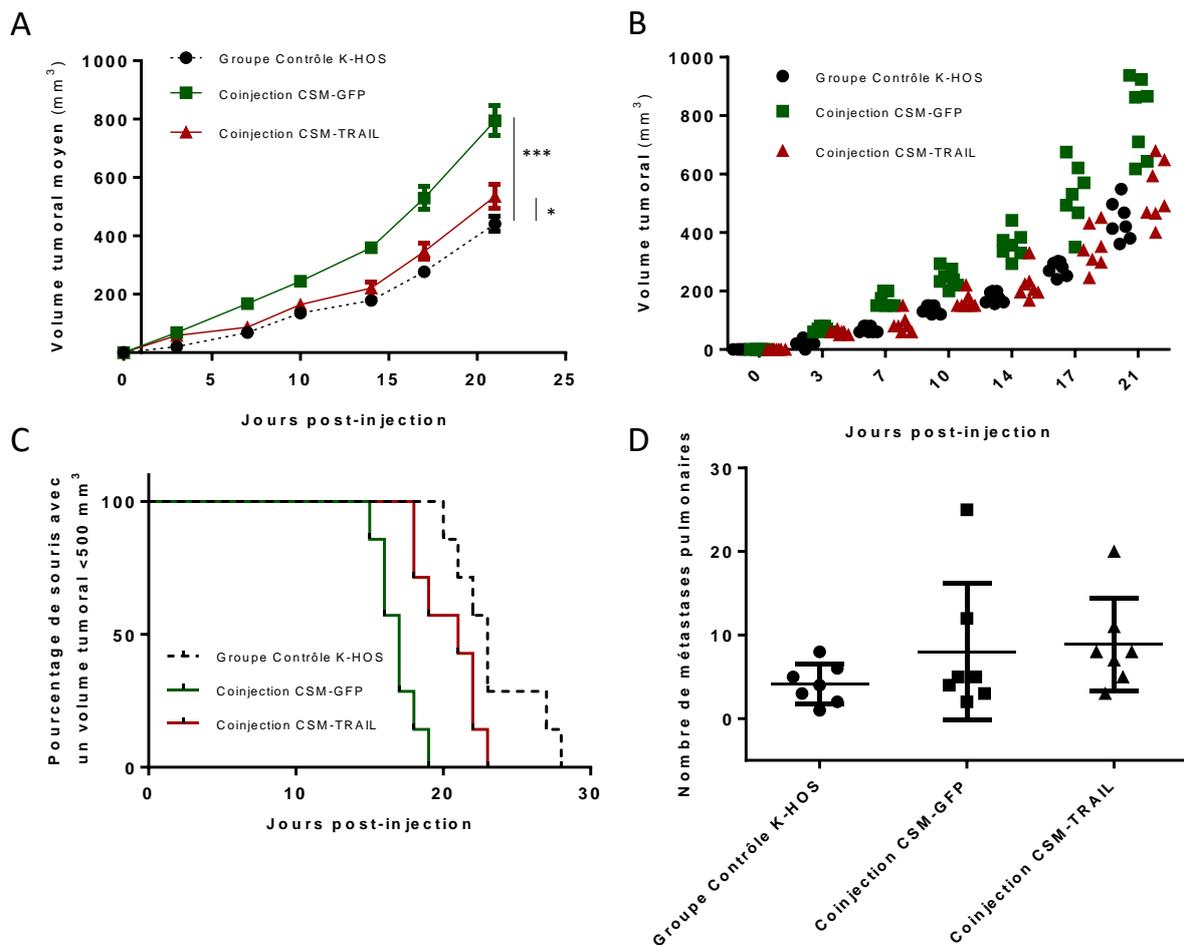


Figure 73 La co-injection de CSM-TRAIL et de CSM-GFP avec les cellules tumorales accélère le développement tumoral et diminue la survie des souris dans le modèle de xénogreffe orthotopique d'ostéosarcome K-HOS. Trois groupes de sept souris sont injectés avec un million de cellules K-HOS avec ou sans un million de CSM-GFP ou -TRAIL comme décrit dans la section "Matériels et Méthodes". Volume tumoral moyen par groupe (A). Volume tumoral de chaque souris (B). Pourcentage de souris avec un volume tumoral inférieur à 500mm³ pour les trois groupes (C). Nombre de métastases pulmonaires visibles à l'œil nu comptées à volume tumoral équivalent (D). (* $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

8. Les CSM-TRAIL n'induisent pas l'apoptose des cellules tumorales d'ostéosarcome adjacentes

Dans le modèle K-HOS, les analyses par histo-immunofluorescence confirment qu'aucune activation de la caspase-3 n'est détectée autour des CSM-TRAIL. Les CSM-GFP n'induisent pas l'apoptose des cellules tumorales adjacentes.

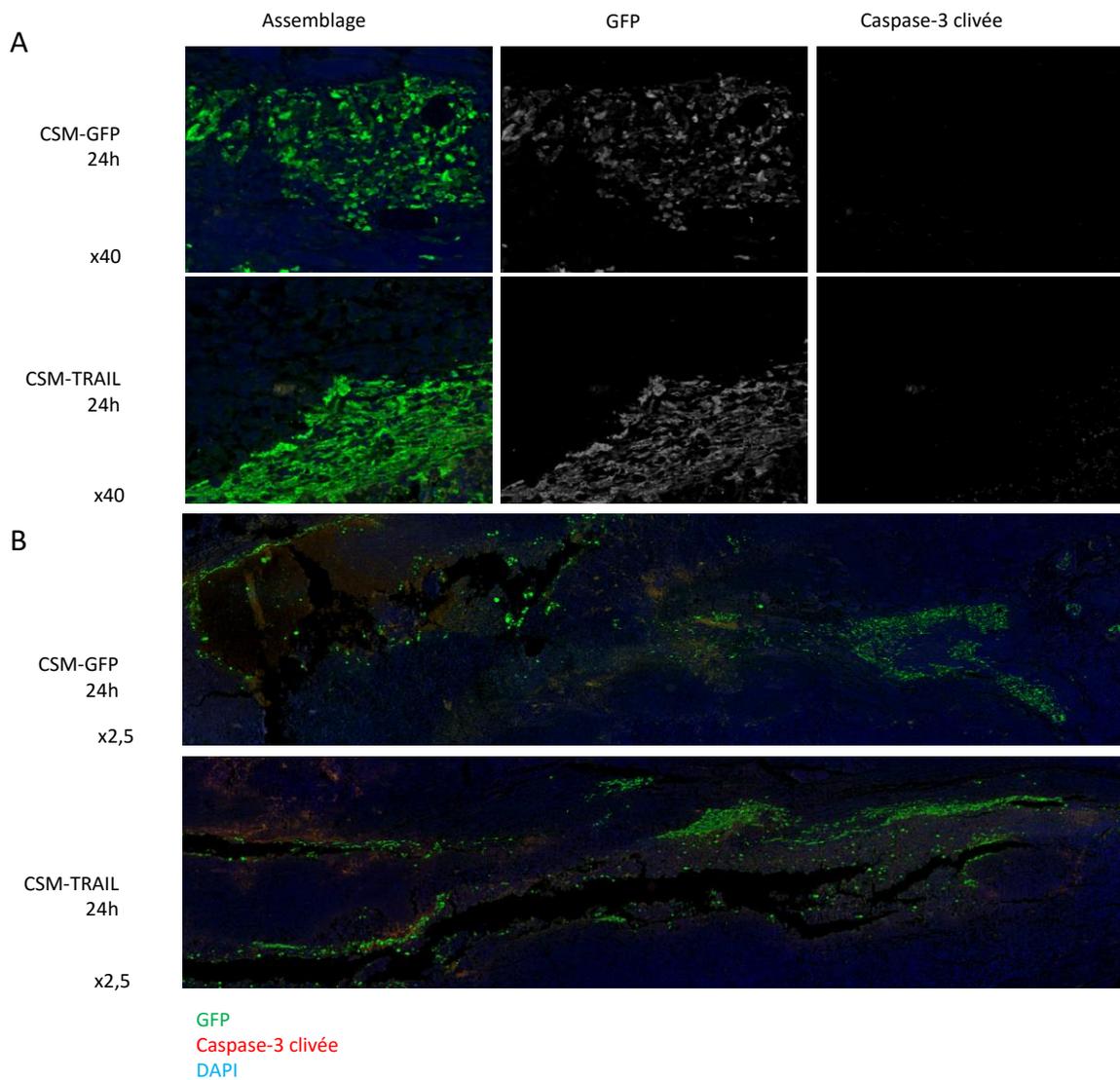


Figure 74 Les CSM-TRAIL n'induisent pas l'apoptose des cellules tumorales K-HOS adjacentes. Un million de CSM-TRAIL ou CSM-GFP sont injectées dans des tumeurs A-673 établies. Après 24 h, les souris sont sacrifiées et les tumeurs osseuses fixées, incluses en paraffine et une double coloration par immunofluorescence est effectuée pour analyser la présence simultanée de Caspase-3 clivée et la GFP. Observation à l'apogée grossissement x40 (A) Scan complet au nanozoomer grossissement x2,5 (B)

III. L'augmentation de la « clusterisation » des récepteurs de TRAIL permet-elle de favoriser la voie pro-apoptotique de TRAIL au lieu de la voie non-canonique ?

La localisation des récepteurs de TRAIL dans la membrane cellulaire semble tenir un rôle important dans la formation du complexe secondaire de signalisation induit par l'activation de ces récepteurs de mort. En particulier, leur localisation dans des radeaux lipidiques paraît être requise pour l'activation de l'apoptose (Song et al., 2007).

Dans ce cadre, la présentation directe de la molécule TRAIL par des CSM transduites semble confirmer qu'une large « clusterisation » des récepteurs de mort permet d'induire l'apoptose des cellules tumorales adjacentes de façon très efficace, même *in vitro* dans des lignées résistantes à TRAIL soluble. Cependant, l'utilisation de ces cellules en clinique a de nombreuses limites, mis à part les problèmes techniques liés à l'amplification et à la transduction de ces cellules souches, étapes qui pourraient être responsable de leur transformation, les CSM par elles-mêmes semblent avoir un potentiel pro-tumoral. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux outils, capables d'induire la « clusterisation » des récepteurs de mort de TRAIL tout en étant neutres dans le microenvironnement tumoral.

Nous nous sommes ainsi intéressés dans nos modèles à l'utilisation d'un multiple agoniste des récepteurs de TRAIL capable de se fixer à six récepteurs par molécule. En effet, cet agoniste est une protéine de fusion humanisée dont la structure se compose d'un assemblage de deux chaînes de

molécules de TRAIL trimérique fusionnées de manière covalente par le fragment cristallisable d'une immunoglobuline G humaine (Gieffers et al., 2013) (**FIGURE 75**).

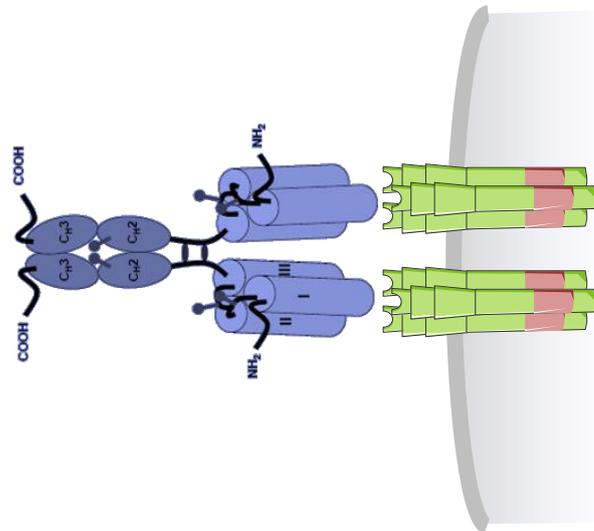


Figure 75 Schéma de la fixation d'une molécule d'APG880 sur six récepteurs de mort de TRAIL. Sa structure se compose d'un assemblage de deux chaînes de molécules de TRAIL trimérique fusionnées de manière covalente par le fragment Fc d'une immunoglobuline G humaine (Apogenix, Allemagne)

La grande capacité de fixation de l'APG880 en fait un candidat idéal pour vérifier que cette « clusterisation » des récepteurs de mort, plus importante que celle induite par la fixation de l'AMG655, permet de contourner l'induction de la voie de signalisation non-apoptotique de TRAIL. L'APG880 pourrait ainsi induire l'apoptose des cellules tumorales sans enclencher une réponse de survie et de prolifération.

L'APG880 et l'AMG655 ont une masse moléculaire très similaire d'environ 150 kDa compte tenu de leur structure comparable composée de deux chaînes d'immunoglobuline humaine. Nous pouvons donc aisément comparer leur efficacité d'action sur nos lignées cellulaires à la même concentration.

1. *In vitro*, l'APG880 induit un effet antiprolifératif supérieur à celui de l'AMG655, même dans la plupart des lignées résistantes

Les mêmes lignées modèles de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome utilisées dans la première partie le sont également pour cette étude. Les cellules sont cultivées en présence de concentrations croissantes des deux agonistes des récepteurs de mort AMG655 ou APG880, un test de prolifération à 72h permet de déterminer l'IC50 de chaque lignées modèle pour chaque agoniste (**FIGURE 76**).

Les lignées sensibles à l'AMG655 (TC-71 et MG-63) présentent une IC50 pour l'APG880 très inférieure, témoignant de la plus grande efficacité de ce multiple agoniste à induire un ralentissement de la prolifération cellulaire. Les lignées résistantes à l'AMG655 (TC-32 et K-HOS) sont sensibles à l'APG880 avec des IC50 inférieures à 100ng/mL. L'APG880 semble donc être un candidat prometteur dans la thérapie des tumeurs osseuses pédiatriques, en augmentant la sensibilité de lignées initialement déjà sensibles ou résistantes.

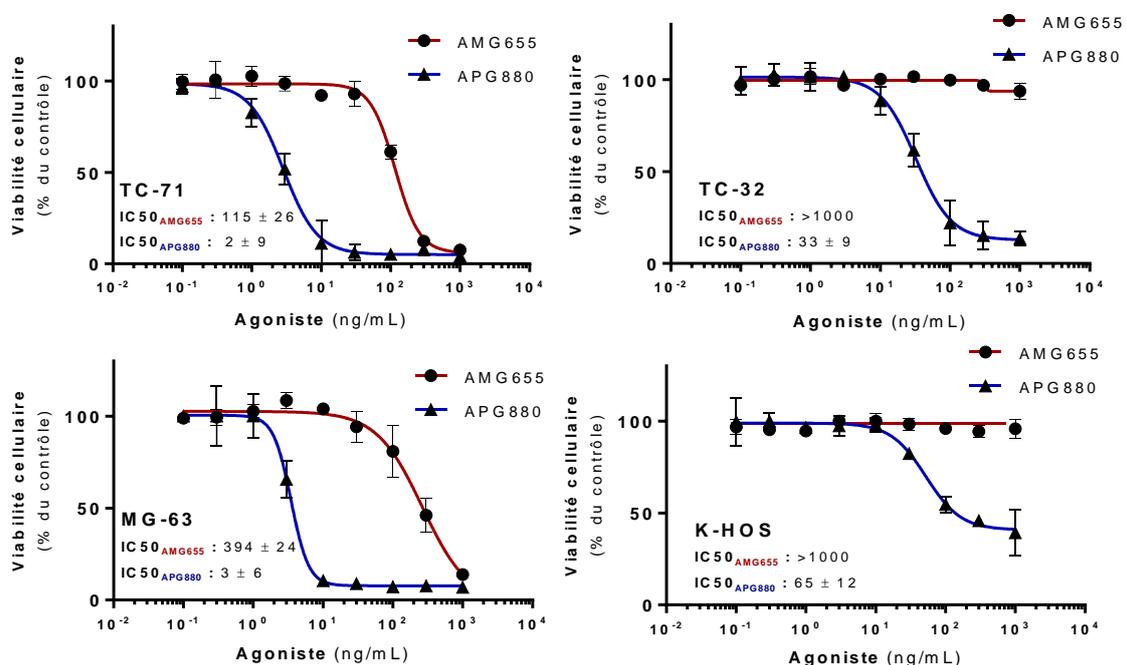


Figure 76 Effets comparatifs de l'AMG655 et de l'APG880 dans les lignées modèles. Les cellules sont cultivées 72h en présence de concentrations croissantes d'agonistes des récepteurs de TRAIL AMG655 (en rouge) et APG880 (en bleu). Un test de prolifération permet de déterminer l'IC50 des lignées pour chaque agoniste.

Cependant, toutes les lignées d'ostéosarcome résistantes à l'AMG655 ne sont pas sensibles à l'effet antiprolifératif de l'APG880. C'est le cas de la lignée G-292 qui présente une résistance aux deux agonistes (**FIGURE 77**). Une « clusterisation » plus importante des récepteurs de mort par l'APG880 n'est donc pas suffisante pour induire l'apoptose dans cette lignée.

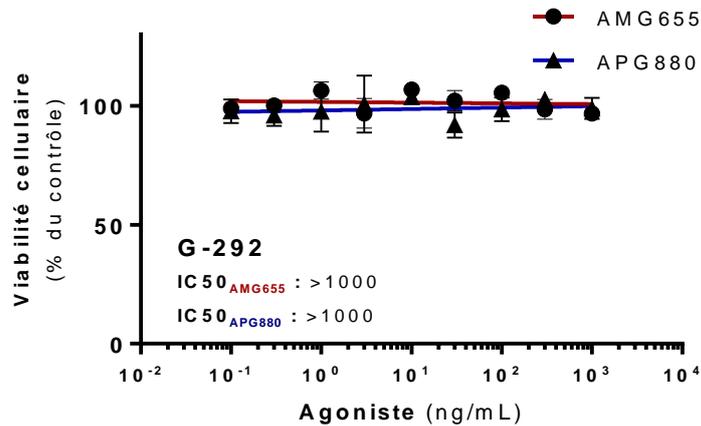


Figure 77 La lignée G-292 est résistante à l'AMG655 et à l'APG880. Les cellules G-292 sont cultivées en présence de concentrations croissantes d'agonistes des récepteurs de TRAIL AMG655 (en rouge) et APG880 (en bleu) Un test de prolifération permet de déterminer l'IC₅₀ pour chaque agoniste.

2. L'APG880 induit une activation plus élevée et plus précoce de la voie de signalisation non-apoptotique de TRAIL dans la lignée K-HOS

Afin de vérifier si la forte « clusterisation » des récepteurs de mort induite par l'APG880 permet d'abolir l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL, l'état de phosphorylation de la kinase Akt et du facteur de transcription NF- κ B est analysé par Western-Blot suite à un traitement de 500ng/mL d'AMG655 ou d'APG880 (**FIGURE 78**).

De façon surprenante, nous montrons que la forte « clusterisation » des récepteurs de mort par l'APG880 active de façon plus importante et plus précocement que l'AMG655 la phosphorylation d'Akt avec un pic d'activation à 15 minutes. Cette activation semble diminuer ensuite au cours du temps mais reste supérieure à celle induite par l'AMG655 après une heure de traitement.

De la même façon, l'activation de NF- κ B est détectable plus tôt après traitement à l'APG880. Après une heure de traitement, l'activation de NF- κ B est plus importante dans les cellules traitées à l'APG880 que dans celles traitées à l'AMG655.

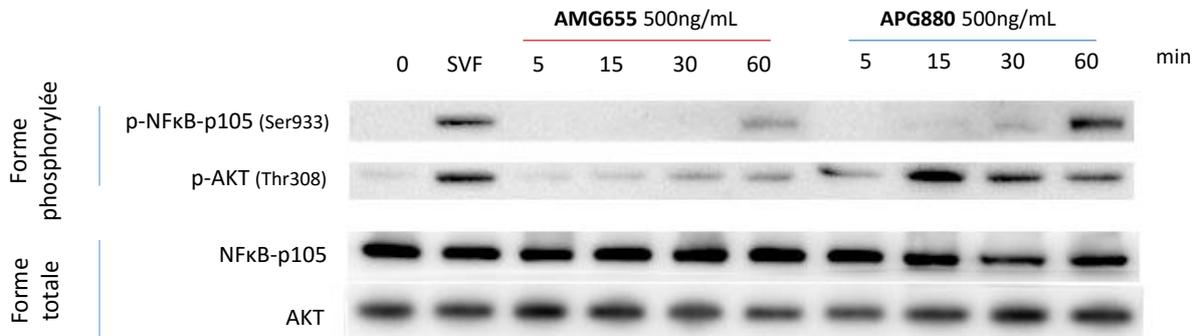


Figure 78 Activation de la voie non-apoptotique dans la lignée K-HOS après traitement à l'AMG655 et à l'APG880 révélée par Western Blot. Les cellules sont déprivées de SVF pendant 16h. Elles sont ensuite traitées avec 500ng/mL d'AMG655 ou d'APG880 pendant 0 ; 5 ; 15 ; 30 ou 60 minutes. Le SVF 5% est utilisé comme contrôle positif de l'activation des voies de survie/prolifération. La totalité des protéines est extraite en présence d'inhibiteurs de kinases/phosphatases pour préserver les phosphorylations. La révélation des formes totales des protéines est utilisée comme contrôle de chargement.

L'effet antiprolifératif de l'APG880 observé précédemment est donc associé à une forte induction de la voie non-apoptotique.

IV. Le ciblage du microenvironnement tumoral osseux comme piste de sensibilisation à TRAIL : l'exemple de l'acide zolédronique

Nous l'avons montré dans la première partie, le microenvironnement osseux est une niche pour la résistance à TRAIL, notamment à cause de l'acidification du milieu extracellulaire par les ostéoclastes activés. Il est alors possible d'imaginer qu'un agent thérapeutique capable de réduire l'activité de ces ostéoclastes pourrait lever en partie cette résistance à TRAIL. De plus, le cercle vicieux qui s'établit entre ostéolyse et prolifération tumorale serait également ciblé sur ces deux protagonistes : un agent ciblant les ostéoclastes et TRAIL ciblant les cellules tumorales.

Les bisphosphonates, connus pour leur action inhibitrice de la résorption osseuse et utilisés comme traitement de l'ostéoporose, représentent l'une des approches envisagées dans le traitement des tumeurs osseuses primitives (Moriceau et al., 2010a). L'acide zolédronique est un bisphosphonate de troisième génération présentant un fort potentiel inhibiteur de la résorption osseuse et un fort tropisme pour la matrice osseuse. Il interfère dans la voie du mévalonate en inhibant entre autre la farnesyl diphosphate synthase nécessaire à la prénylation des GTPases comme Rho et Ras, ce qui conduit à l'induction de l'apoptose des ostéoclastes et il est également capable d'inhiber l'expression de RANKL (Gaspar et al., 2012). Dans les études à long terme menées chez l'animal, l'acide zolédronique inhibe la résorption osseuse sans effet défavorable sur la formation, la minéralisation ou les propriétés mécaniques de l'os.

D'autre part, une étude publiée en 2011 a déterminé que les cellules MG-63 d'ostéosarcome humain résistantes à TRAIL pouvaient être sensibilisées par un prétraitement avec des bisphosphonates (Moon et al., 2011). Le mécanisme proposé par les auteurs pour expliquer cette sensibilisation est l'augmentation de l'expression transcriptionnelle et traductionnelle de DR5.

L'acide zolédronique semble donc être un bon candidat pour la recherche d'un agent ciblant le microenvironnement osseux tout en sensibilisant les cellules tumorales à l'apoptose induite par des agonistes des récepteurs de mort de TRAIL.

1. *In vitro*, l'acide zolédronique sensibilise les cellules K-HOS à l'AMG655

La première étape de cette étude sur l'impact d'un ciblage double du microenvironnement et des cellules tumorales par l'acide zolédronique et l'AMG655 consiste à identifier *in vitro* les effets de ces deux agents sur les cellules tumorales.

a. *L'acide zolédronique à hautes doses inhibe la prolifération des cellules K-HOS*

Il a été démontré que l'acide zolédronique pouvait avoir un rôle anti-tumoral propre. En effet, il semble induire un blocage du cycle des cellules d'ostéosarcome en phase S et induit l'apoptose des cellules tumorales à très fortes doses (Heymann et al., 2005; Kubista et al., 2006). Afin de vérifier cet effet sur la lignée K-HOS, les cellules sont cultivées en présence de concentrations croissantes d'acide zolédronique, et après 72h, la prolifération cellulaire est évaluée (**FIGURE 79**). On retrouve cet effet antiprolifératif de l'acide zolédronique décrit dans la littérature pour des doses élevées. Cependant, pour des concentrations inférieures ou égales à 10 μ M, l'acide zolédronique ne modifie pas la prolifération des cellules K-HOS.

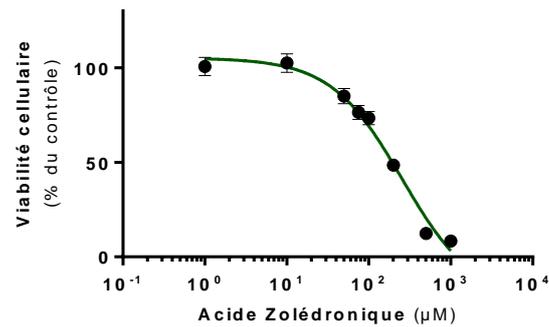


Figure 79 Effet de l'acide zolédronique sur la prolifération des cellules K-HOS. Les cellules K-HOS sont cultivées en présence de concentrations croissantes d'acide zolédronique, un test de viabilité est réalisé au bout de 72h.

b. L'acide zolédronique agit de façon synergique avec l'AMG655 sur la prolifération des cellules K-HOS

Les cellules K-HOS sont donc prétraitées pendant 24h avec 10μM d'acide zolédronique, dose qui n'entraîne pas de diminution de la prolifération cellulaire, puis cultivées en présence de concentrations croissantes d'AMG655 pendant 72h, tout en maintenant le traitement à l'acide zolédronique. Ce prétraitement permet de sensibiliser les cellules K-HOS à l'AMG655 (**FIGURE 80 GAUCHE**). Afin de déterminer s'il existe une synergie dans les effets de l'AMG655 et ceux de l'acide zolédronique, la méthode du calcul l'index de combinaison (Combinaison Index - CI) de Chou et Talalay est utilisée (Chou, 2010). Les cellules K-HOS sont traitées avec l'AMG655 et l'acide zolédronique d'abord séparément puis en combinaison suivant un ratio de concentrations constant. Le graphe dit de Chou-Talalay ($CI=f(Fa)$), tracé à l'aide du logiciel CompuSyn, permet de déterminer si les effets de ces deux agents sont synergiques ou simplement additifs. Le résultat est visuel sur le graphe, si la simulation informatique de combinaison suit la droite de $CI=1$, les effets des deux agents sont simplement additifs, si elle se trouve en dessous, leurs effets sont synergiques (**FIGURE 80 DROITE**). Le graphe $CI=f(Fa)$ pour la combinaison de l'AMG655 et de l'acide zolédronique permet de déterminer que ces deux agents agissent de façon synergique.

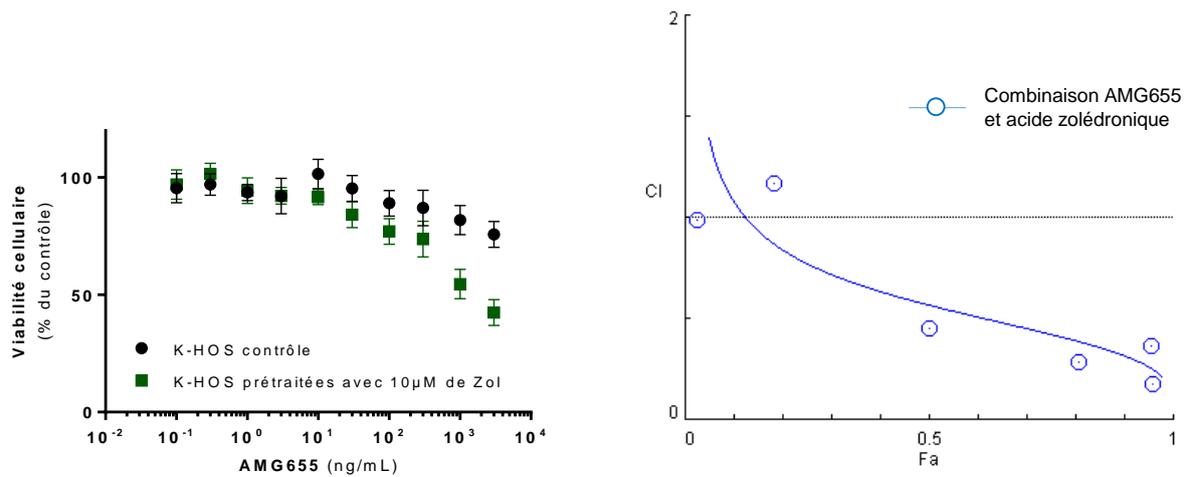


Figure 80 L'acide zolédronique (zol) sensibilise les cellules K-HOS à l'AMG65. Un prétraitement de 24h avec de l'acide zolédronique 10µM permet de les sensibiliser à l'AMG655 (à gauche). Le graphe de Chou-Talalay $CI=f(Fa)$ permet de déterminer que la combinaison AMG655 et acide zolédronique est synergique.

c. L'acide zolédronique inhibe l'expression des protéines c-IAP1 et c-IAP2 dans la lignée K-HOS

Afin d'expliquer cet effet synergique de l'AMG655 et de l'acide zolédronique, les cellules K-HOS sont prétraitées avec 10µM d'acide zolédronique pendant 24h et l'expression transcriptionnelle d'acteurs de la voie apoptotique de TRAIL est analysée par RT-qPCR (**FIGURE 81 GAUCHE**). Contrairement aux travaux de l'équipe de Moon et coll. sur la lignée MG-63 (Moon et al., 2011), nous ne constatons pas d'augmentation de l'expression des récepteurs de mort de TRAIL suite à un prétraitement par l'acide zolédronique. Par contre, l'expression transcriptionnelle des inhibiteurs de l'apoptose c-IAP1 et c-IAP2 est fortement diminuée suite à un prétraitement par l'acide zolédronique. Cette inhibition de l'expression de c-IAP1/2 par l'acide zolédronique est confirmée au niveau protéique par Western Blot (**FIGURE 81 DROITE**). Cette diminution de l'expression d'inhibiteurs de l'apoptose par l'acide zolédronique pourrait expliquer son effet synergique avec l'AMG655.

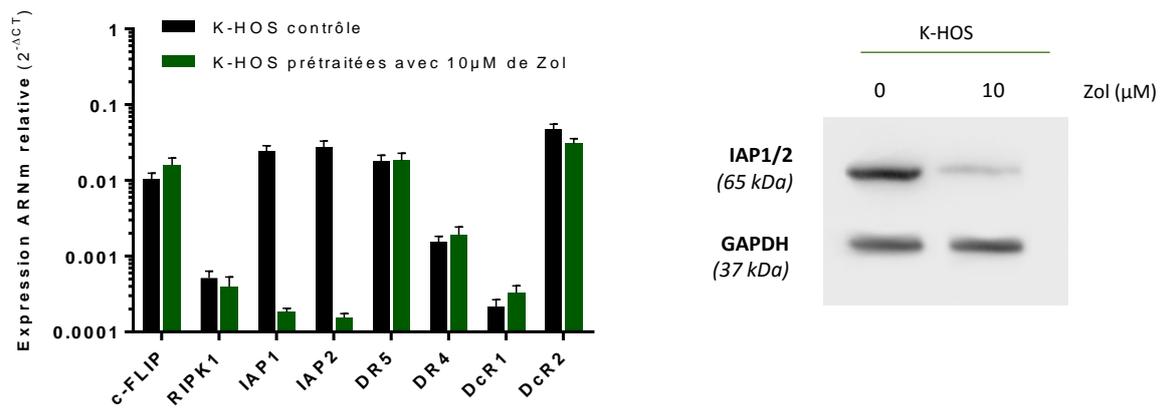


Figure 81 L'acide zolédronique inhibe l'expression des protéines IAP1 et IAP2 dans la lignée K-HOS. Les cellules K-HOS sont traitées avec 0 ou 10µM d'acide zolédronique pendant 24h, l'ARNm est extrait et une RT-qPCR est réalisée pour analyser l'expression de différents acteurs de la voie apoptotique de TRAIL (gènes de référence GAPDH et β2-microglobuline) (gauche). Les protéines totales sont également extraites et un Western Blot est réalisé pour évaluer l'expression de IAP1/2 (protéine de référence : GAPDH) (droite).

2. *In vivo*, l'acide zolédronique permet de s'opposer à l'effet pro-tumoral de l'AMG655 mais ne sensibilise pas à l'effet pro-apoptotique.

Ces expérimentations *in vitro* permettent d'envisager le passage à un modèle *in vivo* d'ostéosarcome induit par les cellules de la lignée K-HOS. Quatre groupes de huit souris sont injectés avec un million de cellules K-HOS comme décrit dans la section "Matériels et Méthodes". Un groupe est injecté deux fois par semaine avec du NaCl 0,9% (Groupe Contrôle), le second avec 2mg/kg d'AMG655, un autre avec 100µg/kg d'acide zolédronique, le dernier groupe reçoit la combinaison des deux agents.

L'AMG655 seul augmente significativement le volume tumoral (**FIGURE 82 HAUT**) comme décrit précédemment. L'acide zolédronique utilisé seul à la concentration de 100µg/kg ne réduit que légèrement le développement tumoral, de façon non significative par rapport au groupe contrôle. La combinaison de l'AMG655 avec l'acide zolédronique permet d'inhiber l'effet pro-tumoral de l'AMG655 seul mais ne permet pas de sensibiliser la tumeur à son effet proapoptotique, le volume tumoral moyen du groupe injecté avec la combinaison est comparable à celui du groupe contrôle.

Le nombre de métastases pulmonaires retrouvées à l'euthanasie des animaux n'est pas significativement différent entre les quatre groupes (**FIGURE 82 BAS**).

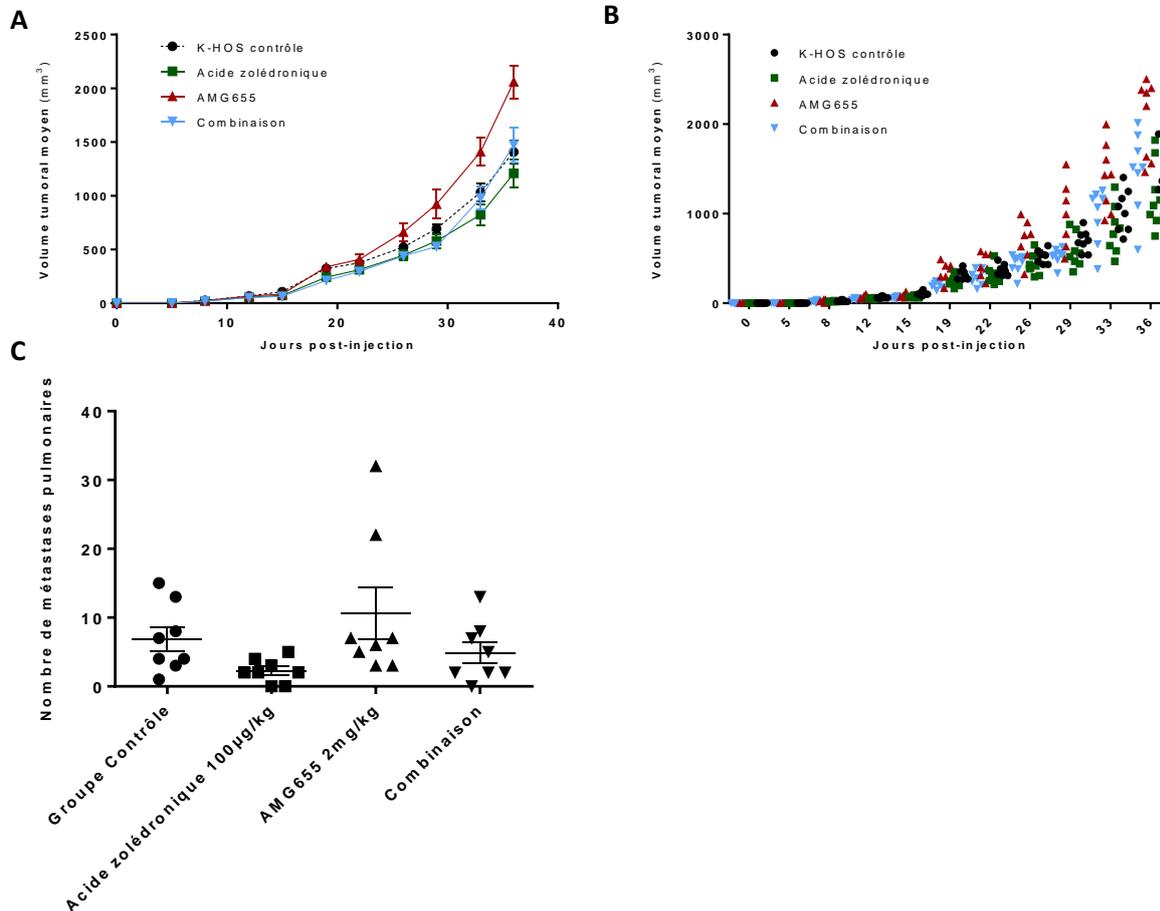


Figure 82. L'acide zolédronique permet de contrecarrer l'effet pro-tumoral de l'AMG655 dans le modèle in vivo K-HOS mais ne sensibilise pas à l'effet pro-apoptotique. Quatre groupes de huit souris sont injectés avec un million de cellules K-HOS comme décrit dans la section "Matériels et Méthodes". Un groupe est injecté deux fois par semaine avec 2mg/kg d'AMG655, un autre avec 100µg/kg d'acide zolédronique, le dernier groupe reçoit la combinaison des deux agents. Volume tumoral moyen par groupe (A). Volume tumoral de chaque souris (B). Nombre de métastases pulmonaires retrouvées à l'euthanasie pour un volume tumoral équivalent (C).

L'acide zolédronique peut être utilisé dans les tumeurs osseuses pédiatriques pour son effet antirésorptif qui préserve l'architecture osseuse de l'ostéolyse induite par la tumeur. Afin de vérifier cette propriété de l'acide zolédronique en présence d'AMG655, la microarchitecture osseuse des tibias portant la tumeur de trois souris de chaque groupe est analysée par microtomographie (**FIGURE 83**).

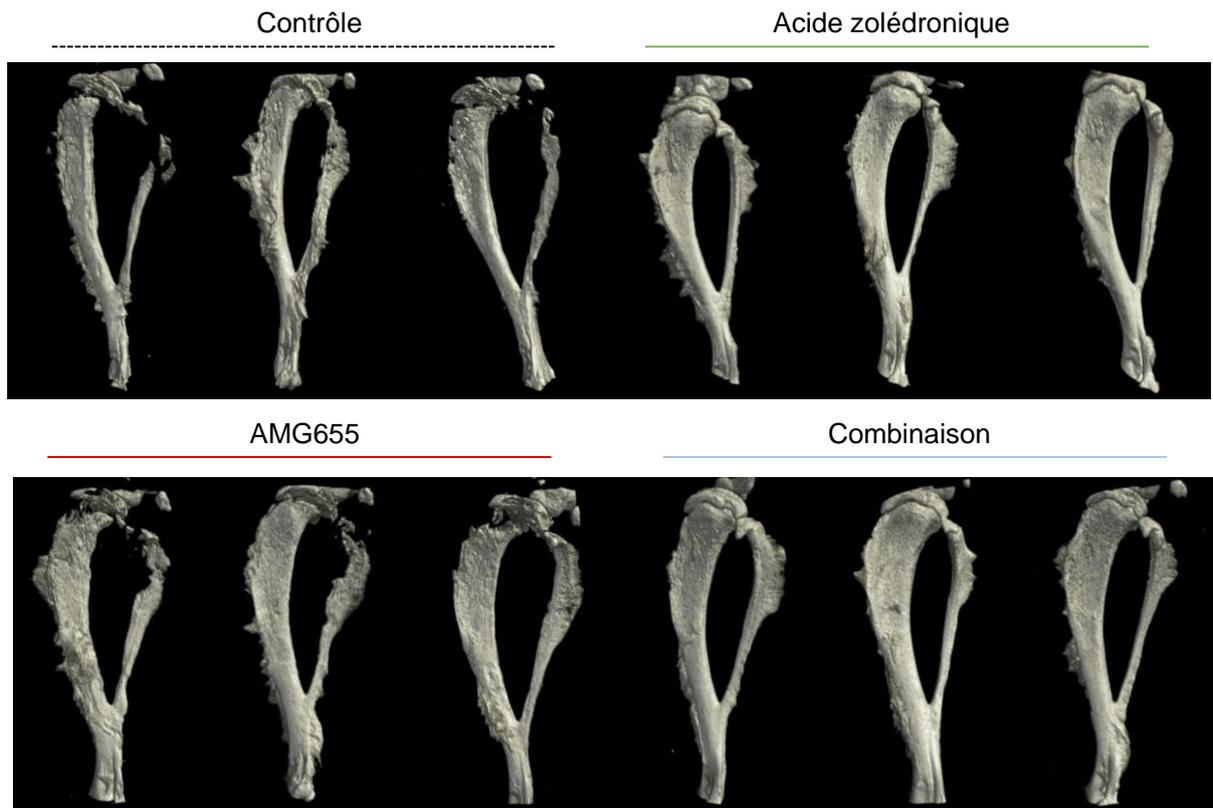


Figure 83 Etude de la microarchitecture osseuse par microtomographie permettant la reconstruction de l'os en 3 dimensions. Les pattes portant la tumeur de 3 souris par groupe sont récupérées à un volume équivalent de 1500mm³. L'acquisition de chaque patte est réalisée grâce au microscanner Skyscan 1076 et à son logiciel Skyscan software. Le logiciel NRecon permet de convertir les images obtenues afin de les analyser grâce aux logiciels CTVol et CTVox.

L'acide zolédronique préserve le tibia et le péroné des souris de l'ostéolyse induite par la tumeur. Cette préservation est conservée en cas de traitement par sa combinaison avec l'AMG655.

Conclusions de la seconde partie

Les résultats présentés dans la première partie de cette étude ont semblé montrer que la résistance des tumeurs osseuses pédiatriques à l'effet pro-apoptotique de TRAIL ou d'un des agonistes activateurs de ses récepteurs de mort est un processus complexe qui met en œuvre de nombreux acteurs, tant des inhibiteurs de la voie apoptotique que des activateurs de la voie non-apoptotique. L'enjeu de trouver des méthodes de sensibilisation est une étape indispensable avant d'envisager une utilisation clinique de thérapies ciblant la voie apoptotique de TRAIL. Dans cette seconde partie, nous avons expérimenté trois types de méthodes bien distinctes de sensibilisation :

- Une méthode agissant sur les cellules tumorales elles-mêmes pour tenter de modifier la signalisation intracellulaire après l'activation des récepteurs de mort,
- Une méthode modifiant le mode de présentation de TRAIL aux cellules. Que ce soit par l'utilisation de cellules vecteurs de TRAIL ou d'un agoniste multiple des récepteurs de mort, le but est d'induire une « clusterisation » de ces récepteurs à membrane pour privilégier la voie apoptotique,
- Une méthode agissant sur le microenvironnement tumoral osseux qui semble être une niche pour la résistance à TRAIL.

- **L'inhibition de la formation du complexe secondaire de signalisation de TRAIL, une piste pour la sensibilisation de cellules résistantes**

Le ciblage de RIPK1 comme facteur clef de la formation du complexe de signalisation secondaire a permis de sensibiliser le modèle *in vivo* d'ostéosarcome K-HOS. Cette preuve de concept par l'utilisation de shRNA confirme d'une part que la voie non-apoptotique de TRAIL joue un rôle important dans la résistance de ce modèle à l'agoniste de DR5 AMG655. Elle ouvre d'autre part la voie à de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'activité kinase de RIPK1 est inhibée par la Necrostatine-1 (Degterev et al., 2008; Takahashi et al., 2012). Ce composé ayant déjà montré qu'il pouvait inhiber la nécroptose induite par TRAIL à pH acide dans des lignées de cancers du foie et du colon (Jouan-Lanhouet et al., 2012), il serait intéressant de déterminer s'il est capable d'inhiber l'activité du complexe secondaire de signalisation de TRAIL. Cette voie de ciblage reste cependant très hypothétique car dans le cas de la voie non-apoptotique de TRAIL, RIPK1 semble impliqué comme protéine d'échafaudage et son activité kinase ne semble pas impliquée. Des expérimentations sont en cours pour affirmer ou infirmer cette hypothèse.

Cependant, il ne faut pas négliger que RIPK1 intervient dans de très nombreuses voies de signalisation et que son inactivation systémique pourrait entre autres inhiber l'apoptose induite par le TNF- α par l'implication de RIPK dans le complexe pro-apoptotique cytoplasmique.

Si c'est bien la localisation des récepteurs de mort dans les radeaux lipidiques qui favorise la voie apoptotique de TRAIL, il semble donc plus spécifique d'agir à ce niveau de régulation. Nous faisons ainsi l'hypothèse qu'une forte clusterisation des récepteurs pourrait favoriser cette localisation.

- **La clusterisation des récepteurs de morts, nouvel objectif des thérapies basées sur la voie de TRAIL ?**

Le premier moyen utilisé dans cette étude pour induire une clusterisation des récepteurs de mort de TRAIL repose sur des cellules souches mésenchymateuses modifiées pour exprimer TRAIL à leur

surface. Une étude antérieure a démontré que ces cellules pouvaient induire l'apoptose par l'activation de la caspase-8 de trois lignées cellulaires de sarcomes pédiatriques (Saos-2: ostéosarcome, RDS: rhabdomyosarcome, et RD-ES: sarcome d'Ewing), ouvrant ainsi la voie à des thérapies basées sur des CSM-TRAIL dans ces pathologies (Grisendi et al., 2015).

Nous avons montré dans cette étude que les CSM-TRAIL sont en effet capables d'induire l'apoptose dans un large panel de lignées cellulaires d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing *in vitro* par la voie apoptotique. En effet, toutes les lignées testées sont sensibles à l'apoptose induite par les CSM-TRAIL, prouvant que la voie de signalisation d'apoptose extrinsèque est bien fonctionnelle dans toutes ces lignées cellulaires. Or, certaines de ces lignées sont résistantes à TRAIL recombinant, même à des concentrations relativement élevées. Pour expliquer ce paradoxe, nous suggérons que les CSM-TRAIL sont capables d'induire une forte clusterisation des récepteurs de mort à la surface des cellules tumorales, multipliant d'une part l'activation de la caspase-8 en aval et limitant d'autre part la formation du complexe secondaire de signalisation. Le fait que seul un contact direct entre les cellules tumorales et les CSM-TRAIL, *in vitro* et *in vivo*, permette d'induire l'apoptose des cellules tumorales soutient l'hypothèse qu'une clusterisation élevée des récepteurs de mort est nécessaire à l'induction de l'apoptose par la formation du complexe DISC.

Il avait également été montré que les CSM-TRAIL exerçaient une activité anti tumorale dans un modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules RD-ES de sarcome d'Ewing. Cependant, dans ces pathologies étroitement liées au microenvironnement osseux, nous avons préféré utiliser des modèles orthotopiques plus pertinents pour tenir compte de l'environnement particulier de la tumeur. Bien que la progression du sarcome d'Ewing puisse être ralentie par les CSM-TRAIL dans les modèles précliniques correspondants, le modèle d'ostéosarcome K-HOS montre toujours une résistance *in vivo*, même si un effet pro-apoptotique est observé en co-culture *in vitro*. Pour expliquer cet écart, nous pouvons formuler l'hypothèse selon laquelle le microenvironnement osseux tumoral de l'ostéosarcome pourrait fournir une niche favorable à la résistance à TRAIL, due à l'hypoxie ou au pH extracellulaire acide.

Autant dans le modèle A-673 de sarcome d'Ewing que K-HOS d'ostéosarcome, les CSM-GFP augmentent significativement la progression tumorale. Plusieurs études ont déjà rapporté un effet promoteur des CSM sur la croissance de la tumeur, en particulier par l'augmentation de l'angiogenèse et la libération de chémokines. Cet effet a notamment été observé dans un modèle syngénique d'ostéosarcome chez la souris (Perrot et al., 2010) et peut être un obstacle à l'utilisation de CSM

comme outils thérapeutiques dans les tumeurs osseuses. Cependant, d'autres publications suggèrent au contraire que les CSM pourraient inhiber la croissance tumorale en particulier en inhibant la voie de signalisation Wnt (Qiao et al., 2008a, 2008b; Zhu et al., 2009). Ce sujet reste controversé dans la littérature (Klopp et al., 2011). Comprendre les conditions dans lesquelles les CSM accélèrent la croissance de la tumeur est crucial afin de développer en toute sécurité des CSM comme outils thérapeutiques. En outre, le microenvironnement fortement inflammatoire des tumeurs osseuses pédiatriques peut également jouer un rôle dans une potentielle transformation maligne des cellules souches mésenchymateuses injectées. En effet, il a été récemment montré que l'IFN- γ et le TNF- α induisent de manière synergique une altération des cellules souches mésenchymateuses conduisant à la tumorigenèse (Wang et al., 2013). Cette transformation des CSM pourrait alors agir comme un soutien de la croissance tumorale. Dans les modèles de xénogreffes sous-cutanées de cellules de sarcome d'Ewing, les CSM ne montrent pas d'effet protumoral (Grisendi et al., 2015), ce constat semble indiquer que le microenvironnement de chaque type de tumeur est responsable de l'existence ou non d'un potentiel pro-tumoral.

Il a enfin été montré que les CSM exprimant TRAIL étaient capables de réduire l'incidence des métastases pulmonaires dans plusieurs modèles de cancers (Loebinger et al., 2009). Toutefois, cet effet n'a pas été observé dans le modèle d'ostéosarcome K-HOS utilisé dans cette étude. Concernant les modèles murins de sarcome d'Ewing, ils sont trop agressifs avec une progression rapide qui ne laisse pas suffisamment de temps pour développer des métastases spontanées de sorte que nous ne pouvons pas conclure sur l'effet des CSM-TRAIL sur la survenue de métastases dans ces modèles.

En conclusion, nous avons démontré une efficacité thérapeutique limitée des CSM-TRAIL dans plusieurs modèles de tumeurs osseuses pédiatriques. Bien que des résultats prometteurs aient été obtenus dans les modèles de sarcome d'Ewing co-injectés avec les CSM-TRAIL, l'ostéosarcome reste résistant *in vivo* aux cellules présentant TRAIL. Parce que les CSM semblent exercer par elles-mêmes un potentiel pro-tumoral dans nos conditions, l'expression de TRAIL ne peut pas contrebalancer cet effet dans le modèle K-HOS. Il faut donc être extrêmement prudent quant à l'utilisation de ces CSM en clinique. Cependant, même si elle n'aboutit pas à une utilisation clinique, l'utilisation de CSM-TRAIL tend à révéler qu'une forte clusterisation des récepteurs de mort serait capable d'induire l'apoptose *in vitro* de lignées cellulaires initialement résistantes à rhTRAIL. Les résultats présentés dans cette étude sur les CSM-TRAIL feront l'objet de deux publications en cours de soumission, dans les modèles de sarcome d'Ewing d'une part et dans les modèles d'ostéosarcome d'autre part. Cette stratégie de

clusterisation est très prometteuse et doit être menée avec des vecteurs plus neutres, tels que les nouveaux agonistes multiples des récepteurs de mort de TRAIL capables de se lier à six récepteurs.

L'APG880 a ainsi montré *in vitro* dans nos modèles sa capacité antiproliférative plus importante que l'agoniste AMG655, et ce même dans certaines lignées résistantes à l'AMG655. Cependant, nous montrons aussi qu'il induit la signalisation non-apoptotique de TRAIL de façon plus rapide et plus efficace. Cette dernière constatation apporte des limites à l'utilisation de cet agoniste multiple des récepteurs de mort de TRAIL. De plus, la structure de l'APG880 étant un assemblage de deux chaînes de molécules de TRAIL trimérique fusionnées, il est capable de se fixer également aux récepteurs leurres de TRAIL.

Afin de déterminer si l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL par l'APG880 pourrait avoir un rôle favorisant la survie et la prolifération des cellules tumorales d'ostéosarcome, il est nécessaire de tester cet agoniste *in vivo* dans les mêmes conditions que l'AMG655.

- **L'acide zolédronique, un candidat intéressant pour un rôle double de ciblage du microenvironnement et de sensibilisation à la voie apoptotique de TRAIL**

L'acide zolédronique est un agent thérapeutique très prometteur dans les tumeurs osseuses primitives par sa capacité à enrayer le cercle vicieux associant ostéolyse et prolifération tumorale. Les conséquences d'un traitement par l'acide zolédronique pourraient également représenter un intérêt dans les thérapies basées sur le ciblage de la voie TRAIL par la suppression du relargage des protons par les ostéoclastes et donc la stabilisation du pH extracellulaire de la tumeur. Un pH extracellulaire moins acide pourrait ainsi réduire l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL.

De plus, nous montrons que l'acide zolédronique peut agir directement sur les cellules tumorales même à faibles doses, en diminuant l'expression des inhibiteurs de l'apoptose c-IAP-1 et -2. Toutes ces observations en font un candidat idéal pour ce double ciblage des cellules tumorales et de leur microenvironnement pour la sensibilisation à TRAIL.

Cependant, nos expérimentations *in vivo* n'ont pas répondu à nos attentes car si l'acide zolédronique est capable de s'opposer à l'action pro-proliférative de l'AMG655, il est incapable de sensibiliser notre modèle d'ostéosarcome résistant à l'action pro-apoptotique de l'AMG655. Nous n'observons donc pas de différence dans le développement tumoral entre les groupes contrôle et traités par la combinaison acide zolédronique et AMG655.

Discussion générale

Discussion générale

Les phénomènes de résistance à TRAIL des tumeurs osseuses pédiatriques semblent liés aux cellules tumorales elles-mêmes d'une part mais sont révélés et amplifiés par le microenvironnement tumoral osseux particulier de ces pathologies d'autre part.

D'après nos observations, le rôle du récepteur de mort DR4 dans le sarcome d'Ewing apparaît central dans la sensibilité à TRAIL, alors que son expression n'est pas corrélée à la sensibilité des lignées d'ostéosarcome. Il existe dans la littérature plusieurs exemples de types de cancers qui semblent également avoir une préférence pour un des récepteurs de mort, comme par exemple le cancer du sein dont l'expression de DR5 joue un rôle prépondérant dans la réponse à TRAIL (Abdulghani et al., 2013) alors que dans la leucémie aiguë myéloblastique c'est DR4 qui joue ce rôle (Szegezdi et al., 2011).

L'émergence au cours de l'évolution de deux récepteurs de TRAIL capables d'induire l'apoptose soulève la question de savoir s'ils diffèrent dans leurs fonctions et dans leur régulation, ce qui revêt une importance clef pour le choix d'agents pro-apoptotiques sélectifs de DR4 ou DR5 pour le traitement du cancer (van Roosmalen et al., 2014). Ainsi dans le sarcome d'Ewing, caractérisé par la présence du facteur de transcription chimérique aberrant combinant la protéine EWS et un membre de la famille des ETS, la régulation de l'expression de DR4 pourrait être conditionnée par ce facteur de transcription oncogénique.

L'utilisation de l'anticorps agoniste AMG655 spécifique de DR5 dans cette pathologie peut donc être jugée peu adaptée, pourtant, seul le récepteur DR5 est exprimé par les lignées résistantes et constitue la seule cible pour déclencher la voie de signalisation de TRAIL. Dans le sarcome d'Ewing, il serait donc

intéressant de développer une bithérapie associant un agent permettant la réexpression de DR4 et un agoniste spécifique de ce récepteur.

Nous avons constaté que pour l'ostéosarcome, l'induction d'une voie de signalisation non-apoptotique par l'AMG655 semblait être un facteur important de la résistance. Il nous a été possible de la bloquer par l'inhibition de RIPK1. Néanmoins, cette voie ne conduit pas toujours à un effet pro-tumoral mais peut aussi conduire paradoxalement à une apoptose par la voie intrinsèque comme le démontre une étude récente dans laquelle Fas-L et TRAIL induisent l'apoptose par la voie de signalisation des MAPkinases (Cullen and Martin, 2015). Bloquer cette voie, notamment par des inhibiteurs de RIPK1 serait donc aspécifique de la voie de TRAIL mais toucherait l'ensemble des membres de la famille du TNF et pourrait paradoxalement limiter les effets pro-apoptotiques de TRAIL.

La localisation des récepteurs de mort dans les radeaux lipidiques semble favoriser la voie apoptotique de TRAIL (Song et al., 2007). Il est donc plus spécifique d'agir à ce niveau de régulation en induisant une forte clusterisation des récepteurs qui pourrait favoriser cette localisation. L'utilisation de CSM-TRAIL comme preuve de concept a validé cette théorie, néanmoins, ces cellules utilisées comme vecteurs de TRAIL ont de nombreuses limites, que ce soit techniques ou cliniques, avec notamment des rôles immunosuppresseifs (Klopp et al., 2011) et de soutien au développement tumoral (Perrot et al., 2010). Il est donc nécessaire de développer d'autres stratégies permettant la forte clusterisation des récepteurs de mort.

De plus en plus d'études rapportent l'utilisation d'agents capables de vectoriser TRAIL de façon plus neutre que les CSM-TRAIL. Ainsi une étude portant sur l'utilisation de bactéries *Bifidobacterium longum* comme vecteur de TRAIL a montré en 2009 une action antiproliférative sur le modèle syngénique d'ostéosarcome S180, amplifiée par la combinaison avec de faibles doses de chimiothérapie (Hu et al., 2009). Plus récemment, une étude de 2015 rapporte que des liposomes utilisés comme vecteurs de TRAIL permettaient une clusterisation de DR5 importante et augmentaient ainsi la formation du complexe DISC et l'activation des caspases plus efficacement que la forme soluble de TRAIL (De Miguel et al., 2015). Parallèlement, une autre étude utilisant des molécules de TRAIL fixées sur des nanotubes de carbone pour mimer la présentation de TRAIL à la membrane a montré

que cette méthode de vectorisation permettait une augmentation du potentiel pro-apoptotique de TRAIL de près de 20 fois (Zakaria et al., 2015).

Toutes ces stratégies semblent fournir de grands espoirs pour l'utilisation des dérivés de TRAIL en essais cliniques, cependant, de tels agents peuvent présenter un risque. Certains s'assujettissent de l'inhibition des récepteurs leurres comme c'est le cas pour les variants sélectifs, pour les récepteurs de mort ou les anticorps agonistes. D'autres agents induisent une forte clusterisation non-physiologique des récepteurs. Ils peuvent donc entraîner des effets secondaires importants, notamment hépato et cardiotoxiques, en perdant la sélectivité naturelle de TRAIL pour les cellules transformées, épargnant normalement les cellules saines.

De façon intéressante, nous avons pu approfondir le rôle de l'acidification du microenvironnement osseux par les ostéoclastes suractivés dans le site tumoral sur la résistance à TRAIL via la potentialisation de la voie non-apoptotique. Des études complémentaires seront nécessaires pour élucider le rôle de l'hypoxie et de la privation en nutriments grâce à de véritables modèles d'hypoxie. Les changements métaboliques induits par l'hypoxie peuvent avoir un effet très important sur la réponse des cellules tumorales aux thérapies comme la chimiothérapie et potentiellement TRAIL. De plus, outre les composantes physiques et chimiques du microenvironnement, il sera essentiel d'étudier plus en détail le rôle des acteurs cellulaires du microenvironnement. En effet, une étude très récente a montré que des cellules stromales de la tumeur pouvaient contrôler la sensibilité des cellules tumorales adjacentes via la présentation des récepteurs leurres DcR1 et DcR2 (O'Leary et al., 2015). Il a été développé au laboratoire un modèle de culture miniaturisé de cellules osseuses en trois dimensions sur des céramiques de phosphate de calcium (Gamblin et al., 2014). Ce modèle permettant de suivre plusieurs types de cellules en contact pourrait permettre une étude de l'impact des cellules osseuses et des interactions avec la matrice osseuse sur la sensibilité à TRAIL des cellules tumorales.

Cette caractérisation fine du microenvironnement permettra de proposer des agents thérapeutiques à associer à TRAIL pour lever la résistance induite par le microenvironnement.

A l'heure actuelle, nous pouvons proposer comme piste de recherche dans les tumeurs osseuses pédiatriques une bithérapie associant :

- L'acide zolédronique qui a le double avantage de bloquer le cercle vicieux entre ostéolyse et prolifération tumorale et l'acidification du milieu extracellulaire en ciblant les ostéoclastes mais aussi de sensibiliser les cellules tumorales à la voie extrinsèque de l'apoptose en inhibant l'expression de c-IAP-1 et -2,
- Un agent induisant fortement la voie apoptotique de TRAIL (**FIGURE 84**). L'APG880 pourrait jouer ce rôle malgré sa capacité à induire également la voie de signalisation non-apoptotique de TRAIL qui pourrait être contrebalancé par l'acide zolédronique.

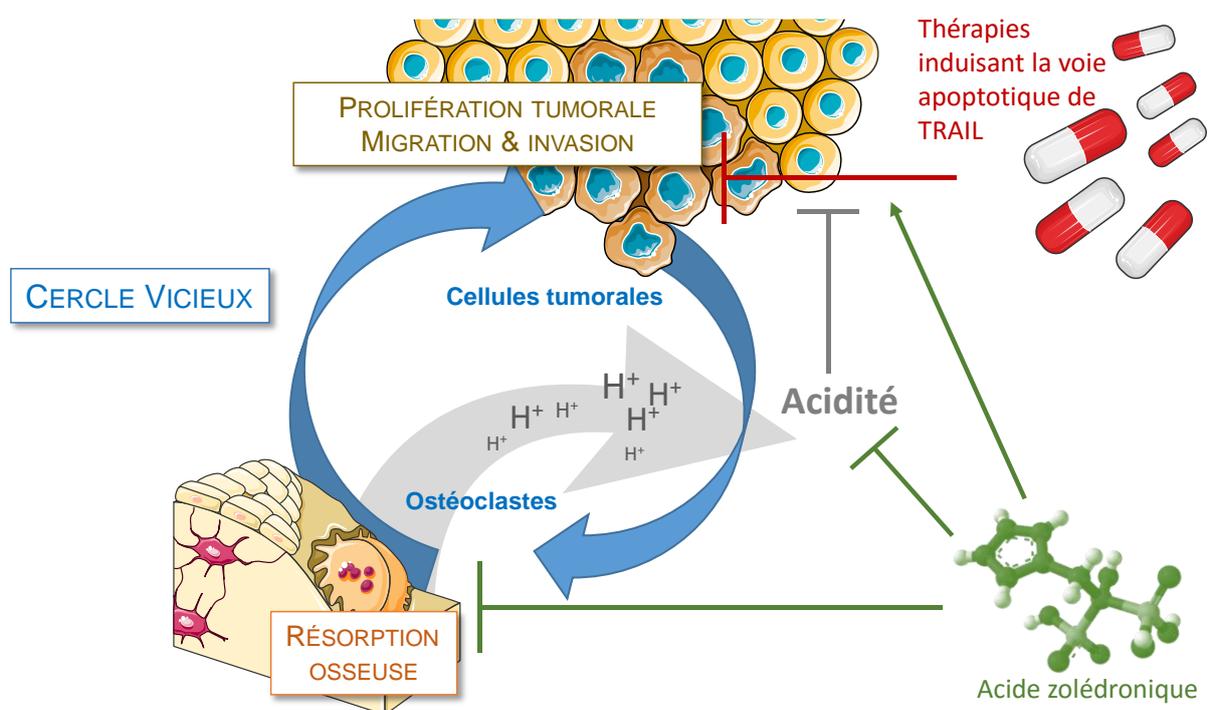


Figure 84 Proposition d'association de l'acide zolédronique et d'un agent induisant fortement la voie apoptotique de TRAIL, comme l'APG880. L'acide zolédronique cible les ostéoclastes responsables de l'ostéolyse associée à la prolifération tumorale par le cercle vicieux et de l'acidification du milieu extracellulaire favorable à l'activation de la voie non-apoptotique de TRAIL dans les cellules tumorales. De plus, l'acide zolédronique sensibilise directement les cellules tumorales à l'action de l'agent induisant la voie apoptotique de TRAIL en régulant à la baisse l'expression de c-IAP1 / -2.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les mécanismes de résistance dans les tumeurs osseuses pédiatriques sont complexes et très différents d'un modèle à l'autre. Cette complexité est sans doute le reflet de ce qui intervient également chez les patients. Les tumeurs qui se développent ont toutes échappé à l'immunosurveillance et donc à l'action de TRAIL présenté par les cellules de l'immunité innée. Les cellules tumorales ont donc développé des stratégies plus ou moins efficaces visant à réduire l'apoptose induite par TRAIL mais ont aussi pu utiliser à leur avantage sa présence par l'induction de voies de signalisation non-apoptotique de TRAIL pouvant conduire à la survie, à la prolifération mais aussi à l'invasion et à la migration.

Ces événements doivent donc être différents d'un patient à l'autre et la perspective d'une utilisation des thérapies basées sur TRAIL est donc conditionnée par la découverte de biomarqueurs, permettant de prédire les mécanismes de résistance de chaque tumeur. Une médecine personnalisée semble nécessaire pour éviter que l'utilisation de TRAIL ou de ses dérivés ne conduise à l'effet inverse de celui recherché.

Même s'il est le membre des cytokines pro-apoptotiques de la famille du TNF le plus prometteur en cancérologie, l'utilisation de TRAIL en clinique doit être associée à d'autres agents permettant la sensibilisation à ses effets apoptotiques et le blocage de ses effets protumoraux.

Bibliographie

Abadie, A., Besançon, F., and Wietzerbin, J. (2004). Type I interferon and TNFalpha cooperate with type II interferon for TRAIL induction and triggering of apoptosis in SK-N-MC EWING tumor cells. *Oncogene* 23, 4911–4920.

Abdulghani, J., Allen, J.E., Dicker, D.T., Liu, Y.Y., Goldenberg, D., Smith, C.D., Humphreys, R., and El-Deiry, W.S. (2013). Sorafenib sensitizes solid tumors to Apo2L/TRAIL and Apo2L/TRAIL receptor agonist antibodies by the Jak2-Stat3-Mcl1 axis. *PLoS ONE* 8, e75414.

Adams, E.J., Gu, S., and Luoma, A.M. (2015). Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. *Cellular Immunology* 296, 31–40.

Almasan, A., and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 337–348.

Arndt, C.A., and Crist, W.M. (1999). Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. *N. Engl. J. Med.* 341, 342–352.

Aryee, D.N.T., Niedan, S., Kauer, M., Schwentner, R., Bennani-Baiti, I.M., Ban, J., Muehlbacher, K., Kreppel, M., Walker, R.L., Meltzer, P., et al. (2010). Hypoxia modulates EWS-FLI1 transcriptional signature and enhances the malignant properties of Ewing's sarcoma cells in vitro. *Cancer Res.* 70, 4015–4023.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308.

Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., et al. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* 104, 155–162.

- Austin, C.D., Lawrence, D.A., Peden, A.A., Varfolomeev, E.E., Totpal, K., De Maziere, A.M., Klumperman, J., Arnott, D., Pham, V., Scheller, R.H., et al. (2006). Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 10283–10288.
- Azijli, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G.J., de Jong, S., and Kruyt, F.A.E. (2013). Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ.* *20*, 858–868.
- Bacci, G. (2003). Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Annals of Oncology* *14*, 1126–1134.
- Bajaj, M., and Heath, E.I. (2011). Conatumumab: a novel monoclonal antibody against death receptor 5 for the treatment of advanced malignancies in adults. *Expert Opin Biol Ther* *11*, 1519–1524.
- Barti-Juhasz, H., Mihalik, R., Nagy, K., Grisendi, G., Dominici, M., and Petak, I. (2011). Bone marrow derived mesenchymal stem/stromal cells transduced with full length human TRAIL repress the growth of rhabdomyosarcoma cells in vitro. *Haematologica* *96*, e21–e22.
- Bernstein, M., Kovar, H., Paulussen, M., Randall, R.L., Schuck, A., Teot, L.A., and Juergens, H. (2006). Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* *11*, 503–519.
- Bielack, S.S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., Exner, G.U., Flege, S., Helmke, K., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Werner, M., Winkelmann, W., et al. (2002). Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J. Clin. Oncol.* *20*, 776–790.
- Bodmer, J.-L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences* *27*, 19–26.
- Body, J.-J., Facon, T., Coleman, R.E., Lipton, A., Geurs, F., Fan, M., Holloway, D., Peterson, M.C., and Bekker, P.J. (2006). A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *12*, 1221–1228.
- Bouralexis, S., Findlay, D.M., Atkins, G.J., Labrinidis, A., Hay, S., and Evdokiou, A. (2003). Progressive resistance of BTK-143 osteosarcoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis is mediated by acquisition of DcR2/TRAIL-R4 expression: resensitisation with chemotherapy. *Br. J. Cancer* *89*, 206–214.
- Bouralexis, S., Clayer, M., Atkins, G.J., Labrinidis, A., Hay, S., Graves, S., Findlay, D.M., and Evdokiou, A. (2004). Sensitivity of fresh isolates of soft tissue sarcoma, osteosarcoma and giant cell tumour cells to Apo2L/TRAIL and doxorubicin. *Int. J. Oncol.* *24*, 1263–1270.
- Bratton, S.B., Lewis, J., Butterworth, M., Duckett, C.S., and Cohen, G.M. (2002). XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* *9*, 881–892.
- van den Broek, M.E., Kägi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W.K., Melief, C.J., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* *184*, 1781–1790.

- Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1, 779–786.
- Burns, T.F., Bernhard, E.J., and El-Deiry, W.S. (2001). Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo. *Oncogene* 20, 4601–4612.
- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27, 635–646.
- Capasso, L.L. (2005). Antiquity of cancer. *Int. J. Cancer* 113, 2–13.
- Carlo-Stella, C., Lavazza, C., Nicola, M.D., Cleris, L., Longoni, P., Milanese, M., Magni, M., Morelli, D., Gloghini, A., Carbone, A., et al. (2006). Antitumor Activity of Human CD34+ Cells Expressing Membrane-Bound Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand. *Human Gene Therapy* 17, 1225–1240.
- Cenni, V., Maraldi, N.M., Ruggeri, A., Secchiero, P., Del Coco, R., De Pol, A., Cocco, L., and Marmiroli, S. (2004). Sensitization of multidrug resistant human osteosarcoma cells to Apo2 Ligand/TRAIL-induced apoptosis by inhibition of the Akt/PKB kinase. *Int. J. Oncol.* 25, 1599–1608.
- Chan, F.K.-M. (2007). Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine* 37, 101–107.
- Chaudhary, P.M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., and Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7, 821–830.
- Chauveinc, L., Mosseri, V., Quintana, E., Desjardins, L., Schlienger, P., Doz, F., and Dutrillaux, B. (2001). Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet.* 22, 77–88.
- Chawla-Sarkar, M., Bae, S.I., Reu, F.J., Jacobs, B.S., Lindner, D.J., and Borden, E.C. (2004). Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 11, 915–923.
- Chen, M., Orozco, A., Spencer, D.M., and Wang, J. (2002). Activation of initiator caspases through a stable dimeric intermediate. *J. Biol. Chem.* 277, 50761–50767.
- Choo, M.-K., Kawasaki, N., Singhirunnusorn, P., Koizumi, K., Sato, S., Akira, S., Saiki, I., and Sakurai, H. (2006). Blockade of transforming growth factor-beta-activated kinase 1 activity enhances TRAIL-induced apoptosis through activation of a caspase cascade. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2970–2976.
- Chou, T.-C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 70, 440–446.
- Chowdhury, I., Tharakan, B., and Bhat, G.K. (2006). Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 11, 506–525.

- Ciampricotti, M., Vrijland, K., Hau, C.-S., Pemovska, T., Doornebal, C.W., Speksnijder, E.N., Wartha, K., Jonkers, J., and de Visser, K.E. (2011). Development of metastatic HER2(+) breast cancer is independent of the adaptive immune system. *J. Pathol.* *224*, 56–66.
- Ciavarella, S., Grisendi, G., Dominici, M., Tucci, M., Brunetti, O., Dammacco, F., and Silvestris, F. (2012). In vitro anti-myeloma activity of TRAIL-expressing adipose-derived mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* *157*, 586–598.
- Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M.J., and Chan, F.K.-M. (2005). Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *102*, 18099–18104.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J.J., and Smyth, M.J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J. Immunol.* *168*, 1356–1361.
- Cui, J., Wang, W., Li, Z., Zhang, Z., Wu, B., and Zeng, L. (2011). Epigenetic changes in osteosarcoma. *Bull Cancer* *98*, E62–E68.
- Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2015). Fas and TRAIL “death receptors” as initiators of inflammation: Implications for cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *39*, 26–34.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* *116*, 205–219.
- Daniel, D., and Wilson, N.S. (2008). Tumor necrosis factor: renaissance as a cancer therapeutic? *Curr Cancer Drug Targets* *8*, 124–131.
- Degterev, A., Hitomi, J., Germscheid, M., Ch’en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., et al. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 313–321.
- Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H., Joubert, I., de Jong, P., and Rouleau, G. (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* *359*, 162–165.
- Le Deley, M.-C., Delattre, O., Schaefer, K.-L., Burchill, S.A., Koehler, G., Hogendoorn, P.C.W., Lion, T., Poremba, C., Marandet, J., Ballet, S., et al. (2010). Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing’s sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J. Clin. Oncol.* *28*, 1982–1988.
- Denko, N.C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 705–713.
- Desandes, E., Clavel, J., Berger, C., Bernard, J.-L., Blouin, P., de Lumley, L., Demeocq, F., Freycon, F., Gembara, P., Goubin, A., et al. (2004). Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr Blood Cancer* *43*, 749–757.

- Diehl, G.E., Yue, H.H., Hsieh, K., Kuang, A.A., Ho, M., Morici, L.A., Lenz, L.L., Cado, D., Riley, L.W., and Winoto, A. (2004). TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity* *21*, 877–889.
- Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* *1*, 447–456.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* *3*, 991–998.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* *21*, 137–148.
- Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* *273–290*.
- Eimon, P.M., Kratz, E., Varfolomeev, E., Hymowitz, S.G., Stern, H., Zha, J., and Ashkenazi, A. (2006). Delineation of the cell-extrinsic apoptosis pathway in the zebrafish. *Cell Death Differ.* *13*, 1619–1630.
- Esiashvili, N., Goodman, M., and Marcus, R.B. (2008). 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.
- EuroEwing.eu (2015). www.euroewing.eu.
- Evdokiou, A., Bouralexis, S., Atkins, G.J., Chai, F., Hay, S., Clayer, M., and Findlay, D.M. (2002). Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* *99*, 491–504.
- Foley, E.J. (1953). Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* *13*, 835–837.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* *30*, 193–204.
- Fuchs, B., and Pritchard, D.J. (2002). Etiology of osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* *40–52*.
- Fulda, S., Küfer, M.U., Meyer, E., van Valen, F., Dockhorn-Dworniczak, B., and Debatin, K.M. (2001). Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* *20*, 5865–5877.
- Gamblin, A.L., Renaud, A., Charrier, C., Hulin, P., Louarn, G., Heymann, D., Trichet, V., and Layrolle, P. (2014). Osteoblastic and osteoclastic differentiation of human mesenchymal stem cells and monocytes in a miniaturized three-dimensional culture with mineral granules. *Acta Biomater* *10*, 5139–5147.
- Ganten, T.M., Koschny, R., Sykora, J., Schulze-Bergkamen, H., Büchler, P., Haas, T.L., Schader, M.B., Untergasser, A., Stremmel, W., and Walczak, H. (2006). Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clin. Cancer Res.* *12*, 2640–2646.

- Garofalo, C., Capristo, M., Manara, M.C., Mancarella, C., Landuzzi, L., Belfiore, A., Lollini, P.-L., Picci, P., and Scotlandi, K. (2013). Metformin as an adjuvant drug against pediatric sarcomas: hypoxia limits therapeutic effects of the drug. *PLoS ONE* *8*, e83832.
- Gaspar, N., Di Giannatale, A., Georger, B., Redini, F., Corradini, N., Enz-Werle, N., Tirode, F., Marec-Berard, P., Gentet, J.-C., Laurence, V., et al. (2012). Bone sarcomas: from biology to targeted therapies. *Sarcoma* *2012*, 301975.
- Gazitt, Y. (1999). TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. *Leukemia* *13*, 1817–1824.
- Gieffers, C., Kluge, M., Merz, C., Sykora, J., Thiemann, M., Schaal, R., Fischer, C., Branschädel, M., Abhari, B.A., Hohenberger, P., et al. (2013). APG350 induces superior clustering of TRAIL receptors and shows therapeutic antitumor efficacy independent of cross-linking via Fcγ receptors. *Mol. Cancer Ther.* *12*, 2735–2747.
- Gillespie, S., Zhang, X.D., and Hersey, P. (2005). Variable expression of protein kinase C epsilon in human melanoma cells regulates sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* *4*, 668–676.
- Gonzalvez, F., and Ashkenazi, A. (2010). New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* *29*, 4752–4765.
- Greve, B., Sheikh-Mounessi, F., Kemper, B., Ernst, I., Götte, M., and Eich, H.T. (2012). Survivin, a target to modulate the radiosensitivity of Ewing's sarcoma. *Strahlenther Onkol* *188*, 1038–1047.
- Griffith, T.S., Chin, W.A., Jackson, G.C., Lynch, D.H., and Kubin, M.Z. (1998). Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J. Immunol.* *161*, 2833–2840.
- Grisendi, G., Bussolari, R., Cafarelli, L., Petak, I., Rasini, V., Veronesi, E., Santis, G.D., Spano, C., Tagliazzucchi, M., Barti-Juhasz, H., et al. (2010a). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells as Stable Source of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Delivery for Cancer Therapy. *Cancer Res* *70*, 3718–3729.
- Grisendi, G., Bussolari, R., Cafarelli, L., Petak, I., Rasini, V., Veronesi, E., De Santis, G., Spano, C., Tagliazzucchi, M., Barti-Juhasz, H., et al. (2010b). Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res.* *70*, 3718–3729.
- Grisendi, G., Spano, C., D'souza, N., Rasini, V., Veronesi, E., Prapa, M., Petrachi, T., Piccinno, S., Rossignoli, F., Burns, J.S., et al. (2015). Mesenchymal progenitors expressing TRAIL induce apoptosis in sarcomas. *Stem Cells* *33*, 859–869.
- Grosse-Wilde, A., Voloshanenko, O., Bailey, S.L., Longton, G.M., Schaefer, U., Csernok, A.I., Schütz, G., Greiner, E.F., Kemp, C.J., and Walczak, H. (2008). TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. *J. Clin. Invest.* *118*, 100–110.
- Guiho, R., Biteau, K., Heymann, D., and Redini, F. (2015). TRAIL-based therapy in pediatric bone tumors: how to overcome resistance. *Future Oncol* *11*, 535–542.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hao, C. (2004). TRAIL Inhibits Tumor Growth but Is Nontoxic to Human Hepatocytes in Chimeric Mice. *Cancer Research* 64, 8502–8506.
- Henson, E.S., Gibson, E.M., Villanueva, J., Bristow, N.A., Haney, N., and Gibson, S.B. (2003). Increased expression of Mcl-1 is responsible for the blockage of TRAIL-induced apoptosis mediated by EGF/ErbB1 signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* 89, 1177–1192.
- Herberman, R.B., and Holden, H.T. (1978). Natural cell-mediated immunity. *Adv. Cancer Res.* 27, 305–377.
- Herbst, R.S., Eckhardt, S.G., Kurzrock, R., Ebbinghaus, S., O'Dwyer, P.J., Gordon, M.S., Novotny, W., Goldwasser, M.A., Tohnya, T.M., Lum, B.L., et al. (2010). Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 2839–2846.
- Heymann, D., Ory, B., Blanchard, F., Heymann, M.-F., Coipeau, P., Charrier, C., Couillaud, S., Thiery, J.P., Gouin, F., and Redini, F. (2005). Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 37, 74–86.
- Hofbauer, L.C., and Heufelder, A.E. (1997). Osteoprotegerin: a novel local player in bone metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* 137, 345–346.
- Holen, I., and Coleman, R.E. (2010). Bisphosphonates as treatment of bone metastases. *Curr. Pharm. Des.* 16, 1262–1271.
- de Hooge, A.S.K., Berghuis, D., Santos, S.J., Mooiman, E., Romeo, S., Kummer, J.A., Egeler, R.M., van Tol, M.J.D., Melief, C.J.M., Hogendoorn, P.C.W., et al. (2007). Expression of cellular FLICE inhibitory protein, caspase-8, and protease inhibitor-9 in Ewing sarcoma and implications for susceptibility to cytotoxic pathways. *Clin. Cancer Res.* 13, 206–214.
- Hotta, T., Suzuki, H., Nagai, S., Yamamoto, K., Imakiire, A., Takada, E., Itoh, M., and Mizuguchi, J. (2003). Chemotherapeutic agents sensitize sarcoma cell lines to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced caspase-8 activation, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential. *J. Orthop. Res.* 21, 949–957.
- Hu, B., Kou, L., Li, C., Zhu, L.-P., Fan, Y.-R., Wu, Z.-W., Wang, J.-J., and Xu, G.-X. (2009). Bifidobacterium longum as a delivery system of TRAIL and endostatin cooperates with chemotherapeutic drugs to inhibit hypoxic tumor growth. *Cancer Gene Ther.* 16, 655–663.
- Huang, H.-Y., Illei, P.B., Zhao, Z., Mazumdar, M., Huvos, A.G., Healey, J.H., Wexler, L.H., Gorlick, R., Meyers, P., and Ladanyi, M. (2005). Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J. Clin. Oncol.* 23, 548–558.
- Hu-Lieskovan, S., Zhang, J., Wu, L., Shimada, H., Schofield, D.E., and Triche, T.J. (2005). EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res.* 65, 4633–4644.

- Ishimura, N., Isomoto, H., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2006). Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *290*, G129–G136.
- Jaffe, N., Carrasco, H., Raymond, K., Ayala, A., and Eftekhari, F. (2002). Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? *Cancer* *95*, 2202–2210.
- Jo, M., Kim, T.H., Seol, D.W., Esplen, J.E., Dorko, K., Billiar, T.R., and Strom, S.C. (2000). Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat. Med.* *6*, 564–567.
- Jouan-Lanhouet, S., Arshad, M.I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C., Le Moigne-Muller, G., Van Herreweghe, F., Takahashi, N., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D., Vandenamee, P., et al. (2012). TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ.* *19*, 2003–2014.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 7556–7561.
- Kaplan-Lefko, P.J., Graves, J.D., Zoog, S.J., Pan, Y., Wall, J., Branstetter, D.G., Moriguchi, J., Coxon, A., Huard, J.N., Xu, R., et al. (2010). Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types. *Cancer Biol. Ther.* *9*, 618–631.
- Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* *449*, 557–563.
- Kelley, S.K., Harris, L.A., Xie, D., Deforge, L., Totpal, K., Bussiere, J., and Fox, J.A. (2001). Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *299*, 31–38.
- Kilic, M., Kasperczyk, H., Fulda, S., and Debatin, K.-M. (2007). Role of hypoxia inducible factor-1 alpha in modulation of apoptosis resistance. *Oncogene* *26*, 2027–2038.
- Kilic-Eren, M., Boylu, T., and Tabor, V. (2013). Targeting PI3K/Akt represses Hypoxia inducible factor-1alpha activation and sensitizes Rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma cells for apoptosis. *Cancer Cell Int.* *13*, 36.
- Kimberley, F.C., and Screaton, G.R. (2004). Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res.* *14*, 359–372.
- Klopp, A.H., Gupta, A., Spaeth, E., Andreeff, M., and Marini, F. (2011). Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* *29*, 11–19.

- Knowles, H.J., Schaefer, K.-L., Dirksen, U., and Athanasou, N.A. (2010). Hypoxia and hypoglycaemia in Ewing's sarcoma and osteosarcoma: regulation and phenotypic effects of Hypoxia-Inducible Factor. *BMC Cancer* 10, 372.
- Kohlhaas, S.L., Craxton, A., Sun, X.-M., Pinkoski, M.J., and Cohen, G.M. (2007). Receptor-mediated Endocytosis Is Not Required for Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 282, 12831–12841.
- Kontny, H.U., Hämmerle, K., Klein, R., Shayan, P., Mackall, C.L., and Niemeyer, C.M. (2001). Sensitivity of Ewing's sarcoma to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 8, 506–514.
- Kovar, H., Jug, G., Aryee, D.N., Zoubek, A., Ambros, P., Gruber, B., Windhager, R., and Gadner, H. (1997). Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 15, 2225–2232.
- Krzewski, K., and Strominger, J.L. (2008). The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 597–605.
- Kubista, B., Trieb, K., Sevelde, F., Toma, C., Arrich, F., Heffeter, P., Elbling, L., Sutterlüty, H., Scotlandi, K., Kotz, R., et al. (2006). Anticancer effects of zoledronic acid against human osteosarcoma cells. *J. Orthop. Res.* 24, 1145–1152.
- Kumar, A., Jasmin, A., Eby, M.T., and Chaudhary, P.M. (2001). Cytotoxicity of Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand towards Ewing's sarcoma cell lines. *Oncogene* 20, 1010–1014.
- Labrinidis, A., Liapis, V., Thai, L.M., Atkins, G.J., Vincent, C., Hay, S., Sims, N.A., Zannettino, A.C.W., Findlay, D.M., and Evdokiou, A. (2008). Does Apo2L/TRAIL play any physiologic role in osteoclastogenesis? *Blood* 111, 5411–5412.
- Ladenstein, R., Pötschger, U., Le Deley, M.C., Whelan, J., Paulussen, M., Oberlin, O., van den Berg, H., Dirksen, U., Hjorth, L., Michon, J., et al. (2010). Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J. Clin. Oncol.* 28, 3284–3291.
- Lamoureux, F., Richard, P., Wittrant, Y., Battaglia, S., Pilet, P., Trichet, V., Blanchard, F., Gouin, F., Pitard, B., Heymann, D., et al. (2007). 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.
- Lamoureux, F., Picarda, G., Rousseau, J., Gourden, C., Battaglia, S., Charrier, C., Pitard, B., Heymann, D., and Rédini, F. (2008). Therapeutic efficacy of soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B-Fc delivered by nonviral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3389–3398.
- Lamoureux, F., Moriceau, G., Picarda, G., Rousseau, J., Trichet, V., and Rédini, F. (2010). Regulation of osteoprotegerin pro- or anti-tumoral activity by bone tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta* 1805, 17–24.
- Lanvers-Kaminsky, C., Winter, B., Koling, S., Frodermann, B., Braun, Y., Schaefer, K.-L., Diallo, R., Koenemann, S., Wai, D., Willich, N., et al. (2005). Doxorubicin modulates telomerase activity in Ewing's sarcoma in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* 14, 751–758.

- Lau, Y.S., Adamopoulos, I.E., Sabokbar, A., Giele, H., Gibbons, C.L.M.H., and Athanasou, N.A. (2007a). Cellular and humoral mechanisms of osteoclast formation in Ewing's sarcoma. *Br. J. Cancer* *96*, 1716–1722.
- Lau, Y.S., Danks, L., Sun, S.G., Fox, S., Sabokbar, A., Harris, A., and Athanasou, N.A. (2007b). RANKL-dependent and RANKL-independent mechanisms of macrophage-osteoclast differentiation in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *105*, 7–16.
- Law, R.H.P., Lukoyanova, N., Voskoboinik, I., Caradoc-Davies, T.T., Baran, K., Dunstone, M.A., D'Angelo, M.E., Orlova, E.V., Coulibaly, F., Verschoor, S., et al. (2010). The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* *468*, 447–451.
- Lawrence, D., Shahrokh, Z., Marsters, S., Achilles, K., Shih, D., Mounho, B., Hillan, K., Totpal, K., DeForge, L., Schow, P., et al. (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med.* *7*, 383–385.
- Leaner, V.D., Chick, J.F., Donniger, H., Linniola, I., Mendoza, A., Khanna, C., and Birrer, M.J. (2009). Inhibition of AP-1 transcriptional activity blocks the migration, invasion, and experimental metastasis of murine osteosarcoma. *Am. J. Pathol.* *174*, 265–275.
- Lee, M.W., Park, S.C., Yang, Y.G., Yim, S.O., Chae, H.S., Bach, J.H., Lee, H.J., Kim, K.Y., Lee, W.B., and Kim, S.S. (2002). The involvement of reactive oxygen species (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. *FEBS Lett.* *512*, 313–318.
- Leonard, A., Craft, A.W., Moss, C., and Malcolm, A.J. (1996). Osteogenic sarcoma in the Rothmund-Thomson syndrome. *Med. Pediatr. Oncol.* *26*, 249–253.
- Leong, S., Cohen, R.B., Gustafson, D.L., Langer, C.J., Camidge, D.R., Padavic, K., Gore, L., Smith, M., Chow, L.Q., von Mehren, M., et al. (2009). Mapatumumab, an antibody targeting TRAIL-R1, in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced solid malignancies: results of a phase I and pharmacokinetic study. *J. Clin. Oncol.* *27*, 4413–4421.
- Lesokhin, A.M., Callahan, M.K., Postow, M.A., and Wolchok, J.D. (2015). On being less tolerant: enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation. *Sci Transl Med* *7*, 280sr1.
- Li, J., and Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* *27*, 6194–6206.
- Li, C., Chunbao, L., Cheng, Q., Qianpeng, C., Liu, J., Jia, L., Wang, B., Bin, W., Chen, D., Dongfeng, C., et al. (2012). Potent growth-inhibitory effect of TRAIL therapy mediated by double-regulated oncolytic adenovirus on osteosarcoma. *Mol. Cell. Biochem.* *364*, 337–344.
- Lin, P.P., Wang, Y., and Lozano, G. (2011). Mesenchymal Stem Cells and the Origin of Ewing's Sarcoma. *Sarcoma* *2011*.
- Linnet, M.S., Ries, L.A., Smith, M.A., Tarone, R.E., and Devesa, S.S. (1999). Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* *91*, 1051–1058.

- Lissat, A., Vraetz, T., Tsokos, M., Klein, R., Braun, M., Koutelia, N., Fisch, P., Romero, M.E., Long, L., Noellke, P., et al. (2007). Interferon-gamma sensitizes resistant Ewing's sarcoma cells to tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of caspase-8 without altering chemosensitivity. *Am. J. Pathol.* *170*, 1917–1930.
- Locklin, R.M., Federici, E., Espina, B., Hulley, P.A., Russell, R.G.G., and Edwards, C.M. (2007). Selective targeting of death receptor 5 circumvents resistance of MG-63 osteosarcoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* *6*, 3219–3228.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF Receptor Superfamilies. *Cell* *104*, 487–501.
- Loebinger, M.R., Eddaoudi, A., Davies, D., and Janes, S.M. (2009). Mesenchymal Stem Cell Delivery of TRAIL Can Eliminate Metastatic Cancer. *Cancer Res* *69*, 4134–4142.
- López-Guerrero, J.A., López-Ginés, C., Pellín, A., Carda, C., and Llombart-Bosch, A. (2004). Deregulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagn. Mol. Pathol.* *13*, 81–91.
- Lu, G., Punj, V., and Chaudhary, P.M. (2008). Proteasome inhibitor Bortezomib induces cell cycle arrest and apoptosis in cell lines derived from Ewing's sarcoma family of tumors and synergizes with TRAIL. *Cancer Biol. Ther.* *7*, 603–608.
- MacFarlane, M., Robinson, G.L., and Cain, K. (2012). Glucose—a sweet way to die: metabolic switching modulates tumor cell death. *Cell Cycle* *11*, 3919–3925.
- Mackintosh, C., Madoz-Gúrpide, J., Ordóñez, J.L., Osuna, D., and Herrero-Martín, D. (2010). The molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Cancer Biol. Ther.* *9*, 655–667.
- Manjili, M.H. (2011). Revisiting cancer immunoediting by understanding cancer immune complexity. *J. Pathol.* *224*, 5–9.
- Marec-Bérard, P., Chotel, F., and Claude, L. (2010). [PNET/Ewing tumours: current treatments and future perspectives]. *Bull Cancer* *97*, 707–713.
- Marini, P., Schmid, A., Jendrossek, V., Faltin, H., Daniel, P.T., Budach, W., and Belka, C. (2005). Irradiation specifically sensitises solid tumour cell lines to TRAIL mediated apoptosis. *BMC Cancer* *5*, 5.
- Martinou, J.C., and Green, D.R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 63–67.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* *407*, 796–801.
- Merchant, M.S., Yang, X., Melchionda, F., Romero, M., Klein, R., Thiele, C.J., Tsokos, M., Kontny, H.U., and Mackall, C.L. (2004). Interferon gamma enhances the effectiveness of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonists in a xenograft model of Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* *64*, 8349–8356.

- Mérino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., and Micheau, O. (2006). Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 7046–7055.
- Metelitsa, L.S., Weinberg, K.I., Emanuel, P.D., and Seeger, R.C. (2003). Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells. *Leukemia* *17*, 1068–1077.
- Meurette, O., Rebillard, A., Huc, L., Le Moigne, G., Merino, D., Micheau, O., Lagadic-Gossmann, D., and Dimanche-Boitrel, M.-T. (2007). TRAIL induces receptor-interacting protein 1-dependent and caspase-dependent necrosis-like cell death under acidic extracellular conditions. *Cancer Res.* *67*, 218–226.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C., and Grütter, M.G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* *277*, 45162–45171.
- De Miguel, D., Gallego-Lleyda, A., Anel, A., and Martinez-Lostao, L. (2015). Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells. *Leuk. Res.*
- Milani, D., Zauli, G., Rimondi, E., Celeghini, C., Marmioli, S., Narducci, P., Capitani, S., and Secchiero, P. (2003). Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sequentially activates pro-survival and pro-apoptotic pathways in SK-N-MC neuronal cells. *J. Neurochem.* *86*, 126–135.
- Mirabello, L., Troisi, R.J., and Savage, S.A. (2009). International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int. J. Cancer* *125*, 229–234.
- Mitsiades, N., Poulaki, V., Mitsiades, C., and Tsokos, M. (2001). Ewing's sarcoma family tumors are sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and express death receptor 4 and death receptor 5. *Cancer Res.* *61*, 2704–2712.
- Mohr, A., Lyons, M., Deedigan, L., Harte, T., Shaw, G., Howard, L., Barry, F., O'Brien, T., and Zwacka, R. (2008). Mesenchymal stem cells expressing TRAIL lead to tumour growth inhibition in an experimental lung cancer model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* *12*, 2628–2643.
- Mohseny, A.B., and Hogendoorn, P.C.W. (2011). Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem Cells* *29*, 397–403.
- Moon, M.H., Jeong, J.K., Seo, J.S., Seol, J.W., Lee, Y.J., Xue, M., Jackson, C.J., and Park, S.-Y. (2011). Bisphosphonate enhances TRAIL sensitivity to human osteosarcoma cells via death receptor 5 upregulation. *Exp. Mol. Med.* *43*, 138–145.
- Mori, T., Sato, Y., Miyamoto, K., Kobayashi, T., Shimizu, T., Kanagawa, H., Katsuyama, E., Fujie, A., Hao, W., Tando, T., et al. (2013). TNF α promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state. *Oncogene*.
- Moriceau, G., Ory, B., Gobin, B., Verrecchia, F., Gouin, F., Blanchard, F., Redini, F., and Heymann, D. (2010a). Therapeutic approach of primary bone tumours by bisphosphonates. *Curr. Pharm. Des.* *16*, 2981–2987.

- Moriceau, G., Ory, B., Mitrofan, L., Riganti, C., Blanchard, F., Brion, R., Charrier, C., Battaglia, S., Pilet, P., Denis, M.G., et al. (2010b). Zoledronic acid potentiates mTOR inhibition and abolishes the resistance of osteosarcoma cells to RAD001 (Everolimus): pivotal role of the prenylation process. *Cancer Res.* *70*, 10329–10339.
- Mühlenbeck, F., Haas, E., Schwenzler, R., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., Scheurich, P., and Wajant, H. (1998). TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem.* *273*, 33091–33098.
- Mutsaers, A.J., and Walkley, C.R. (2014). Cells of origin in osteosarcoma: Mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone* *62C*, 56–63.
- Nature.com (2015). Milestones Cancer. www.nature.com/milestones/milecancer/index.html.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., and Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 3448–3459.
- Nimmanapalli, R., Perkins, C.L., Orlando, M., O'Bryan, E., Nguyen, D., and Bhalla, K.N. (2001). Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *Cancer Res.* *61*, 759–763.
- Nobelprize.org (2015). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908. www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/.
- Old, L.J., and Boyse, E.A. (1964). Immunology of experimental tumors. *Annu. Rev. Med.* *15*, 167–186.
- O'Leary, L., van der Sloot, A.M., Reis, C.R., Deegan, S., Ryan, A.E., Dhimi, S.P.S., Murillo, L.S., Cool, R.H., de Sampaio, P.C., Thompson, K., et al. (2015). Decoy receptors block TRAIL sensitivity at a supracellular level: the role of stromal cells in controlling tumour TRAIL sensitivity. *Oncogene*.
- Ozören, N., and El-Deiry, W.S. (2002). Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* *4*, 551–557.
- Parham, P. (2005). MHC class I molecules and kirs in human history, health and survival. *Nature Reviews Immunology* *5*, 201–214.
- Pennarun, B., Meijer, A., de Vries, E.G.E., Kleibeuker, J.H., Kruijt, F., and de Jong, S. (2010). Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1805*, 123–140.
- Perrot, P., Rousseau, J., Bouffaut, A.-L., Rédini, F., Cassagnau, E., Deschaseaux, F., Heymann, M.-F., Heymann, D., Duteille, F., Trichet, V., et al. (2010). Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS ONE* *5*, e10999.
- Picarda, G., Lamoureux, F., Geffroy, L., Delepine, P., Montier, T., Laud, K., Tirode, F., Delattre, O., Heymann, D., and Rédini, F. (2010). Preclinical evidence that use of TRAIL in Ewing's sarcoma and osteosarcoma therapy inhibits tumor growth, prevents osteolysis, and increases animal survival. *Clin. Cancer Res.* *16*, 2363–2374.

- Picarda, G., Surget, S., Guiho, R., Téletchéa, S., Berreur, M., Tirode, F., Pellat-Deceunynck, C., Heymann, D., Trichet, V., and Rédini, F. (2012a). A functional, new short isoform of death receptor 4 in Ewing's sarcoma cell lines may be involved in TRAIL sensitivity/resistance mechanisms. *Mol. Cancer Res.* *10*, 336–346.
- Picarda, G., Trichet, V., Téletchéa, S., Heymann, D., and Rédini, F. (2012b). TRAIL receptor signaling and therapeutic option in bone tumors: the trap of the bone microenvironment. *Am J Cancer Res* *2*, 45–64.
- Pinto, A., Dickman, P., and Parham, D. (2011). Pathobiologic markers of the ewing sarcoma family of tumors: state of the art and prediction of behaviour. *Sarcoma* *2011*, 856190.
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* *271*, 12687–12690.
- Platanias, L.C., and Fish, E.N. (1999). Signaling pathways activated by interferons. *Exp. Hematol.* *27*, 1583–1592.
- Pollack, I.F., Erff, M., and Ashkenazi, A. (2001). Direct stimulation of apoptotic signaling by soluble Apo2l/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand leads to selective killing of glioma cells. *Clin. Cancer Res.* *7*, 1362–1369.
- Potratz, J., Jürgens, H., Craft, A., and Dirksen, U. (2012). Ewing sarcoma: biology-based therapeutic perspectives. *Pediatr Hematol Oncol* *29*, 12–27.
- Qiao, L., Xu, Z.-L., Zhao, T.-J., Ye, L.-H., and Zhang, X.-D. (2008a). Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett.* *269*, 67–77.
- Qiao, L., Xu, Z., Zhao, T., Zhao, Z., Shi, M., Zhao, R.C., Ye, L., and Zhang, X. (2008b). Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res.* *18*, 500–507.
- Qin, X.-F., An, D.S., Chen, I.S.Y., and Baltimore, D. (2003). Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 183–188.
- Redini, F., Odri, G.A., Picarda, G., Gaspar, N., Heymann, M.-F., Corradini, N., and Heymann, D. (2013). Drugs targeting the bone microenvironment: new therapeutic tools in Ewing's sarcoma? *Expert Opin Emerg Drugs* *18*, 339–352.
- Reis, C.R., van der Sloot, A.M., Natoni, A., Szegezdi, E., Setroikromo, R., Meijer, M., Sjollem, K., Stricher, F., Cool, R.H., Samali, A., et al. (2010). Rapid and efficient cancer cell killing mediated by high-affinity death receptor homotrimerizing TRAIL variants. *Cell Death Dis* *1*, e83.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* *22*, 326–330.
- Riccioni, R., Pasquini, L., Mariani, G., Saulle, E., Rossini, A., Diverio, D., Pelosi, E., Vitale, A., Chierichini, A., Cedrone, M., et al. (2005). TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. *Haematologica* *90*, 612–624.

- Riggi, N., Suvà, M.-L., Suvà, D., Cironi, L., Provero, P., Tercier, S., Joseph, J.-M., Stehle, J.-C., Baumer, K., Kindler, V., et al. (2008). EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* *68*, 2176–2185.
- Roberts, N.J., Zhou, S., Diaz, L.A., and Holdhoff, M. (2011). Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget* *2*, 739–751.
- van Roosmalen, I.A.M., Quax, W.J., and Kruyt, F.A.E. (2014). Two death-inducing human TRAIL receptors to target in cancer: Similar or distinct regulation and function? *Biochemical Pharmacology* *91*, 447–456.
- Rorie, C.J., and Weissman, B.E. (2004). The Ews/Fli-1 fusion gene changes the status of p53 in neuroblastoma tumor cell lines. *Cancer Res.* *64*, 7288–7295.
- Rossin, A., Derouet, M., Abdel-Sater, F., and Hueber, A.-O. (2009). Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling. *Biochemical Journal* *419*, 185–194.
- Rousseau, J., Escriou, V., Lamoureux, F., Brion, R., Chesneau, J., Battaglia, S., Amiaud, J., Scherman, D., Heymann, D., Rédini, F., et al. (2011). Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models. *J. Bone Miner. Res.* *26*, 2452–2462.
- Ruggieri, P., Sim, F.H., Bond, J.R., and Unni, K.K. (1994). Malignancies in fibrous dysplasia. *Cancer* *73*, 1411–1424.
- Rutkowski, P., Kamińska, J., Kowalska, M., Ruka, W., and Steffen, J. (2003). Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol* *84*, 151–159.
- Rygaard, J., and Povlsen, C.O. (1974). The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* *82*, 99–106.
- Sanlioglu, A.D., Karacay, B., Koksai, I.T., Griffith, T.S., and Sanlioglu, S. (2007a). DcR2 (TRAIL-R4) siRNA and adenovirus delivery of TRAIL (Ad5hTRAIL) break down in vitro tumorigenic potential of prostate carcinoma cells. *Cancer Gene Therapy* *14*, 976–984.
- Sanlioglu, A.D., Korcum, A.F., Pestereli, E., Erdogan, G., Karaveli, S., Savas, B., Griffith, T.S., and Sanlioglu, S. (2007b). TRAIL Death Receptor–4 Expression Positively Correlates With the Tumor Grade in Breast Cancer Patients With Invasive Ductal Carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* *69*, 716–723.
- Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J.L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N., and Tschopp, J. (1997). TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* *7*, 831–836.
- Shimizu, K., Kurosawa, Y., Taniguchi, M., Steinman, R.M., and Fujii, S.-I. (2007). Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with alpha-galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell mediated immunity via dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 2641–2653.
- Shirley, S., and Micheau, O. (2013). Targeting c-FLIP in cancer. *Cancer Letters* *332*, 141–150.

- Silke, J., and Vucic, D. (2014). IAP Family of Cell Death and Signaling Regulators. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 35–65.
- van der Sloot, A.M., Tur, V., Szegezdi, E., Mullally, M.M., Cool, R.H., Samali, A., Serrano, L., and Quax, W.J. (2006). Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 8634–8639.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* *191*, 661–668.
- Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., and Yagita, H. (2002a). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* *2*, 850–861.
- Smyth, M.J., Crowe, N.Y., Pellicci, D.G., Kyparissoudis, K., Kelly, J.M., Takeda, K., Yagita, H., and Godfrey, D.I. (2002b). Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* *99*, 1259–1266.
- Song, J.J., and Lee, Y.J. (2008). Differential cleavage of Mst1 by caspase-7/-3 is responsible for TRAIL-induced activation of the MAPK superfamily. *Cell. Signal.* *20*, 892–906.
- Song, J.H., Tse, M.C.L., Bellail, A., Phuphanich, S., Khuri, F., Kneteman, N.M., and Hao, C. (2007). Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res.* *67*, 6946–6955.
- Song, K., Benhaga, N., Anderson, R.L., and Khosravi-Far, R. (2006). Transduction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand into hematopoietic cells leads to inhibition of syngeneic tumor growth in vivo. *Cancer Res.* *66*, 6304–6311.
- Soria, J.-C., Márk, Z., Zatloukal, P., Szima, B., Albert, I., Juhász, E., Pujol, J.-L., Kozielski, J., Baker, N., Smethurst, D., et al. (2011). Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* *29*, 4442–4451.
- Stoll, G., Surdez, D., Tirode, F., Laud, K., Barillot, E., Zinovyev, A., and Delattre, O. (2013). Systems biology of Ewing sarcoma: a network model of EWS-FLI1 effect on proliferation and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* *41*, 8853–8871.
- Stutman, O. (1975). Immunodepression and malignancy. *Adv. Cancer Res.* *22*, 261–422.
- Svane, I.M., Engel, A.M., Nielsen, M.B., Ljunggren, H.G., Rygaard, J., and Werdelin, O. (1996). Chemically induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomas from congenic normal mice. *Eur. J. Immunol.* *26*, 1844–1850.
- Swann, J.B., Uldrich, A.P., van Dommelen, S., Sharkey, J., Murray, W.K., Godfrey, D.I., and Smyth, M.J. (2009). Type I natural killer T cells suppress tumors caused by p53 loss in mice. *Blood* *113*, 6382–6385.
- Szegezdi, E., Reis, C.R., van der Sloot, A.M., Natoni, A., O'Reilly, A., Reeve, J., Cool, R.H., O'Dwyer, M., Knapper, S., Serrano, L., et al. (2011). Targeting AML through DR4 with a novel variant of rhTRAIL. *J. Cell. Mol. Med.* *15*, 2216–2231.

- Szekeres, T., Schuchter, K., Chiba, P., Ressmann, G., Lhotka, C., Gharehbaghi, K., Szalay, S.M., and Pillwein, K. (1993). Synergistic action of tiazofurin with hypoxanthine and allopurinol in human neuroectodermal tumor cell lines. *Biochem. Pharmacol.* *46*, 1903–1907.
- Takahashi, N., Duprez, L., Grootjans, S., Cauwels, A., Nerinckx, W., DuHadaway, J.B., Goossens, V., Roelandt, R., Van Hauwermeiren, F., Libert, C., et al. (2012). Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Dis* *3*, e437.
- Takimoto, R., and El-Deiry, W.S. (2000). Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* *19*, 1735–1743.
- Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M., and Nagata, S. (1998). Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat. Med.* *4*, 31–36.
- Taylor, R., Knowles, H.J., and Athanasou, N.A. (2011). Ewing sarcoma cells express RANKL and support osteoclastogenesis. *The Journal of Pathology* *225*, 195–202.
- Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S.K., Fortun, Y., Redini, F., and Heymann, D. (2004). The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* *15*, 457–475.
- Thomas, L. (1982). On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* *55*, 329–333.
- Thomas, L., and Lawrence, H.S. (1959). Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. New York: Hoeber-Harper 529–532.
- Thorburn, A., Behbakht, K., and Ford, H. (2008). TRAIL receptor-targeted therapeutics: resistance mechanisms and strategies to avoid them. *Drug Resist. Updat.* *11*, 17–24.
- Tirole, F., Laud-Duval, K., Prieur, A., Delorme, B., Charbord, P., and Delattre, O. (2007). Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* *11*, 421–429.
- Trauzold, A., Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Röder, C., Kalthoff, H., and Wajant, H. (2006). TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* *25*, 7434–7439.
- Tur, V., van der Sloot, A.M., Reis, C.R., Szegezdi, E., Cool, R.H., Samali, A., Serrano, L., and Quax, W.J. (2008). DR4-selective tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) variants obtained by structure-based design. *J. Biol. Chem.* *283*, 20560–20568.
- Vaculova, A., Kaminsky, V., Jalalvand, E., Surova, O., and Zhivotovsky, B. (2010). Doxorubicin and etoposide sensitize small cell lung carcinoma cells expressing caspase-8 to TRAIL. *Mol. Cancer* *9*, 87.
- Van Valen, F., Fulda, S., Truckenbrod, B., Eckervogt, V., Sonnemann, J., Hillmann, A., Rödl, R., Hoffmann, C., Winkelmann, W., Schäfer, L., et al. (2000). Apoptotic responsiveness of the Ewing's sarcoma family of tumours to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Int. J. Cancer* *88*, 252–259.

- Van Valen, F., Fulda, S., Schäfer, K.-L., Truckenbrod, B., Hotfilder, M., Poremba, C., Debatin, K.-M., and Winkelman, W. (2003). Selective and nonselective toxicity of TRAIL/Apo2L combined with chemotherapy in human bone tumour cells vs. normal human cells. *Int. J. Cancer* *107*, 929–940.
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., and Ashkenazi, A. (2005). Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J. Biol. Chem.* *280*, 40599–40608.
- Varley, J.M., Evans, D.G., and Birch, J.M. (1997). Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *Br. J. Cancer* *76*, 1–14.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 239–252.
- Vucic, D., Dixit, V.M., and Wertz, I.E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 439–452.
- Wagner, E.R., Luther, G., Zhu, G., Luo, Q., Shi, Q., Kim, S.H., Gao, J.-L., Huang, E., Gao, Y., Yang, K., et al. (2011). Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma. *Sarcoma* *2011*, 325238.
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., et al. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* *5*, 157–163.
- Wang, L., Zhao, Y., Liu, Y., Akiyama, K., Chen, C., Qu, C., Jin, Y., and Shi, S. (2013). IFN- γ and TNF- α synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NF κ B signaling. *Stem Cells* *31*, 1383–1395.
- Weiss, R.H., and Lin, P.-Y. (2006). Kidney cancer: identification of novel targets for therapy. *Kidney Int.* *69*, 224–232.
- White, D.E., and Burchill, S.A. (2010). Fenretinide-dependent upregulation of death receptors through ASK1 and p38 α enhances death receptor ligand-induced cell death in Ewing's sarcoma family of tumours. *Br. J. Cancer* *103*, 1380–1390.
- Wiezorek, J., Holland, P., and Graves, J. (2010). Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. *Clin. Cancer Res.* *16*, 1701–1708.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., and Smith, C.A. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* *3*, 673–682.
- Willmsky, G., and Blankenstein, T. (2005). Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* *437*, 141–146.
- Wu, D.Y., Segal, N.H., Sidobre, S., Kronenberg, M., and Chapman, P.B. (2003). Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J. Exp. Med.* *198*, 173–181.

- Wu, X., Cai, Z., Lou, L., and Zhu, Y. (2012). Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients. *Cancer Epidemiol* 36, 212–216.
- Xu, J., Zhou, J.-Y., Wei, W.-Z., and Wu, G.S. (2010). Activation of the Akt survival pathway contributes to TRAIL resistance in cancer cells. *PLoS ONE* 5, e10226.
- Yen, M.-L., Hsu, P.-N., Liao, H.-J., Lee, B.-H., and Tsai, H.-F. (2012). TRAF-6 dependent signaling pathway is essential for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces osteoclast differentiation. *PLoS ONE* 7, e38048.
- Yu, J.M., Jun, E.S., Bae, Y.C., and Jung, J.S. (2008). Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev.* 17, 463–473.
- Yuan, Z., Kolluri, K.K., Sage, E.K., Gowers, K.H.C., and Janes, S.M. (2015). Mesenchymal stromal cell delivery of full-length tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is superior to soluble type for cancer therapy. *Cytotherapy*.
- Zakaria, A.B., Picaud, F., Rattier, T., Pudlo, M., Saviot, L., Chassagnon, R., Lherminier, J., Gharbi, T., Micheau, O., and Herlem, G. (2015). Nanovectorization of TRAIL with single wall carbon nanotubes enhances tumor cell killing. *Nano Lett.* 15, 891–895.
- Zhu, W., Xu, W., Jiang, R., Qian, H., Chen, M., Hu, J., Cao, W., Han, C., and Chen, Y. (2006). Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp. Mol. Pathol.* 80, 267–274.
- Zhu, Y., Sun, Z., Han, Q., Liao, L., Wang, J., Bian, C., Li, J., Yan, X., Liu, Y., Shao, C., et al. (2009). Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 23, 925–933.
- Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 715–727.

Annexes

- Solutions utilisées dans cette étude
- Article de revue publié dans Future Oncology
- Projet d'article sur les CSM-TRAIL en phase de soumission

I. Solutions utilisées

1. Solutions de Western Blot

Gel de Résolution			10mL final
• Acrylamide Mix : Acrylamide et Bis-acrylamide (Sigma-Aldrich)			8%
• Tampon Tris pH=8,8			200 mM
• Sodium Dodecyl Sulfate (SDS Solution - Sigma)			0,5 %
• Persulfate d'Ammonium (APS en poudre - Sigma)			0,1 %
• TETraMethylEthyleneDiamine (TEMED - Sigma) catalyseur de polymérisation			1/2000ème
Gel de concentration	5mL final		
• Acrylamide Mix	5%	Tampon de Transfert	1L
• Tampon Tris pH=6,8	190 mM	• Tampon Tris/Glycine :	2,5 mM / 19,2 mM
• SDS	0,1 %	• Méthanol	4 %
• APS	0,1 %	Solution de Saturation 1	20mL
• TEMED	1/1000ème	• PBS - Tween	0,05%
Tampon de Lavage	1L	• BSA (Sigma)	3%
• PBS – Tween	0,05 %	Solution de Saturation 2	20mL
Tampon de Migration	1L	• PBS - Tween	0,05%
• Tampon Tris/Glycine	2,5 mM / 19,2 mM	• Lait en poudre (Regilait)	5%
• SDS	0,1 %		

Tampons de lyse

Radio Immuno-Precipitation Assay (RIPA) : Tris-HCl pH 7.6 25mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, sodium deoxycholate 1%, SDS 0.1%

Tampon de Lyse : RIPA, PMSF 1mM, Cocktail d'Inhibiteurs de Protéases (AEBSF 120 µM, Aprotinine 120 nM, Bestatine 6,4 µM, E-64 56 µM, Leupeptine 3,2 µM, Pepstatine A 2,4 µM ; PIC - Sigma), Na3VO4 1mM

REVIEW

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

TRAIL-based therapy in pediatric bone tumors: how to overcome resistance

Romain Guiho^{1,2,3}, Kevin Biteau^{1,2,3}, Dominique Heymann^{1,2,3} & Françoise Redini^{*1,2,3}

ABSTRACT Osteosarcoma and Ewing's sarcoma, the two most frequent malignant primary tumors preferentially arise in children and young adults, and have a poor prognosis. TRAIL represents a promising therapeutic approach for most cancers but in the case of primary bone tumors, osteosarcoma cell lines are highly resistant to this pro-apoptotic cytokine. In addition, another signaling pathway mediating cell proliferation and migration may be even activated in this subset of resistant cells leading to protumoral effect. Therapeutic perspectives are linked to possibility to overcome TRAIL resistance by combining other drugs with TRAIL or death receptors agonistic antibodies. We hypothesized that the bone microenvironment may provide a favorable niche for TRAIL resistance that might be targeted by new resensitizing agents.

TRAIL/TNFSF10 can specifically induce apoptosis in transformed cells, while being comparatively nontoxic to normal cells. This specific antitumor activity has been actively studied and TRAIL became one of the most promising therapeutic options in a wide range of cancers. Triggering the apoptosis of tumor cells without striking normal cells is extremely tempting but the main limit of clinical use of TRAIL is linked to the existence of resistance mechanisms. Patients affected by osteosarcoma and Ewing's sarcoma, two malignancies of the childhood have not seen major therapeutic advances since the last 30 years. Therefore, although TRAIL may represent interesting therapeutic option in pathologies, several questions still remain:

- Do TRAIL-based therapeutics represent relevant approaches for pediatric bone tumors?
- The main limit of clinical use of TRAIL in cancer being resistance mechanisms, can we (re)-sensitize pediatric bone tumors to TRAIL proapoptotic effect?
- What is the impact of specific bone tumor microenvironment in the regulation of TRAIL activity/resistance in osteosarcoma and Ewing's sarcoma?

Pediatric bone tumors

The two most frequent pediatric malignant bone tumors, osteosarcoma and Ewing's sarcoma, are both rare cancers, highly metastatic and causing serious disruption of bone remodeling. Osteosarcoma is characterized by the direct formation of osteoid substance by tumor cells derived from osteoblasts [1]. Its incidence peaks during the second decade of life coinciding with the adolescent growth but its pathogenesis is not clearly determined [2]. Ewing's sarcoma is identified by a chromosomal translocation causing the fusion of the *EWS* gene on chromosome 22 and a member of the E26

¹INSERM, Nantes, France

²Equipe Labellisée LIGUE Contre le CANCER 2012, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France

³Faculté de Médecine, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Université de Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France

*Author for correspondence: Tel.: +33 2 40 41 29 60; Fax: +33 2 40 41 28 60; francoise.redini@univ-nantes.fr

KEYWORDS

- Ewing's sarcoma
- microenvironment
- osteosarcoma • resistance
- TRAIL

transformation-specific (ETS) transcription factors family on chromosome 11, leading to the production of a fusion protein which behaves as an aberrant transcription factor [3]. The major fusion protein is EWS-FLI1, which can directly or indirectly modulate the expression of many genes, targeting several cell functions including cell cycle (by targeting p21/CDKN1A, Cyclin D and E, p57/KIP2, TGF- β -, IGF- or MAPK-signaling pathways) or apoptosis (by targeting caspase3 and members of TNF-, IGF- and TGF- β signaling pathways) [4]. Transformed cells appear as small round and undifferentiated, and are involved in a major disruption of bone with severe osteolytic lesions.

If these two cancers do not have the same origin and the same pathogenesis, therapeutic approach is similar: surgery, neoadjuvant and adjuvant chemotherapy and radiotherapy for EWS only. The 5 years survival rate has not evolved over the past 30 years and remains at around 70% for localized forms, but falls drastically around 20% for groups of metastatic patients or poor responders to chemotherapy. New avenues of research are opened by the use of TRAIL, a proapoptotic cytokine from TNF superfamily.

TRAIL, a promising therapeutic option in cancer: mechanistic insights

Since its discovery in the mid-90s, this cytokine has been actively studied [5–8]. In human cells, TRAIL can bind to five receptors belonging to the TNFR superfamily: two death receptors TRAIL-R1 (Death Receptor 4: DR4) and TRAIL-R2 (DR5), and three decoy receptors that do not transmit death signal and can confer resistance toward TRAIL-induced apoptosis: TRAIL-R3 (Decoy Receptor 1: DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) and osteoprotegerin which is soluble. TRAIL, by binding to DR4 and DR5 is able to induce apoptosis of tumor cells by recruiting the intracellular death domains of Fas-associated with death domain (FADD) protein activating the recruitment and cleavage of the pro-caspase-8 in a complex called death-inducing signaling complex (DISC). A cascade of recruitment and activation leads to tumor cell death by the extrinsic pathway of apoptosis. This mechanism can be amplified in some cell types by activation of the intrinsic pathway of apoptosis depending on the mitochondria and the apoptosome via the BH3 interacting domain (BID) cleavage by caspase-8. Both pathways lead to the final cleavage of pro-caspase-3 into active caspase-3 (Figure 1) [9].

Several mechanisms of apoptosis inhibition were also characterized, such as the balance between decoy and death receptors, or their recruitment into the DISC complex [10]. Other notable inhibition mechanisms of apoptosis are also described, for example, cFLIP, an analog of caspase-8 which acts as a competitor in the DISC formation [11], or the inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) that block caspase activity [12].

For over a decade, the TRAIL signaling pathway has interested many research teams as a target in cancer therapy [13–15]. Several clinical trials have been developed targeting TRAIL signaling pathway, summarized in Table 1 [16–23]. But accumulated evidences over the last years indicate that TRAIL, besides its well documented proapoptotic effects can also induce another signaling pathway involving NF- κ B, MAPK, PI3K/Akt via binding to the same receptors, but leading to increased tumor cell proliferation, survival, migration and invasion (reviewed in [24]). The key regulator of this kinase network is the RIPK1 protein which binds FADD and leads to the formation of a secondary signalization complex (complex II) composed by TRADD, TRAF2 and RIPK1.

TRAIL therapy in pediatric bone tumors

Because pediatric bone tumors still exhibit poor prognosis and need new therapeutic approaches, targeting TRAIL may represent a promising challenge for osteosarcoma and Ewing's sarcoma patients as proved by promising results in other cancers.

It has been demonstrated that TRAIL signaling may be involved in the normal function of bone remodeling, including a positive role in osteoclast differentiation via a TRAF6 dependent signaling pathway [25]. However, in a tumor context (primitive bone tumor or bone metastasis) it has never been demonstrated that tumor cells modulate osteoclast activity by this TRAIL pathway but rather directly by the expression of RANK-L [26–28].

In the field of research on pediatric bone tumors, osteoprotegerin may play a dual role: it can exert anti-osteolytic effect by binding and inhibiting RANKL activity, and it can limit the TRAIL-induced pro-apoptotic effect as a decoy receptor [29–31]. In the early 2000s, it was reported that many cell lines derived from Ewing's sarcoma are sensitive to TRAIL-induced apoptosis [32–35] whereas osteosarcoma cell lines are, for most part, resistant to TRAIL. However, in some cases, they can be sensitized *in vitro* by several

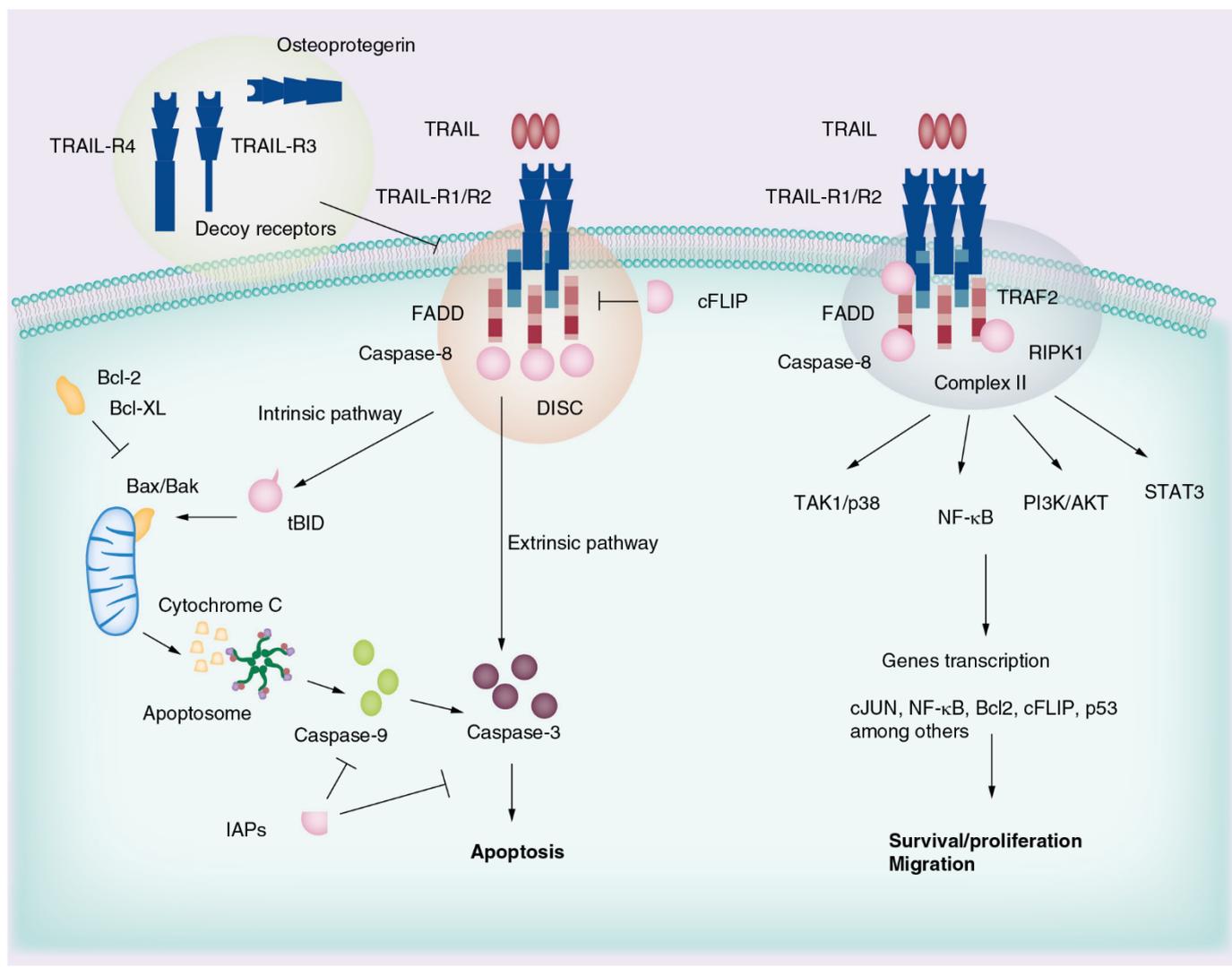


Figure 1. TRAIL canonical and non-canonical pathways. (A) TRAIL apoptotic pathway (left): the binding of trimeric TRAIL to TRAIL-R1 or -R2 leads to the recruitment of FADD and procaspase-8, forming the DISC. Caspase-8 cleavage results in caspase-3 cleavage and apoptosis by the extrinsic pathway, or can also activate the intrinsic pathway in some cell types by BH3 interacting domain cleavage in truncated BID (tBID). The intrinsic pathway of apoptosis is dependent on mitochondria and the formation of the apoptosome. Several known inhibitors can prevent apoptosis, the caspase-8 analogue cFLIP can inhibit DISC formation, Bcl-2 family members can prevent mitochondria permeabilization and inhibitors of apoptosis proteins can inhibit apoptosis by binding to caspase-3 and -9. (B) TRAIL noncanonical signaling pathway: TRAIL can also stimulate cell survival, proliferation and migration involving the signaling complex II, composed by TRADD, TRAF2 and RIPK1, that activates a large kinase network including TAK1/p38, NF- κ B, PI3K/AKT or STAT3.

chemotherapeutic agents [36–38]. Based on these *in vitro* studies, complementary experiments in xenograft mice models of Ewing’s sarcoma showed that TRAIL or DR5 agonist significantly reduced tumor volume, prevented osteolytic lesions and increased animal survival [39,40]. Two publications reported a significant effect of TRAIL overexpression in osteosarcoma allograft mouse model [40] and xenograft model [41]. However, no sensitization of osteosarcoma cells by a chemotherapeutic agent could be demonstrated *in vivo*.

Bone tumor microenvironment as a potential favorable niche for TRAIL resistance

In the case of the specific microenvironment of bone tumors, we wonder whether it could have an impact on TRAIL resistance in osteosarcoma [42]. When considering the potential influence of bone microenvironment, *in vitro* models to test the different (re-)sensitizing options in bone tumors are limited. Indeed, many parameters that may affect the response of tumor cells to TRAIL need to be

Table 1. rhTRAIL and TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors agonist antibodies in clinical trials.

Reagent	Description	Clinical status	Cancer	Ref.
Dulanermin (rhApo2L/TRAIL, AMG 951)	rhTRAIL WT (residues 114-281)	Phase II	Non-Hodgkin's lymphomas (NCT: 00400764)Colorectal cancer (NCT: 00873756; NCT: 00671372) NSCLC (NCT: 00508625; EudraCT: 2005-005484-28)	[16]
Mapatumumab (HGS-ETR1)	Anti-DR4 human IgG1 mAb	Phase II	Non-Hodgkin's Lymphoma (NCT:00094848) NSCLC (NCT: 00092924; NCT: 00583830; EudraCT: 2007-005153-32) Hepatocellular carcinoma (NCT: 00712855; NCT: 01258608; EudraCT: 2010-020798-17) Cervical cancer (NCT: 01088347; EudraCT: 2009-015941-22) Multiple myeloma (NCT: 00315757)	[17]
Conatumumab (AMG 655)	Anti-DR5 human IgG1 mAb	Phase II	Ovarian cancer (NCT: 01940172) Colorectal cancer (NCT: 00630786) Carcinoid, colorectal cancer, lymphoma, NSCLC, sarcoma and solid tumors (NCT: 01327612; EudraCT: 2010-022270-14)	[18]
Drozitumab (Apomab)	Anti-DR5 human IgG1 mAb	Phase I/II	Non-Hodgkin's lymphoma (EudraCT: 2007-001666-32)	[19]
HGS-TR2J (KMTR2)	Anti-DR5 human IgG1 mAb	Phase I	Refractory tumors	[20]
LBY135 (Novartis)	Anti-DR5 chimeric IgG1 mAb	Phase I/II	Solid tumors	[21]
Lexatumumab (HGS-ETR2)	Anti-DR5 human IgG1 mAb	Phase I	Pediatric solid tumors (NCT: 00428272)	[22]
Tigatuzumab (TRA-8; CS-1008)	Anti-DR5 humanized IgG1 mAb	Phase I/II	Breast cancer (NCT: 01307891)NSCLC (NCT: 00991796; EudraCT: 2007-004574-11) Lymphomas (NCT: 00320827) Colorectal cancer (NCT: 01220999; NCT: 00969033; NCT:01124630) Ovarian cancer (NCT: 00945191; NCT:00711932) Liver cancer (NCT: 01033240) Pancreatic cancer (NCT: 00521404)	[8]

Ongoing and passed clinical trials using TRAIL or agonist antibodies to its death receptors in various cancer types.
NSCLC: Non-small-cell lung cancer.

considered, such as hypoxia, 3D environment, or acidic milieu. An overview of these parameters is required to have an integrated view of the response to TRAIL in this microenvironment, as summarized in **Figure 2**.

• **A hypoxic microenvironment**

Hypoxia, the drastic reduction of normal level of tissue oxygen tension, is a frequent and important component in the bone tumor microenvironment. Tumor growth needs the development of a local vascular network that supplies both oxygen and nutrients to tumor cells. In aggressive sarcomas like Ewing's sarcoma and osteosarcoma, a highly proliferating mass of tumor cells grows faster than the vasculature, and tumor cells quickly find themselves in an avascular area deficient in oxygen. Even if hypoxia is toxic for both normal and transformed cells, cancer cells organized several adaptive genetic changes that allow them to survive in these adverse conditions. HIF-1α is the

key transcription factor involved in this phenomenon [43]. Several studies have reported that primary Ewing's sarcoma and osteosarcoma exhibit an accumulation of the HIF-1α transcription factor [44,45] followed by a extend of tumor cells survival, resistance to proapoptotic treatments such as TRAIL and escape from a nutrient-deprived environment [46,47]. The overexpression of antiapoptotic proteins from Bcl-2 family and IAP1/2 seems to be involved in the resistance of Ewing's sarcoma cell lines under hypoxic conditions [48].

In addition to the lack of oxygen, glucose deprivation is also a characteristic of sarcoma microenvironment. This induces metabolic changes in cancer cells and the switch from aerobic glycolysis to oxidative phosphorylation, with a potential protection against cell death by promoting antiapoptotic proteins from the Bcl-2 family [49]. However, although apoptosis of tumor cells can be reduced, the proapoptotic cytokines from the TNF family could induce necroptosis in hypoxia

environment. Indeed, low intracellular ATP levels due to lack of nutrients could shift cell death toward necroptosis (cross-talk between different form of cell death reviewed in [50]).

- **An acidic microenvironment**

Accelerated release of protons by highly activated osteoclasts near the tumor site acidifies substantially the microenvironment. The acidic extracellular pH is an important parameter which may impact on TRAIL sensitivity as it switches TRAIL-induced apoptosis to necroptosis in several human cancer cell lines [51,52].

- **An inflammatory environment**

Physiologically, inflammatory cytokines have an essential role in bone formation, destruction, repair and remodeling (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-11 and so on), and several are upregulated in the sera of osteosarcoma and Ewing's sarcoma

patients and promotes cancer progression [53,54]. This inflammatory environment can have an important role in the TRAIL-sensitivity status of the tumor. In two studies on Ewing's sarcoma *in vitro* and *in vivo* models, IFN- γ and TNF- α have shown their ability to increase tumor cells expression of TRAIL-R2 and caspase-8 and had a synergistic antitumor effect with TRAIL [39,55].

Conclusion

Osteosarcoma and Ewing's sarcoma high-risk patients have not seen any improvement of survival rate for 40 years; therefore, the challenge of defining new therapeutic tools is essential. TRAIL can induce tumor cells apoptosis with slight effect on normal cells, thus TRAIL pathway can represent a good therapeutic target. The limit of TRAIL and death-receptors agonist antibodies clinical use is still the resistance of certain tumors cells, probably link to the particular

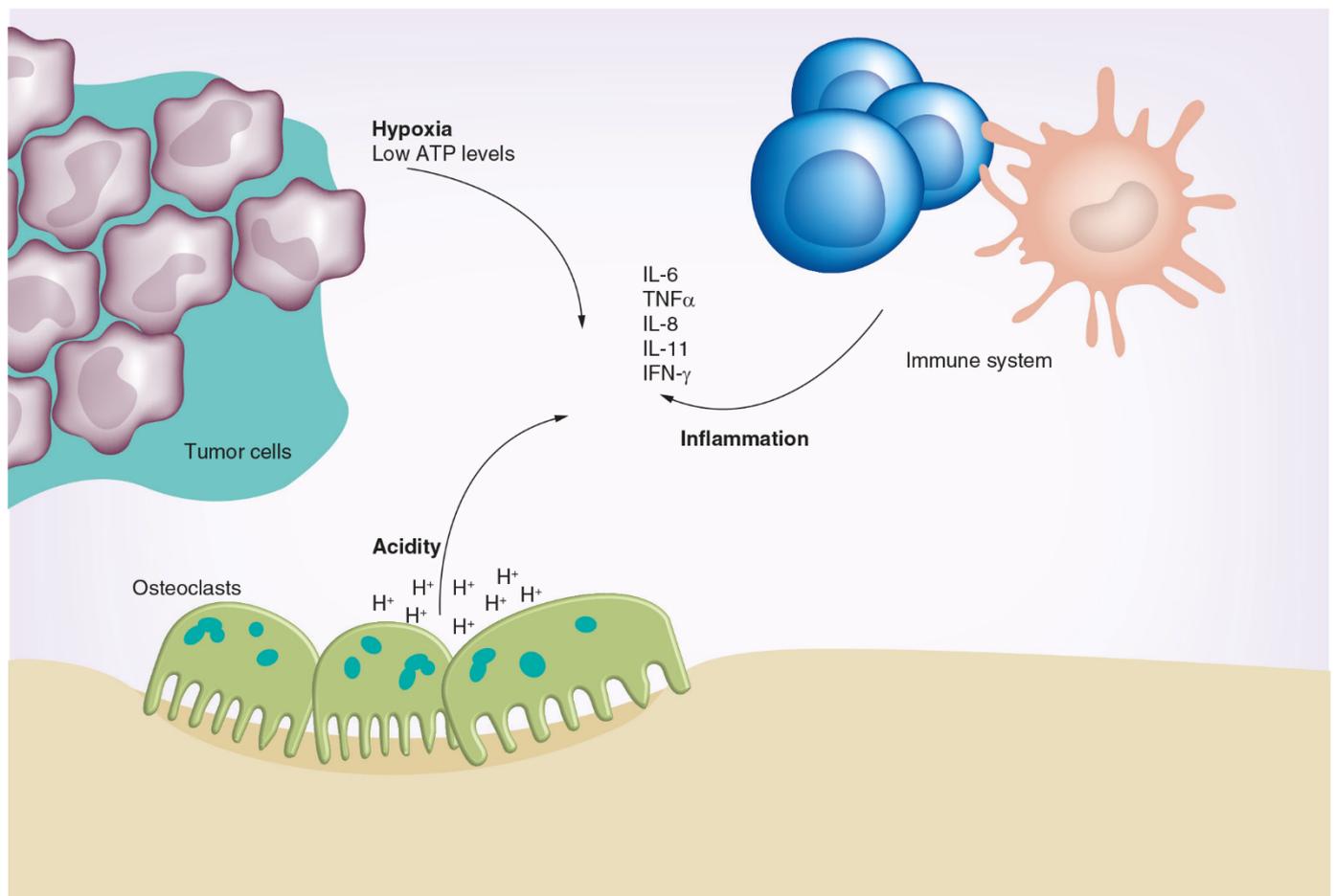


Figure 2. How the bone tumor microenvironment could interfere on TRAIL sensitivity/resistance in primary bone tumors. Bone microenvironment is characterized by high hypoxia, an acidic milieu and several inflammatory cytokines that may interfere with TRAIL activity.

bone tumor microenvironment. Consequently, we have to better understand TRAIL resistance and sensitivity mechanisms in Ewing's sarcoma and osteosarcoma.

Future perspective

Concerning TRAIL-based therapy, two main groups of drugs should be considered in the future: drugs that induce activation of the TRAIL pro-apoptotic pathway, associated or not with drugs able to overcome TRAIL resistance.

In the future, attention will be paid to determine the best tools to induce cancer cell death through activation of the TRAIL pro-apoptotic pathway. Based on preclinical studies, multiple clinical trials evaluate the potential antitumor activity of human recombinant TRAIL (e.g., dulanermin), or of agonistic antibodies to DR4 (e.g., mapatumumab) or DR5 (e.g., lexatumumab, conatumumab, PRO95780, LBY135 and CS-1008) [56–58]. These products have a well-tolerated safety profile in the completed Phase I studies [59,60].

A Phase II study is in progress for sarcoma including the two primary bone tumors EWS and OS. A Phase Ib/II study of conatumumab is also in progress for pediatric patients (5–25 years) associated with the TEMERI chemotherapy combination.

In addition, several other TRAIL delivery approaches are under development in preclinical studies. Mesenchymal stem cells have been shown to be effective vectors to present membranous TRAIL to cancer cells [61,62]. Another approach is to use *TRAIL-zVAD* to demonstrate the necroptosis pathway [63].

However, their therapeutic efficacy is limited because approximately half of cancer cell lines are resistant to TRAIL receptor mediated apoptosis, as it is the case for osteosarcoma. Data from the literature clearly reported that numerous drugs targeting different levels of apoptosis pathway are able to overcome TRAIL resistance in a number of cancers, and among them chemotherapy agents. We hypothesize that in the specific case of primary bone tumors, the bone microenvironment can provide clues to find out re-sensitizing agents. One of the more promising drugs may be zoledronic acid, a potent antiresorptive bisphosphonate, which is already given in osteosarcoma and Ewing's sarcoma patients (Phase III clinical trials in France and Europe). We suggest that a combinatory therapy based on TRAIL-activating pathway (recombinant TRAIL or agonistic antibodies to its death receptors) associated with zoledronic acid may overcome TRAIL resistance often reported in osteosarcoma and can be proposed for promising therapeutic approach in these malignancies with still poor outcome for high-risk patients.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

EXECUTIVE SUMMARY

Pediatric bone tumors

- Osteosarcoma and Ewing's sarcoma, the two most frequent primary bone tumors have a poor survival rate for high-risk patients.

TRAIL, a promising therapeutic option in cancer

- TRAIL is one of the most promising pro-apoptotic drugs to target cancer cells without killing normal cells.
- Half of cancer cell lines are resistant to TRAIL, including most of osteosarcoma cell lines.

Bone tumor microenvironment as a potential favorable niche for TRAIL resistance

- The particular bone microenvironment can influence TRAIL resistance/sensitivity in primary bone tumors.

Future perspective

- Combinatory therapeutic approaches could be proposed associating TRAIL and zoledronic acid to (re-)sensitize osteosarcoma to TRAIL in clinics.

References

Papers of special note have been highlighted as:
• of interest; •• of considerable interest

- 1 Mutsaers AJ, Walkley CR. Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone* 62C, 56–63 (2014).
- 2 Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*. 125(1), 229–234 (2009).
- 3 Pinto A, Dickman P, Parham D. Pathobiologic markers of the Ewing sarcoma family of tumors: state of the art and prediction of behaviour. *Sarcoma* 856190 (2011) (2011).
- 4 Stoll G, Surdez D, Tirode F *et al.* Systems biology of Ewing sarcoma: a network model of EWS-FLI1 effect on proliferation and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 41(19), 8853–8871 (2013).
- **Comprehensive study to understand the direct and indirect effects of EWS-FLI1 on major cellular functions.**
- 5 Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7(6), 821–830 (1997).
- 6 Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276(5309), 111–113 (1997).
- 7 Schneider P, Bodmer JL, Thome M, Hofmann K, Holler N, Tschopp J. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett.* 416(3), 329–334 (1997).
- 8 Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3(6), 673–682 (1995).
- 9 Ozören N, El-Deiry WS. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* 4(6), 551–557 (2002).
- 10 Mérimo D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, Micheau O. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.* 26(19), 7046–7055 (2006).
- 11 Irmiler M, Thome M, Hahne M *et al.* Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388(6638), 190–195 (1997).
- 12 Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13(3), 239–252 (1999).
- 13 Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J. Clin. Oncol.* 26(21), 3621–3630 (2008).
- 14 Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S *et al.* Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med.* 7(4), 383–385 (2001).
- 15 Micheau O, Shirley S, Dufour F. Death receptors as targets in cancer. *Br. J. Pharmacol.* 169(8), 1723–1744 (2013).
- 16 Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* 271(22), 12687–12690 (1996).
- 17 Pukac L, Kanakaraj P, Humphreys R *et al.* HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Cancer* 92(8), 1430–1441 (2005).
- 18 Kaplan-Lefko PJ, Graves JD, Zoog SJ *et al.* Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types. *Cancer Biol. Ther.* 9(8), 618–631 (2010).
- 19 Adams C, Totpal K, Lawrence D *et al.* Structural and functional analysis of the interaction between the agonistic monoclonal antibody Apomab and the proapoptotic receptor DR5. *Cell Death Differ.* 15(4), 751–761 (2008).
- 20 Motoki K, Mori E, Matsumoto A *et al.* Enhanced apoptosis and tumor regression induced by a direct agonist antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2. *Clin. Cancer Res.* 11(8), 3126–3135 (2005).
- 21 Li J, Knee DA, Wang Y *et al.* LBY135, a novel anti-DR5 agonistic antibody induces tumor cell-specific cytotoxic activity in human colon tumor cell lines and xenografts. *Drug Dev. Res.* 69(2), 69–82 (2008).
- 22 Georgakis GV, Li Y, Humphreys R *et al.* Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death. *Br. J. Haematol.* 130(4), 501–510 (2005).
- 23 Yada A, Yazawa M, Ishida S *et al.* A novel humanized anti-human death receptor 5 antibody CS-1008 induces apoptosis in tumor cells without toxicity in hepatocytes. *Ann. Oncol.* 19(6), 1060–1067 (2008).
- 24 Azijli K, Weyhenmeyer B, Peters GJ, de Jong S, Kruyt FAE. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ.* 20(7), 858–868 (2013).
- **Important review of the literature exhaustively compiling nonapoptotic TRAIL pathways that are involved in cancer cells.**
- 25 Yen ML, Hsu PN, Liao HJ, Lee BH, Tsai HF. TRAF-6 dependent signaling pathway is essential for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces osteoclast differentiation. *PLoS ONE* 7(6), e38048 (2012).
- 26 Lau YS, Adamopoulos IE, Sabokbar A, Giele H, Gibbons CLMH, Athanasou NA. Cellular and humoral mechanisms of osteoclast formation in Ewing's sarcoma. *Br. J. Cancer* 96(11), 1716–1722 (2007).
- 27 Taylor R, Knowles HJ, Athanasou NA. Ewing sarcoma cells express RANKL and support osteoclastogenesis. *J. Pathol.* 225(2), 195–202 (2011).
- 28 Lau YS, Danks L, Sun SG *et al.* RANKL-dependent and RANKL-independent mechanisms of macrophage-osteoclast differentiation in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 105(1), 7–16 (2007).
- 29 Hofbauer LC, Heufelder AE. Osteoprotegerin: a novel local player in bone metabolism. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 137(4), 345–346 (1997).
- 30 Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y *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(15), 7308–7318 (2007).
- 31 Lamoureux F, Moriceau G, Picarda G, Rousseau J, Trichet V, Rédini F. Regulation of osteoprotegerin pro- or anti-tumoral activity by bone tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta* 1805(1), 17–24 (2010).
- 32 Kontny HU, Hämmerle K, Klein R, Shayan P, Mackall CL, Niemeyer CM. Sensitivity of Ewing's sarcoma to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 8(5), 506–514 (2001).
- 33 Van Valen F, Fulda S, Truckenbrod B *et al.* Apoptotic responsiveness of the Ewing's sarcoma family of tumours to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 88(2), 252–259 (2000).
- 34 Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades C, Tsokos M. Ewing's sarcoma family tumors are

- sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and express death receptor 4 and death receptor 5. *Cancer Res.* 61(6), 2704–2712 (2001).
- 35 Kumar A, Jasmin A, Eby MT, Chaudhary PM. Cytotoxicity of tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand towards Ewing's sarcoma cell lines. *Oncogene* 20(8), 1010–1014 (2001).
- 36 Bouralexis S, Findlay DM, Atkins GJ, Labrinidis A, Hay S, Evdokiou A. Progressive resistance of BTK-143 osteosarcoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis is mediated by acquisition of DcR2/TRAIL-R4 expression: resensitisation with chemotherapy. *Br. J. Cancer* 89(1), 206–214 (2003).
- 37 Evdokiou A, Bouralexis S, Atkins GJ *et al.* Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 99(4), 491–504 (2002).
- 38 Van Valen F, Fulda S, Schäfer KL *et al.* Selective and nonselective toxicity of TRAIL/Apo2L combined with chemotherapy in human bone tumour cells vs. normal human cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 107(6), 929–940 (2003).
- 39 Merchant MS, Yang X, Melchionda F *et al.* Interferon gamma enhances the effectiveness of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonists in a xenograft model of Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 64(22), 8349–8356 (2004).
- **First preclinical evidence of TRAIL use in Ewing's sarcoma and importance of inflammatory environment for tumor TRAIL sensitivity status.**
- 40 Picarda G, Lamoureux F, Geffroy L *et al.* Preclinical evidence that use of TRAIL in Ewing's sarcoma and osteosarcoma therapy inhibits tumor growth, prevents osteolysis, and increases animal survival. *Clin. Cancer Res.* 16(8), 2363–2374 (2010).
- 41 Li C, Chunbao L, Cheng Q *et al.* Potent growth-inhibitory effect of TRAIL therapy mediated by double-regulated oncolytic adenovirus on osteosarcoma. *Mol. Cell. Biochem.* 364(1–2), 337–344 (2012).
- 42 Picarda G, Trichet V, Téletchéa S, Heymann D, Rédini F. TRAIL receptor signaling and therapeutic option in bone tumors: the trap of the bone microenvironment. *Am. J. Cancer Res.* 2(1), 45–64 (2012).
- 43 Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat. Rev. Cancer* 8(9), 705–713 (2008).
- 44 Aryee DNT, Niedan S, Kauer M *et al.* Hypoxia modulates EWS-FLI1 transcriptional signature and enhances the malignant properties of Ewing's sarcoma cells *in vitro*. *Cancer Res.* 70(10), 4015–4023 (2010).
- 45 Knowles HJ, Schaefer KL, Dirksen U, Athanasou NA. Hypoxia and hypoglycaemia in Ewing's sarcoma and osteosarcoma: regulation and phenotypic effects of Hypoxia-Inducible Factor. *BMC Cancer* 10, 372 (2010).
- **Well-documented paper showing the role of hypoxia and/or hypoglycaemia *in vitro* and *in vivo* on Ewing's sarcoma tumor cells proliferation and apoptosis.**
- 46 Garofalo C, Capristo M, Manara MC *et al.* Metformin as an adjuvant drug against pediatric sarcomas: hypoxia limits therapeutic effects of the drug. *PLoS ONE* 8(12), e83832 (2013).
- 47 Kilic-Eren M, Boylu T, Tabor V. Targeting PI3K/Akt represses Hypoxia inducible factor-1alpha activation and sensitizes Rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma cells for apoptosis. *Cancer Cell Int.* 13(1), 36 (2013).
- 48 Kilic M, Kasperczyk H, Fulda S, Debatin K-M. Role of hypoxia inducible factor-1 alpha in modulation of apoptosis resistance. *Oncogene* 26(14), 2027–2038 (2007).
- 49 MacFarlane M, Robinson GL, Cain K. Glucose – a sweet way to die: metabolic switching modulates tumor cell death. *Cell Cycle Georget. Tex.* 11(21), 3919–3925 (2012).
- 50 Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1833(12), 3448–3459 (2013).
- 51 Jouan-Lanhouet S, Arshad MI, Piquet-Pellorce C *et al.* TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ.* 19(12), 2003–2014 (2012).
- **Provides new insights into TRAIL-induced necroptosis at acidic extracellular pH, with PARP-1 as active effector downstream of RIPK1/RIPK3 initiators.**
- 52 Meurette O, Rebillard A, Huc L *et al.* TRAIL induces receptor-interacting protein 1-dependent and caspase-dependent necrosis-like cell death under acidic extracellular conditions. *Cancer Res.* 67(1), 218–226 (2007).
- 53 Rutkowski P, Kamińska J, Kowalska M, Ruka W, Steffen J. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J. Surg. Oncol.* 84(3), 151–159 (2003).
- 54 Mori T, Sato Y, Miyamoto K *et al.* TNF α promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state. *Oncogene* 33(33), 4236–4241 (2013).
- 55 Abadie A, Besançon F, Wietzerbin J. Type I interferon and TNF α cooperate with type II interferon for TRAIL induction and triggering of apoptosis in SK-N-MC EWING tumor cells. *Oncogene* 23(28), 4911–4920 (2004).
- 56 Abdulghani J, El-Deiry WS. TRAIL receptor signaling and therapeutics. *Expert Opin. Ther. Targets* 14(10), 1091–1108 (2010).
- 57 Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 8(10), 782–798 (2008).
- 58 Walczak H. Death receptor-ligand systems in cancer, cell death, and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5(5), a008698 (2013).
- 59 Herbst RS, Eckhardt SG, Kurzrock R *et al.* Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 28(17), 2839–2846 (2010).
- 60 Leong S, Cohen RB, Gustafson DL *et al.* Mapatumumab, an antibody targeting TRAIL-R1, in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced solid malignancies: results of a phase I and pharmacokinetic study. *J. Clin. Oncol.* 27(26), 4413–4421 (2009).
- 61 Barti-Juhasz H, Mihalik R, Nagy K, Grisendi G, Dominici M, Petak I. Bone marrow derived mesenchymal stem/stromal cells transduced with full length human TRAIL repress the growth of rhabdomyosarcoma cells *in vitro*. *Haematologica* 96(3), e21–22 (2011).
- 62 Grisendi G, Bussolari R, Cafarelli L *et al.* Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res.* 70(9), 3718–3729 (2010).
- 63 Voigt S, Philipp S, Davarnia P *et al.* TRAIL-induced programmed necrosis as a novel approach to eliminate tumor cells. *BMC Cancer* 14, 74 (2014).

Research article

Mesenchymal Stem Cells as stable source of TRAIL: a promising challenge to overcome resistance in pediatric bone tumors?

^{1,2} GUIHO Romain, ^{1,2} BITEAU Kevin, ^{1,2} TAURELLE Julien, ^{1,2} CHATELAIS Mathias, ^{1,2} GANTIER Malika, ³ GRISENDI Gulia, ³ DOMINICI Massimo, ^{1,2} HEYMANN Dominique, ^{1,2} REDINI Françoise

¹INSERM, UMR-957, Equipe labellisée LIGUE contre le CANCER 2012, Nantes, F-44035, France.

²Université de Nantes, EA 3822, Faculté de Médecine, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives, Nantes, F-44035, France.

³Laboratory of Cell Biology and Advanced Cancer Therapies, Department of Medical and Surgical Sciences for Children & Adults, University Hospital of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

Corresponding author:

D^r Françoise REDINI, INSERM UMR957, Faculté de médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France

Tel: +33 2 40 41 29 60; fax: +33 2 40 41 28 60

Email: francoise.redini@univ-nantes.fr

Keywords: TRAIL; osteosarcoma; Ewing's sarcoma; resistance; microenvironment; MSC

Summary

Osteosarcoma (OS) and Ewing's sarcoma (EWS) are the two most common pediatric malignant bone tumors. Patients presenting these diseases have not seen major therapeutic advances during the last thirty years and the survival rate of 70 % at five years for localized tumors still falls to around 20 % in the case of metastatic forms or for patients resistant to chemotherapy. The pro-apoptotic cytokine TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) can selectively kill tumor cells while sparing normal cells, representing a promising therapeutic approach for cancer patients at high risk. However, many models of pediatric bone tumors remain resistant to TRAIL-induced apoptosis. We hypothesize that a trimeric TRAIL presentation at the surface of carrier cells could raise resistance of tumor cells and trigger apoptosis. To that aim, Mesenchymal Stem Cells (MSC) stably transfected to express full length human TRAIL were cocultured with human OS and EWS cells, inducing apoptosis even in cell lines initially resistant to recombinant TRAIL or to AMG655, an antibody agonist to the death receptor DR5. *In vivo*, intratumoral injection of non-transduced MSC accelerates tumor development in several EWS and OS models. On the contrary MSC-TRAIL can inhibit tumor progression in EWS models but not in an OS model. Apoptosis was evidenced *in situ* by caspase induction in EWS cells at the contact of MSC-TRAIL. These results demonstrated the relevance of using MSC as a stable source of TRAIL in EWS models. However, it is not sufficient to overcome the MSC-induced protumoral effect observed in OS.

Introduction

The two most frequent pediatric malignant bone tumors, osteosarcoma (OS) and Ewing's sarcoma (EWS), are both rare cancers, highly metastatic and causing serious disruption of bone remodeling. Osteosarcoma is characterized by the direct formation of osteoid substance by tumor cells derived from osteoblasts [1]. Its incidence peaks during the second decade of life coinciding with the adolescent growth but its pathogenesis is not clearly determined [2]. Ewing's sarcoma is identified by a chromosomal translocation causing the fusion of the *EWS* gene on chromosome 22 and a member of the ETS transcription factors family, more frequently *FLI1* on chromosome 11, leading to the production of a fusion protein which behaves as an aberrant transcription factor [3]. The resulting fusion protein EWS-FLI1 directly or indirectly modulates the expression of many genes, altering several cell functions including

cell cycle (by targeting p21/CDKN1A, Cyclin D and E, p57/KIP2, TGF β - , IGF- or MAPK signaling pathways) or apoptosis (by targeting caspase3 and members of TNF α , IGF-1 and TGF β signaling pathways) [4]. Transformed EWS cells appear as small round and undifferentiated, involved in a major disruption of bone structure with severe osteolytic lesions.

Although both tumors do not have the same origin and the same pathogenesis, the clinical description and therapeutic approach are similar: surgery, neoadjuvant and adjuvant chemotherapy, and radiotherapy for EWS only. The 5 years survival rate has not evolved over the past 30 years and remains at around 70% for localized forms, but falls drastically around 20% for groups of metastatic patients or poor responders to chemotherapy. New avenues of research are opened by the use of TRAIL, a proapoptotic cytokine belonging to the TNF superfamily. TRAIL can bind to five receptors: two death receptors TRAIL-R1 (Death Receptor 4: DR4) and TRAIL-R2 (DR5), and three decoy receptors that do not transmit death signal and can confer resistance toward TRAIL-induced apoptosis: TRAIL-R3 (Decoy Receptor 1: DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) and the soluble osteoprotegerin. TRAIL, by binding to DR4 and DR5 is able to induce apoptosis of tumor cells by activating the recruitment and cleavage of the pro-caspase-8 in a complex called Death-Inducing Signaling Complex (DISC). A cascade of recruitment and activation leads to tumor cell death by the extrinsic pathway of apoptosis. This mechanism can be amplified in some cell types by activation of the intrinsic pathway of apoptosis depending on the mitochondria and the apoptosome. Both pathways lead to the final cleavage of pro-caspase-3 into active caspase-3 [5].

In the early 2000s, it was reported that several cell lines derived from Ewing's sarcoma are sensitive to TRAIL-induced apoptosis *in vitro* [6–8] whereas osteosarcoma cell lines are, for most part, resistant to TRAIL. Based on these studies, complementary experiments in xenograft mice models of Ewing's sarcoma showed that TRAIL or death receptor (DR)5 agonists significantly reduced tumor volume, prevented osteolytic lesions and increased animal survival [9,10]. Concerning osteosarcoma, two publications reported a significant inhibitory effect of TRAIL overexpression in an allograft mouse model [10] and in a xenograft model [11]. However, most of osteosarcoma and Ewing's sarcoma models remain resistant to TRAIL-induced apoptosis. Among the various strategies to increase the TRAIL therapeutic effect, the use of TRAIL carrier cells looks promising [12–18]. Carrying cells are often adipose-derived

mesenchymal stem cells (ad-MSC) modified by vectors encoding human TRAIL. Here, we investigate the therapeutic interest of ad-MSC as TRAIL cellular vectors in several models of pediatric bone tumors.

Materials and Methods

Cells culture

Tumor cell lines. Six human Ewing's sarcoma cell lines (A-673, TC-32, SK-ES-1, and RD-ES cell lines were kindly provided by Dr. S. Burchill (Children's Hospital, Leeds), and EW-24 and TC-71 cell lines by Dr. O. Delattre (INSERM U830, Paris)) and six human osteosarcoma cell lines were used (K-HOS, U-2 OS, MG-63, G-292, SJSA-1 and Saos2, all purchased from the ATCC). Osteosarcoma cell lines and A-673, TC-32, SK-ES-1, and RD-ES cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza) with 5% fetal bovine serum (FBS; Hyclone) and 2 mmol/L L-glutamine. EW-24 and TC-71 cells were cultured in Rosewell Park Millenium Institute (RPMI, Lonza) with 5% FBS and 2 mmol/L L-glutamine.

Mesenchymal Stem Cells. Adipose-Derived (ad)-MSC expressing green fluorescent protein (GFP) and high levels of TRAIL (named respectively MSC-GFP and MSC-TRAIL) were previously described by [15]. Ad-MSC were cultured in α MEM (Lonza) supplemented with 10% FBS, 2 mmol/L L-glutamine and 2ng/mL basic Fibroblast Growth Factor (bFGF).

In Vitro Experiments

Cell Growth, Viability. Two thousand cells per well were seeded into 96-well plates and cultured for 72 h in the presence of increasing concentrations of recombinant human TRAIL (rhTRAIL - R&D Systems). Cell growth and viability was determined by stable tetrazolium salt WST-1 cell proliferation reagent assay kit (Roche, Germany). After the culture period and addition of the WST-1 reagent, the absorbance was then determined at 490 nm. IC50 are calculated thanks to Graph Pad Prism v6.01 software.

Flow cytometry analysis. Ten thousand MSC-TRAIL or MSC-GFP cells were seeded in 6-well plates. The next day, tumors cells were added and co-cultured at the tumor cells/MSC ratio 3:1. After 48h, cells were detached and stained for the AnnexinV assay (BD Bioscience). Percentage of tumor cell apoptosis was quantified by cytometry gating on GFP negative cells with Beckman Coulter FC500 flow cytometer.

Invasion analysis in Boyden chambers. Five thousand MSC TRAIL or MSC GFP were seeded in 24-well plates. The next day, two thousand tumor cells were added in inserts of 3 microns porosity in 24-well plates (BD Bioscience). After 48h, cells in inserts were fixed with 2% Glutaraldehyde (SIGMA) and stained by Crystal Violet. For the calculation of proliferation, inserts were photographed and cell surface were analyzed with imageJ software. The results are reported as percentage of tumor cell proliferation in the presence of MSC-GFP control.

In Vivo Experiments

Ewing's sarcoma and osteosarcoma animal models. Four-week-old Rj:NMRI-nude mice (Janvier breedings - Le Genest-Saint-Isle, France) were housed under pathogen-free conditions at the Experimental

Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA Pays de la Loire n°6) and under the supervision of authorized investigators (protocol authorization n°1281.01). The mice were anesthetized before receiving an intramuscular injection of $1 \cdot 10^6$ TC-71 or A-673 Ewing's sarcoma cells or K-HOS osteosarcoma cells in close proximity to the tibia. The tumor volume (V) was calculated according to the following formula: $V = 0.5 \times \text{length} \times \text{width} \times \text{height}$. Mice were sacrificed when tumor volume reached 1 800 mm³ for ethical reason.

Immunostaining techniques. One million MSC-TRAIL or MSC-GFP are injected in established tumors of approximately 200 mm². After 24h, primary bone tumors were fixed in formalin and embedded in paraffin by conventional techniques. Immunofluorescence double staining with sequential approach was used to demonstrate the simultaneous presence of cleaved-caspase-3 (CC3) and GFP (modified MSC) in the tumor. Tissue sections (3 μ m) were blocked (Blocking reagent 1) and pretreated in pH6 citrate buffer. Slides were incubated at 20°C with CC3 primary antibody then with A957-conjugated secondary antibody. Slides were blocked at 4°C overnight with IgG Fab goat anti-rabbit. Sections were incubated at 20°C with GFP primary antibody then with A488-conjugated secondary antibody. Slides were mounted in Prolong Gold antifading reagent with DAPI (Molecular Probes – P36935). Antibodies and blocking reagent used in this study are listed in Supplementary Table II.

Fluorescence microscopy. Fluorescence was visualized by using Axiovert 200 M microscopy system (Zeiss, Le Pecq, France) with ApoTome module (x63) or with a fluorescent slide scanner (Nanozoomer, Hamamatsu).

Statistical analyses

Each experiment was repeated independently 3 times. Results are given as a mean \pm SD for *in vitro* experiments and mean \pm SEM for *in vivo* experiments. They were compared using unpaired t test or two-way ANOVA followed respectively by the Bonferroni posttest or the Tukey's multiple comparisons test using Graph Pad Prism v6.01 software. Results with $p < 0.05$ were considered significant and represented by an asterisk (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)

Results

Osteosarcoma and Ewing's sarcoma cell lines are sensitive to TRAIL by direct contact with MSC-TRAIL. Proliferation assay in the presence of rhTRAIL shows that all studied cell lines do not respond to the same extent to rhTRAIL (**Figure 1A**): Ewing's sarcoma cell lines TC-71 and RD-ES are very sensitive to the proapoptotic effect of rhTRAIL (IC50 < 200ng/mL), the MG-63, G-292 (osteosarcoma) and A-673 (Ewing's sarcoma) cell lines are less responsive with an IC50 < 1000ng/mL. The other cell lines: K-HOS Saos2, SJSA-1, U-2 OS (osteosarcoma) and EW-24, SK-ES-1, TC-32 (Ewing's sarcoma) are resistant to rhTRAIL (IC50 >1000ng/mL). However, all cell lines are sensitive to apoptosis induced by direct contact with MSC-TRAIL (**Figure 1B**), but at different levels, independently of their sensitivity to rhTRAIL. Indeed, some of the Ewing's sarcoma cell lines sensitive to rhTRAIL are also highly sensitive to MSC-TRAIL (TC-71, RD-ES, A-673), but the EW-24 rhTRAIL-resistant cell line is equally sensitive to MSC-TRAIL.

Osteosarcoma cell lines are globally less sensitive than Ewing's sarcoma, including the MG-63 cell line. The K-HOS line is the

osteosarcoma cell line the most sensitive to MSC-TRAIL. The sensitivity is illustrated in **Figure 1C**, where K-HOS cells form apoptotic bodies and die after eight hour of contact with the MSC-TRAIL while they continue to proliferate at the contact of control MSC-GFP.

The amount of TRAIL secreted by MSC-TRAIL is not sufficient to induce osteosarcoma and Ewing's sarcoma cell line apoptosis. Boyden chambers assay shows that the amount of TRAIL secreted by MSC-TRAIL is not sufficient to reduce the proliferation of all tested cell lines (**Figure 1D**), tumor cells in Boyden chambers overhanging MSC-TRAIL do not slow their proliferation as compared to tumor cells in Boyden chambers overhanging MSC-GFP (illustration for K-HOS lines and TC-71 in **Figure 1E**). These results confirm that a direct contact between tumor cells and MSC-TRAIL is necessary to induce cell death.

Co-injection of MSC-TRAIL with TC-71 Ewing's sarcoma cells slows tumor progression *in vivo*. Because TC-71 cells have shown high sensitivity to rhTRAIL and MSC-TRAIL *in vitro*, we have developed a tumor model induced by these cells to analyze the effect of MSC-TRAIL *in vivo*. One million TC-71 cells alone or combined with 1 million of MSC-TRAIL or MSC-GFP are injected at Day 0 (D0). The group inoculated with MSC-GFP shows the same tumor progression as the control group, whereas the group injected with MSC-TRAIL presented a significant slowdown of tumor growth of 75% from D20 (**Figure 2A & B**). However, all mice of the MSC-TRAIL group developed tumors (**Figure 2B**), coinjection with MSC-TRAIL is not sufficient to completely abolish the tumor occurrence. As a consequence, the survival rate (calculated when tumor volume reached 1500 mm³) was significantly upregulated in the group co-injected with MSC-TRAIL and TC-71 cells (**Figure 2C**).

Co-injection of MSC-GFP and A-673 Ewing's sarcoma cells accelerates tumor progression *in vivo*. MSC-TRAIL are able to counteract this effect and slowdown tumor progression. One million A-673 cells alone or co-injected with 1 million of MSC-TRAIL or MSC-GFP are injected in close proximity of the tibia in nude mice at D0. Unlike the TC-71 model, the group co-injected with MSC-GFP shows a significant acceleration of tumor progression as compared to the control group (**Figure 3A and B**). Despite this, the co-injection with MSC-TRAIL succeeded in controlling tumor growth: until day 20, tumors are barely detectable in the MSC-TRAIL group with a tumor volume less than 80 mm³ (**Figure 3A and B**). But, as for the first model, all mice will develop a tumor after D20. As a consequence, the survival rate was significantly augmented in the group co-injected with MSC-TRAIL and A-673 cells (**Figure 3C**).

Both Ewing's sarcoma mouse models do not develop metastasis, so we cannot conclude on the effect of MSC-TRAIL on the occurrence of metastasis in these models.

MSC-TRAIL induce apoptosis of adjacent Ewing's sarcoma tumor cells. To investigate the effect of TRAIL-MSC *in situ*, mice are injected with A-673 cells to develop a tumor. When the tumor volume reaches 200 mm³, one million MSC-GFP or MSC-GFP are injected in the tumor. Histo-immunofluorescence analysis of the EWS model shows that MSC-TRAIL injected in the tumor are able to induce apoptosis of adjacent A-673 Ewing's sarcoma cells, as, revealed by the detection of cleaved caspase-3 (**Figure 4A**). This effect remains local, as the presence of active caspase-3 is only localized around the injected MSC-TRAIL on a total histological section (**Figure 4B**). MSC-GFP do not induced apoptosis in adjacent tumor cells.

Co-injection of MSC-GFP in the K-HOS osteosarcoma model accelerates tumor progression, and MSC-TRAIL cannot counteract this effect. One million K-HOS cells alone or combined with 1 million of MSC-TRAIL or MSC-GFP are injected at D0. Groups injected with MSC-GFP and with MSC-TRAIL both show a significant acceleration of tumor growth, respectively 100% and 25% higher than the control group (**Figure 5A and B**). Consequently, no benefit of MSC-TRAIL was observed in the survival rate (**Figure 5C**). In addition, there is no difference of lung metastases occurrence between the three groups (**Figure 5D**).

MSC-TRAIL do not induce apoptosis of adjacent osteosarcoma tumor cells. In the K-HOS osteosarcoma model, histo-immunofluorescence analysis confirms that no activation of caspase-3 could be observed around the MSC-TRAIL (**Figure 6A and B**). MSC-GFP do not induced apoptosis in adjacent tumor cells.

Discussion

The ability of TRAIL to induce tumor apoptosis and death without affecting normal cells makes it a very interesting molecule for tumor therapy. However, many types of cancer remain resistant to TRAIL, including sarcomas [19]. Finding relevant strategies to overcome this resistance is essential to propose new therapeutic options to patients.

Mesenchymal stem cells can be engineered to express TRAIL and an earlier study has demonstrated that these cells can induce apoptosis of three sarcomas cell lines (Saos-2: osteosarcoma, RDS: rhabdomyosarcoma, RD-ES: Ewing's sarcoma) by activation of caspase-8 [20] thus paving the way for a proposal of MSC-TRAIL-based therapies in these diseases. Here, we demonstrate that these cells are able to induce apoptosis in a wide panel of osteosarcoma and Ewing's sarcoma cell lines *in vitro* via the apoptotic pathway. Indeed, all tested cell lines are sensitive to the apoptosis induced by MSC-TRAIL, so the extrinsic apoptosis signaling pathway is functional in all these cell lines. However, some of these lines are resistant to relatively high amount of recombinant TRAIL. To explain this paradox, we suggest the ability of MSC-TRAIL to induce a high clustering of death receptors at the surface of tumor cells, multiplying the downstream activation of caspase-8. Study with Liposome-bound TRAIL demonstrate that a superior DR5 clustering enhances DISC formation and trigger caspase activation more efficiently than the soluble form of TRAIL [21]. In addition, a second TRAIL signaling pathway was recently described involving NF- κ B, MAPK, PI3K/Akt activation via binding to the same receptors, but leading to increased tumor cell proliferation, survival, migration and invasion (reviewed in [22]). The key regulator of this kinase network is the RIPK1 protein which binds FADD instead of caspase-8, inducing the formation of a secondary signaling complex composed of TRADD, TRAF2 and RIPK1. We hypothesize that rhTRAIL can activate this secondary pathway that counteracts its proapoptotic effect, whereas MSC-TRAIL and death receptors high clustering may associate several caspase-8 molecules which overcome the formation of the RIPK1-TRADD-TRAF2 complex. The fact that only tumor cells in direct contact with the MSC-TRAIL *in vitro* and *in vivo* die by apoptosis supports this hypothesis of high level of death receptor clustering necessary for apoptosis induction *via* DISC formation.

A previous study showed that MSC-TRAIL exert an antitumor activity against a subcutaneous xenograft model of RD-ES Ewing's sarcoma cells [20]. In these pathologies closely related to bone microenvironment, more relevant orthotopic models were used in

this study to take into account this particular tumor environment. Although Ewing's sarcoma progression can be slowed down by MSC-TRAIL in the corresponding preclinical models, the K-HOS osteosarcoma model is resistant *in vivo*, even if a pro-apoptotic effect is observed in coculture *in vitro*. To explain this discrepancy, we can formulate a hypothesis based on the particular bone tumor microenvironment of osteosarcoma which may provide a favorable niche for TRAIL resistance, due to hypoxia, extracellular acidic pH or inflammation [23]. Studies have reported that primary osteosarcoma exhibit an accumulation of the HIF-1 α transcription factor [24] followed by an extension of tumor cell survival, resistance to proapoptotic treatments such as TRAIL [25]. Accelerated release of protons by highly activated osteoclasts near the tumor site acidifies substantially the microenvironment. The acidic extracellular pH is an important parameter which may impact tumor cells to TRAIL sensitivity [26]. All these parameters could explain the lack of apoptosis in the K-HOS model.

In both A-673 Ewing's sarcoma and K-HOS osteosarcoma models, MSC-GFP significantly enhance tumor progression. Several studies have already reported that MSCs promote tumor growth, particularly by increasing angiogenesis and releasing chemokines [27–29]. This effect observed in osteosarcoma syngeneic mouse models [30] seems to be an obstacle to the use of MSCs as therapeutic tools in bone tumor pathologies. However, other results suggest on the contrary that MSCs inhibit tumor growth especially by inhibiting the Wnt pathway [31–33]. A concise review sorts out both MSC pro- or anti-tumor effect described in the literature on different solid tumors [34]. Understanding the conditions in which MSCs enhance tumor growth is crucial to safely develop MSCs as a therapeutic tool. Furthermore, the highly inflammatory microenvironment of pediatric bone tumors may also play a role in a potential malignant transformation of the injected MSCs. Indeed, it has been shown recently that IFN- γ and TNF- α synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis [35]. This MSC transformation could then act as a support for tumor growth.

It has been shown that MSCs expressing TRAIL were able to reduce the incidence of lung metastases in carcinoma models [16]. However, this effect was not observed in the K-HOS osteosarcoma model used in this study. Concerning Ewing's sarcoma mouse models, they are too aggressive with a rapid progression which did not allow sufficient time to develop spontaneous metastases so we cannot conclude on the effect of MSC-TRAIL on the occurrence of metastasis in these models.

Conclusion

In conclusion, we demonstrated a limited MSC-TRAIL therapeutic efficacy in several models of pediatric bone tumors. Although promising results were obtained in Ewing's sarcoma models co-injected with MSC-TRAIL, osteosarcoma remains resistant *in vivo* to the TRAIL carrying cells. Because MSCs exert by themselves a pro-tumor potential in our conditions, TRAIL cannot counterbalance this effect in the osteosarcoma K-HOS model. However, the use of MSC-TRAIL evidenced that a high death receptor clustering is able to induce apoptosis in cell lines initially resistant to rhTRAIL *in vitro*. This clustering strategy is very promising and must be conducted with more neutral TRAIL vectors, such as new TRAIL death receptor agonists able to bind six receptors [36].

Highlights

- TRAIL carried by Mesenchymal Stem Cells induces pediatric bone tumors cell apoptosis *in vitro*
- The MSC-TRAIL slows down tumor development in several Ewing's sarcoma *in vivo* models
- In the particular bone tumor microenvironment, MSCs exert by themselves a pro-tumor potential
- TRAIL expression cannot counteract the MSC-induced pro-tumoral effect in an osteosarcoma model
- TRAIL-based therapies are promising in bone sarcomas but vectors must be chosen carefully

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgements

This study has received funding from LA LIGUE CONTRE LE CANCER. This project was realized thanks to the support of the FÉDÉRATION ENFANTS ET SANTÉ and of the SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE LUTTE CONTRE LES CANCERS ET LES LEUCÉMIES DE L'ENFANT ET DE L'ADOLESCENT. This project was conducted with financial support of the association ÉTOILE DE MARTIN.

References

- [1] Mutsaers AJ, Walkley CR. Cells of origin in osteosarcoma: Mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone* 2014;62C:56–63. doi:10.1016/j.bone.2014.02.003.
- [2] Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer J Int Cancer* 2009;125:229–34. doi:10.1002/ijc.24320.
- [3] Pinto A, Dickman P, Parham D. Pathobiologic markers of the Ewing sarcoma family of tumors: state of the art and prediction of behaviour. *Sarcoma* 2011;2011:856190. doi:10.1155/2011/856190.
- [4] Stoll G, Surdez D, Tirode F, Laud K, Barillot E, Zinovyev A, et al. Systems biology of Ewing sarcoma: a network model of EWS-FLI1 effect on proliferation and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2013;41:8853–71. doi:10.1093/nar/gkt678.
- [5] Özören N, El-Deiry WS. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia N Y N* 2002;4:551–7. doi:10.1038/sj.neo.7900270.
- [6] Kontny HU, Hämmerle K, Klein R, Shayan P, Mackall CL, Niemeyer CM. Sensitivity of Ewing's sarcoma to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2001;8:506–14. doi:10.1038/sj.cdd.4400836.
- [7] Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades C, Tsokos M. Ewing's sarcoma family tumors are sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and express death receptor 4 and death receptor 5. *Cancer Res* 2001;61:2704–12.
- [8] Van Valen F, Fulda S, Truckenbrod B, Eckervogt V, Sonnemann J, Hillmann A, et al. Apoptotic responsiveness of the Ewing's sarcoma family of tumours to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Int J Cancer J Int Cancer* 2000;88:252–9.
- [9] Merchant MS, Yang X, Melchionda F, Romero M, Klein R, Thiele CJ, et al. Interferon gamma enhances the effectiveness of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonists in a xenograft model of Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2004;64:8349–56. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1705.

- [10] Picarda G, Lamoureux F, Geffroy L, Delepine P, Montier T, Laud K, et al. Preclinical evidence that use of TRAIL in Ewing's sarcoma and osteosarcoma therapy inhibits tumor growth, prevents osteolysis, and increases animal survival. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2010;16:2363–74. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779.
- [11] Li C, Chunbao L, Cheng Q, Qianpeng C, Liu J, Jia L, et al. Potent growth-inhibitory effect of TRAIL therapy mediated by double-regulated oncolytic adenovirus on osteosarcoma. *Mol Cell Biochem* 2012;364:337–44. doi:10.1007/s11010-012-1235-9.
- [12] Barti-Juhasz H, Mihalik R, Nagy K, Grisendi G, Dominici M, Petak I. Bone marrow derived mesenchymal stem/stromal cells transduced with full length human TRAIL repress the growth of rhabdomyosarcoma cells in vitro. *Haematologica* 2011;96:e21–22. doi:10.3324/haematol.2010.036822.
- [13] Carlo-Stella C, Lavazza C, Nicola MD, Cleris L, Longoni P, Milanese M, et al. Antitumor Activity of Human CD34+ Cells Expressing Membrane-Bound Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand. *Hum Gene Ther* 2006;17:1225–40. doi:10.1089/hum.2006.17.1225.
- [14] Ciavarella S, Grisendi G, Dominici M, Tucci M, Brunetti O, Dammacco F, et al. In vitro anti-myeloma activity of TRAIL-expressing adipose-derived mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2012;157:586–98. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09082.x.
- [15] Grisendi G, Bussolari R, Cafarelli L, Petak I, Rasini V, Veronesi E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res* 2010;70:3718–29. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1865.
- [16] Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, Janes SM. Mesenchymal Stem Cell Delivery of TRAIL Can Eliminate Metastatic Cancer. *Cancer Res* 2009;69:4134–42. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4698.
- [17] Mohr A, Lyons M, Deedigan L, Harte T, Shaw G, Howard L, et al. Mesenchymal stem cells expressing TRAIL lead to tumour growth inhibition in an experimental lung cancer model. *J Cell Mol Med* 2008;12:2628–43. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00317.x.
- [18] Yuan Z, Kolluri KK, Sage EK, Gowers KHC, Janes SM. Mesenchymal stromal cell delivery of full-length tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is superior to soluble type for cancer therapy. *Cytotherapy* 2015. doi:10.1016/j.jcyt.2015.03.603.
- [19] Picarda G, Trichet V, Téletchéa S, Heymann D, Rédini F. TRAIL receptor signaling and therapeutic option in bone tumors: the trap of the bone microenvironment. *Am J Cancer Res* 2012;2:45–64.
- [20] Grisendi G, Spano C, D'souza N, Rasini V, Veronesi E, Prapa M, et al. Mesenchymal progenitors expressing TRAIL induce apoptosis in sarcomas. *Stem Cells Dayt Ohio* 2015;33:859–69. doi:10.1002/stem.1903.
- [21] De Miguel D, Gallego-Lleyda A, Anel A, Martinez-Lostao L. Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells. *Leuk Res* 2015. doi:10.1016/j.leukres.2015.03.019.
- [22] Azijli K, Weyhenmeyer B, Peters GJ, de Jong S, Kruyt FAE. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ* 2013;20:858–68. doi:10.1038/cdd.2013.28.
- [23] Guiho R, Biteau K, Heymann D, Redini F. TRAIL-based therapy in pediatric bone tumors: how to overcome resistance. *Future Oncol Lond Engl* 2015;11:535–42. doi:10.2217/fon.14.293.
- [24] Knowles HJ, Schaefer K-L, Dirksen U, Athanasou NA. Hypoxia and hypoglycaemia in Ewing's sarcoma and osteosarcoma: regulation and phenotypic effects of Hypoxia-Inducible Factor. *BMC Cancer* 2010;10:372. doi:10.1186/1471-2407-10-372.
- [25] Garofalo C, Capristo M, Manara MC, Mancarella C, Landuzzi L, Belfiore A, et al. Metformin as an adjuvant drug against pediatric sarcomas: hypoxia limits therapeutic effects of the drug. *PLoS One* 2013;8:e83832. doi:10.1371/journal.pone.0083832.
- [26] Jouan-Lanhouet S, Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Martin-Chouly C, Le Moigne-Muller G, Van Herreweghe F, et al. TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ* 2012;19:2003–14. doi:10.1038/cdd.2012.90.
- [27] Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007;449:557–63. doi:10.1038/nature06188.
- [28] Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev* 2008;17:463–73. doi:10.1089/scd.2007.0181.
- [29] Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* 2006;80:267–74. doi:10.1016/j.yexmp.2005.07.004.
- [30] Perrot P, Rousseau J, Bouffaut A-L, Rédini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, et al. Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS One* 2010;5:e10999. doi:10.1371/journal.pone.0010999.
- [31] Qiao L, Xu Z-L, Zhao T-J, Ye L-H, Zhang X-D. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett* 2008;269:67–77. doi:10.1016/j.canlet.2008.04.032.
- [32] Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, et al. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res* 2008;18:500–7. doi:10.1038/cr.2008.40.
- [33] Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 2009;23:925–33. doi:10.1038/leu.2008.384.
- [34] Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells Dayt Ohio* 2011;29:11–9. doi:10.1002/stem.559.
- [35] Wang L, Zhao Y, Liu Y, Akiyama K, Chen C, Qu C, et al. IFN- γ and TNF- α synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NF κ B signaling. *Stem Cells Dayt Ohio* 2013;31:1383–95. doi:10.1002/stem.1388.
- [36] Gieffers C, Kluge M, Merz C, Sykora J, Thiemann M, Schaal R, et al. APG350 induces superior clustering of TRAIL receptors and shows therapeutic antitumor efficacy independent of cross-linking via Fc γ receptors. *Mol Cancer Ther* 2013;12:2735–47. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0323.

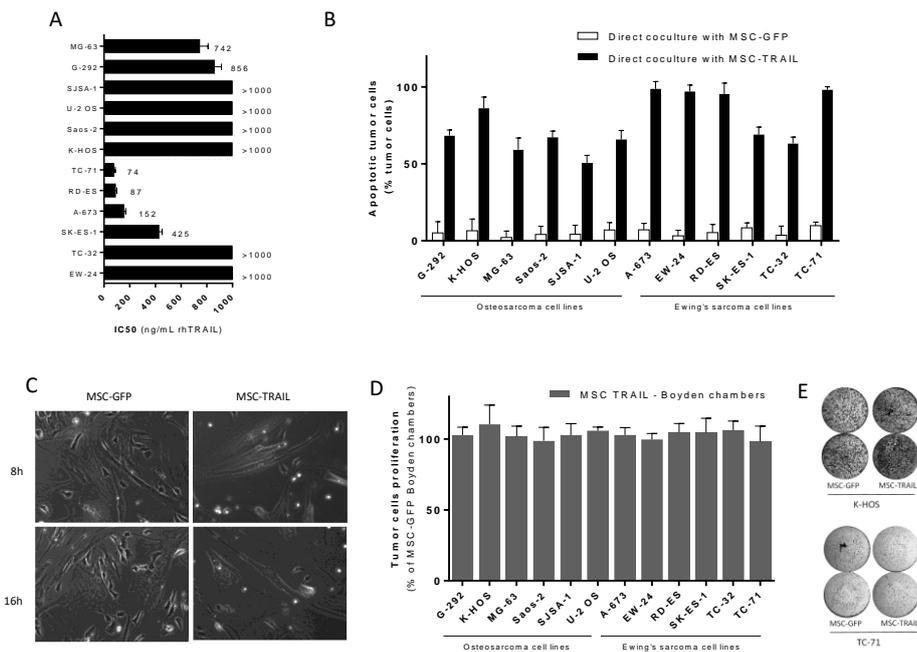


Figure 1. In vitro comparison of rhTRAIL and MSC-TRAIL effects on Ewing's sarcoma and osteosarcoma cells.

A. rhTRAIL IC₅₀ was evaluated in OS and EWS cell lines by WST-1 proliferation assay after 72h of culture.

B. Apoptosis of OS and EWS cell lines cocultured with MSC-GFP (light bars) or MSC-TRAIL (dark bars) was analyzed by AnnexinV cytometry assay after 48h of culture.

C. Microscopy observation of MSC-GFP or MSC-TRAIL coculture with K-HOS osteosarcoma cells resistant to rhTRAIL (ratio tumor cell/MSC of 3:1), at 8h or 16h after contact.

D. Tumor cell proliferation in Boyden chambers overhanging MSC-TRAIL during 48h was evaluated by crystal violet staining and reported as percentage of Boyden chambers overhanging MSC-GFP.

E. K-HOS and TC-71 colonies on Boyden chambers overhanging MSC-TRAIL or MSC-GFP after 48h of culture are stained by crystal violet.

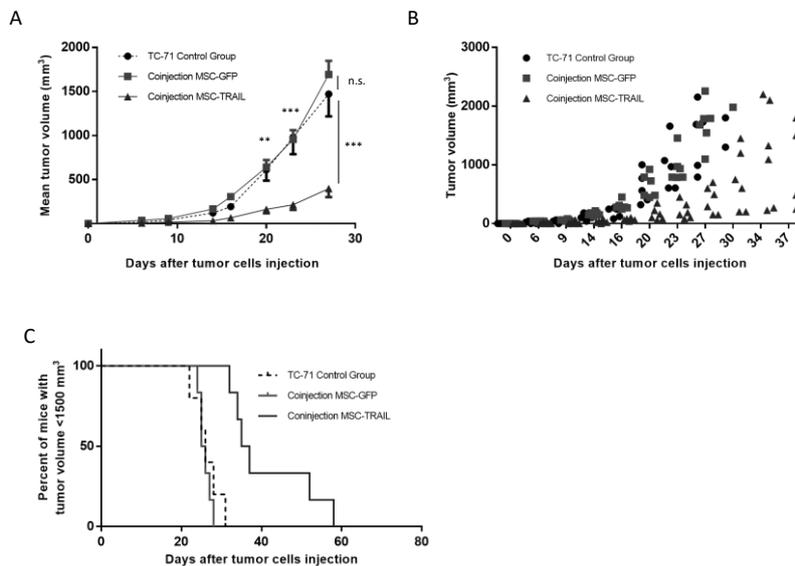


Figure 2. MSC-TRAIL co-injection prevents tumor development and increases mouse survival in the TC-71 Ewing's sarcoma orthotopic xenograft model. Three groups of six mice were injected with 1 million TC-71 cells with or without 1 million MSC-GFP or -TRAIL as described in the "Materials and Methods" section.

A. Mean tumor volume per group

B. Tumor volumes of individual mouse

C. Percentage of mice with tumor volume lower than 1500 mm³ rates for the three groups. (** p < 0.005; *** p < 0.001)

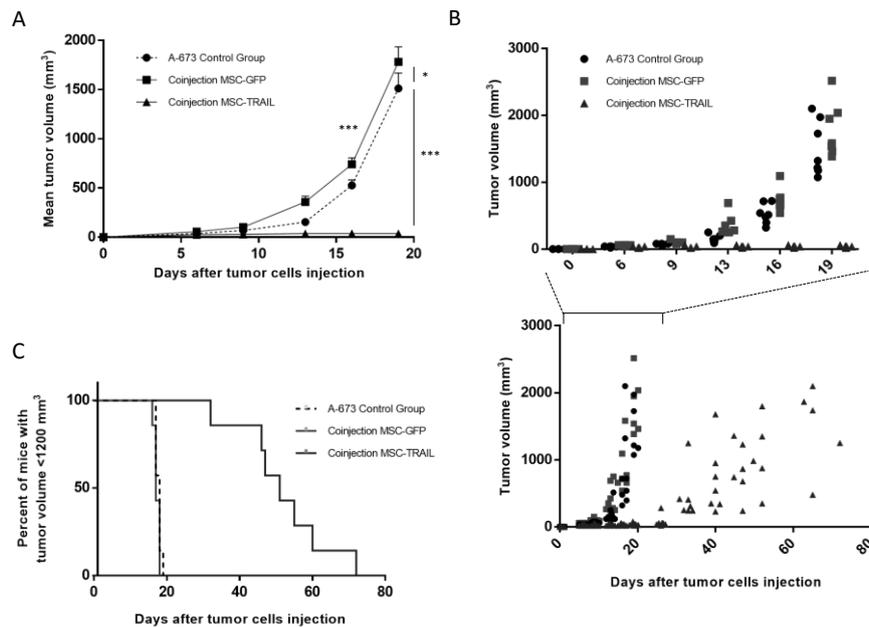


Figure 3. MSC-TRAIL co-injection prevents tumor development and increases mouse survival, whereas the MSC-GFP increases tumor development in the A-673 Ewing's sarcoma orthotopic xenograft model. Three groups of six mice were injected with 1 million A-673 cells with or without 1 million MSC-GFP or -TRAIL as described in the "Materials and Methods" section.

A. Mean tumor volume per group

B. Tumor volumes of individual mouse over a 20-days period (upper section) or over a 80-days period (lower section)

C. Percentage of mice with tumor volume lower than 1200 mm³ rates for the three groups. (* p < 0.01; *** p < 0.001)

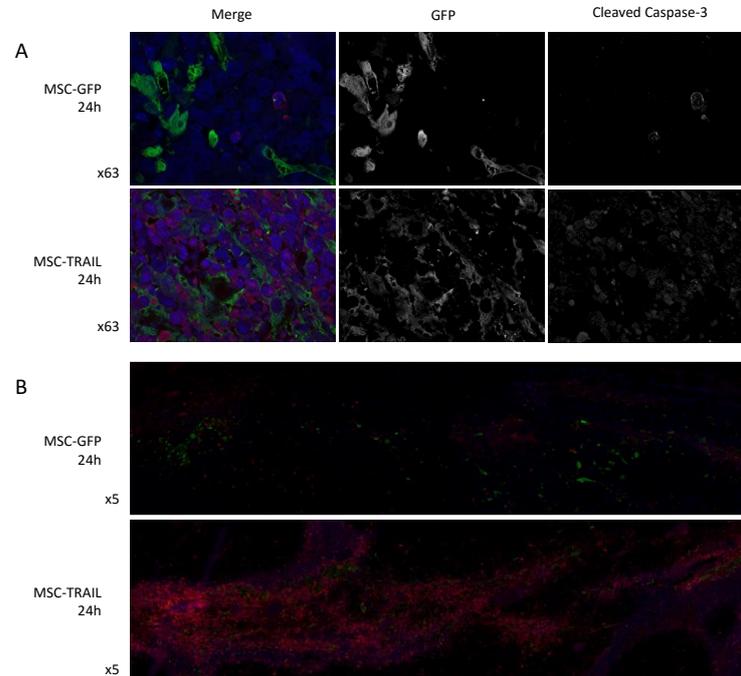


Figure 4. MSC-TRAIL induce adjacent cell apoptosis in the A-673 Ewing's sarcoma orthotopic xenograft model. One million MSC-TRAIL or MSC-GFP are injected in established A-673 tumors. After 24h, mice were sacrificed and bone tumors were fixed, embedded in paraffin and an immunofluorescence double staining was performed to analyze the simultaneous presence of cleaved-caspase-3 (red) and GFP (green). Nuclei are stained blue with DAPI.

A: Apotome microscopy system x63 B: Fluorescent slide scanner (x5)

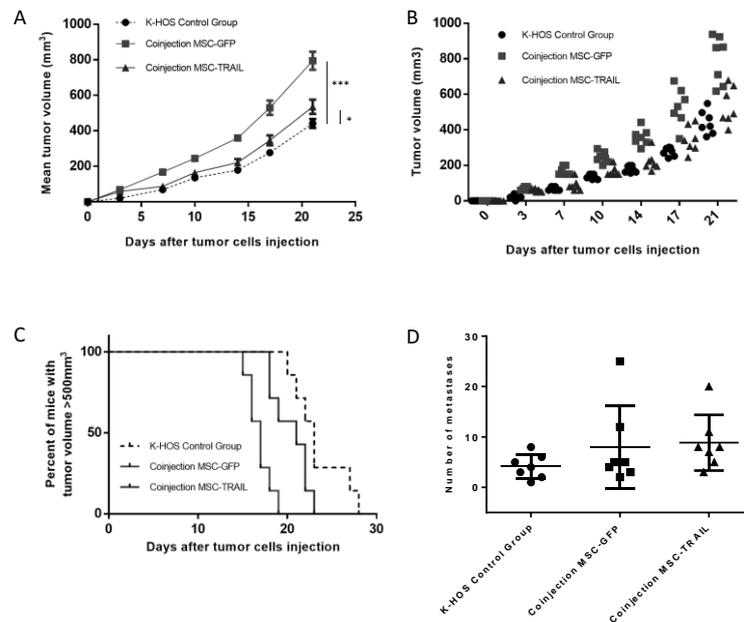


Figure 5. MSC-TRAIL and MSC-GFP increase tumor development in the K-HOS osteosarcoma orthotopic xenograft model. Three groups of seven mice were injected with 1 million K-HOS cells with or without 1 million MSC-GFP or TRAIL as described in the “Materials and Methods” section.

A. Mean tumor volume per group

B. Tumor volumes of individual mouse

C. Percentage of mice with tumor volume lower than 500 mm³ rates for the three groups.

D. Number of lung metastasis for individual mouse of the three group (* $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

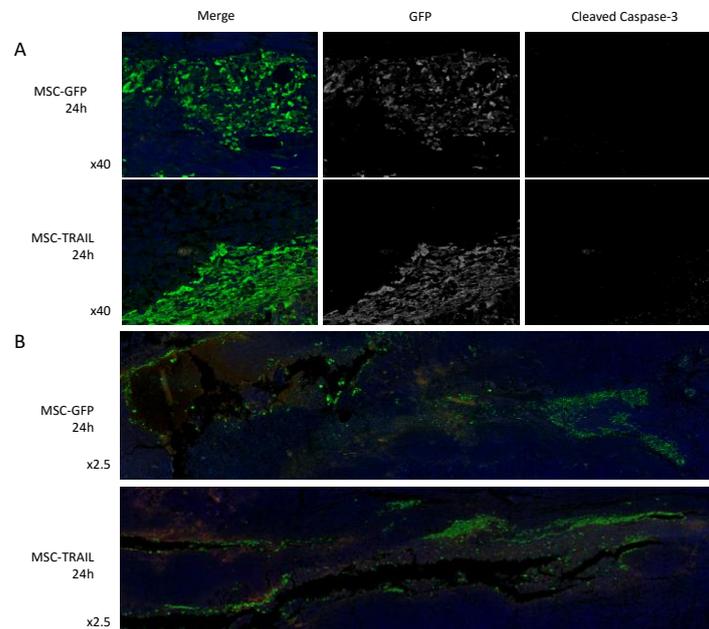


Figure 6. MSC-TRAIL do not induce adjacent cell apoptosis in the K-HOS osteosarcoma orthotopic xenograft model. One million MSC-TRAIL or MSC-GFP are injected in established K-HOS tumors. After 24h, mice were sacrificed and bone tumors were fixed, embedded in paraffin and an immunofluorescence double staining was performed to analyze the presence of cleaved-caspase-3 (red) together with GFP (green). Nuclei are stained blue with DAPI.

A: Fluorescent slide scanner x40

B: Fluorescent slide scanner (x2,5)

Thèse de Doctorat

Romain GUIHO

Thérapies impliquant la voie de TRAIL dans les tumeurs osseuses pédiatriques: mécanismes de résistance et approches précliniques pour une (re-)sensibilisation

TRAIL-based therapeutics in pediatric bone tumors: resistance mechanisms and preclinical (re-)sensitization approaches

L'ostéosarcome (OS) et le sarcome d'Ewing (SE) sont les deux tumeurs osseuses pédiatriques les plus fréquentes. Malgré des avancées thérapeutiques, dans le cas d'une tumeur métastatique ou résistante à la chimiothérapie, le taux de survie à cinq ans est de 20%. Les propriétés de mort sélective des cellules tumorales par la cytokine pro-apoptotique TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) permettent d'envisager une nouvelle approche thérapeutique pour ces patients à haut risque.

Néanmoins, l'étude de la sensibilité à TRAIL de nombreuses lignées cellulaires et de plusieurs modèles de xénotransgreffe chez la souris Nude, a montré l'existence de phénomènes de résistance à la voie pro apoptotique de TRAIL, mais aussi la capacité des cellules tumorales à privilégier une deuxième voie de signalisation de TRAIL, induisant survie et prolifération. L'objectif de notre étude est d'identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la résistance à TRAIL pour ces pathologies afin de proposer des stratégies de sensibilisation par des approches *in vitro* et *in vivo*.

Nos stratégies de sensibilisation s'appuient sur deux hypothèses : 1) le rôle globalement négatif du microenvironnement osseux sur la sensibilité à TRAIL, avec l'utilisation de molécules ciblant le microenvironnement potentiellement sensibilisantes (agents de chimiothérapie, bisphosphonates,...). 2) L'utilisation de nouveaux outils d'activation de la voie de TRAIL, dotés d'une plus grande capacité à induire la « clusterisation » des récepteurs de surface, favorisant ainsi la voie proapoptotique.

TRAIL ; Résistance ; Sarcome d'Ewing ; Ostéosarcome

Osteosarcoma (OS) and Ewing's sarcoma (EWS) are the two most common pediatric bone tumors. Despite therapeutic advances, in the case of a metastatic tumor or a resistant to chemotherapy, the survival rate at five years is 20%. Pro-apoptotic cytokine TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) can selectively kill tumor cells and could be a new therapeutic approach for these high-risk patients.

However, the study of many cell lines and several xenograft models in nude mice for TRAIL sensitivity, showed the existence of resistance phenomena to the TRAIL pro-apoptotic pathway, but also the ability of tumor cells to favor a second TRAIL signaling pathway, inducing survival and proliferation. The aim of our study is to identify molecular mechanisms involved in TRAIL resistance in these diseases, to offer sensitization strategies, with *in vitro* and *in vivo* approaches.

Our sensitization strategies are based on two hypothesis: 1) the negative role of bone tumor microenvironment on TRAIL sensitivity, with the use of potentially sensitizing molecules targeting the microenvironment (chemotherapy agents, bisphosphonates ...). 2) The use of new activation tools of TRAIL pathway, with greater ability to induce surface receptors clusterization, thus promoting the proapoptotic pathway.

TRAIL, Resistance, Ewing's sarcoma, Osteosarcoma