

Thèse de doctorat de

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Cancérologie

Par Vincent CRENN

Impact du microenvironnement et de la vascularisation tumorale dans la réponse de l'ostéosarcome à la chimiothérapie

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 29 mars 2021

Unité de recherche : Laboratoire PhyOs, INSERM UMR1238, Sarcomes osseux et remodelage des tissus calcifiés

Rapporteurs avant soutenance :

Natacha Entz-Werlé
Marie-Hélène Lafage-Proust

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU Strasbourg
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU Saint Etienne

Composition du Jury :

Présidente : Anne Brouchet

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU Toulouse

Examineurs : Anne Brouchet
Rosset Philippe
Corre Isabelle
Potiron Vincent

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU Toulouse
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU Tours
Chercheur laboratoire PhyOs, INSERM UMR 1238
Ingénieur de recherche, laboratoire CRCINA, INSERM UMR 1232

Dir. de thèse : Françoise Redini
Co-encadrant François Guoin

Directrice de recherche, laboratoire PhyOs INSERM UMR 1238
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Centre Léon Bérard Lyon



Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire
PHY-OS, INSERM UMR 1238,
Sarcomes osseux et remodelage des tissus calcifiés,
Faculté de Médecine de Nantes.



UNIVERSITÉ DE NANTES

Remerciements

A Madame Françoise Redini. Merci de m'avoir encadré pour ce travail et accueilli dans le laboratoire. Merci pour vos conseils, votre patience, et votre confiance. Merci de m'avoir accordé la possibilité de mener à bien ce projet malgré mon activité clinique. Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur François Guoin. Merci de m'avoir co-encadré pour cette thèse et de m'avoir encouragé à la débiter. Merci de votre soutien, vous m'avez transmis votre passion pour la prise en charge des tumeurs musculo-squelettiques. Merci aussi de m'accueillir à Lyon pour y parfaire mes connaissances. Que ce travail soit le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Madame Isabelle Corre. Merci pour ta gentillesse, et le partage de tes connaissances. Ce travail n'aurait pas été possible sans ton aide. Merci de m'avoir guidé, de m'avoir conseillé. Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance.

A Madame le Professeur Anne Brouchet. Merci de votre encouragement et de vos conseils depuis le début de ce travail, et merci pour les collaborations à venir. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.

A Monsieur Vincent Potiron. Merci d'accompagner ce travail depuis son commencement, merci de tes conseils. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur Philippe Rosset. Merci de votre présence éclairante au sein du grand Ouest. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.

A Madame le Professeur Marie-Hélène Lafage-Proust. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

A Madame le Professeur Natacha Entz-Werlé. Merci également d'avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur Jérôme Amiaud. Ce travail n'aurait pas vu le jour sans ton aide précieuse. Merci de tes lumières pour les analyses histologiques. Merci. Que cette thèse soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon amitié.

A Monsieur Kevin Biteau. Merci pour ton aide précieuse concernant l'élaboration des modèles, et la culture cellulaire.

A Madame le Docteur Anne Moreau. Merci pour les analyses histologiques sur tissu humain. Merci pour vos explications et votre aide.

A Régis Brion, Céline Charrier, Séverine Battaglia, Luciano Vidal... et tous les tous les membres du laboratoire qui m'ont toujours bien accueilli.

A Denis Waast, et Sophie Touchais, pour m'avoir permis de moduler mon activité ces derniers mois. Votre soutien m'a permis de mener à bien ce travail. Je vous en suis très reconnaissant.

A mes jeunes collègues orthopédistes : Yoann, François, Yonis. Merci de votre aide et de votre soutien.

A mes collègues et orthopédistes, Guy, Marc, Guillaume, merci de vos enseignements.

A Christophe Nich, pour avoir repris l'activité universitaire à Nantes, et pour son soutien dans mon parcours.

A Sylvain Briand, pour ses enseignements, et des blocs inoubliables.

A Louis-Romée et Jean-Camille pour leur présence au sein des Jeunes Boulistes Francophones.

A Pierre Kubicek, Chloé Dumars pour leur implication sur a thématique du microenvironnement qui a permis ce travail.

Aux malades et à leurs proches,

A Jean-Claude particulièrement,

A Maëlle,

A mon père et mon grand-père, pour m'avoir transmis le virus de la médecine.

A Monique,

A ma mère,

A Sabrina pour sa patience et son amour,

A Hector,

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	13
TABLE DES ILLUSTRATIONS	17
INTRODUCTION	23
L'OSTEOSARCOME	23
GENERALITES ET EPIDEMIOLOGIE:	23
Epidémiologie	23
Présentation clinique	24
Aspect à l'imagerie	25
Diagnostic	26
Caractéristiques tumorales générales	27
PATHOGENESE :	29
Rôle de la croissance	30
Facteur environnementaux	32
Facteurs génétiques	32
FACTEURS PRONOSTICS ET ANALYSE ANATOMOPATHOLOGIQUE :	35
Facteurs cliniques et biologiques	36
Facteurs histologiques	37
Limites des facteurs pronostics	42
TRAITEMENT :	44
Chirurgie	45
Généralités	46
Thérapeutiques innovantes et études en cours :	48
HETEROGENEITE TUMORALE :	50
LE MICROENVIRONNEMENT	53
GENERALITES	53
LA VASCULARISATION OSSEUSE ET SON MICROENVIRONNEMENT EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE	54
Généralités, architecture et fonction de la vascularisation de l'os	55
Vaisseaux H et L dans l'os normal et en croissance	59

MICROENVIRONNEMENT TUMORAL ET SPECIFICITES DANS L'OSTEOSARCOME	61
Les cellules osseuses et le remodelage osseux	63
Les cellules immunitaires	67
Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)	70
Les cellules du microenvironnement vasculaire	71
Perspectives dans la compréhension et le ciblage du microenvironnement de l'ostéosarcome	81
<u>OBJECTIFS DE LA THESE</u>	83
<u>ARTICLE ORIGINAL : INFLUENCE DU MICROENVIRONNEMENT DANS LA REPONSE HISTOLOGIQUE DE L'OSTEOSARCOME A LA CHIMIOETHERAPIE : APPROCHE PRECLINIQUE ET ANALYSE RETROSPECTIVE</u>	84
PRESENTATION DE L'ARTICLE	85
INTRODUCTION :	85
PRINCIPES ET OBJECTIFS :	86
CHOIX METHODOLOGIQUES :	86
Modèle préclinique in vitro et in vivo	86
Analyse rétrospective pilote	88
PUBLICATION	89
DISCUSSION	107
MODELE DE BON ET MAUVAIS REPONDEURS	107
Validation de l'expérience	108
CRITIQUES ET LIMITES DE L'ETUDE :	109
Modèle murin	109
Analyse rétrospective	109
TRAVAUX COMPLEMENTAIRES ET PERSPECTIVES	110
L'axe de la résorption osseuse	110
Modèles complémentaires	112
Analyse de l'environnement vasculaire	113
<u>ARTICLE ORIGINAL : SIGNATURE DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL VASCULAIRE EN TANT QUE MARQUEUR DE LA REPONSE THERAPEUTIQUE</u>	

A LA DOXORUBICINE DANS UN MODELE PRECLINIQUE D'OSTEOSARCOME

115

PRESENTATION DE L'ARTICLE **116**

INTRODUCTION : 116

PRINCIPES ET OBJECTIFS : 117

CHOIX METHODOLOGIQUES : 117

PUBLICATION **119**

DISCUSSION **147**

CRITIQUES ET LIMITES 148

 Limite de l'effectif 149

 Choix des marqueurs 150

 Stade d'analyse des marqueurs 150

 Analyse quantitative 151

PERSPECTIVES : 151

 Modèle préclinique 152

 Analyse sur biopsies humaines 152

CONCLUSION **155**

REFERENCES : **157**

ANNEXE 1 **177**

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
aFGF	Fibroblast Growth Factor A
ALP	Alkaline Phosphatase
ARNm	Acide Ribonucléique Messenger
ATRX	Alpha-Thalassemia/Mental Retardation, X-Linked
BET	Bromo- And Extra-Terminal
bFGF	Fibroblast Growth Factor B
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
BSP	Bone Sialoprotein
CD146	Cluster Of Differentiation 148
CD163	Cluster Of Differentiation 163
CD68	Cluster Of Differentiation 68
CD8	Cluster Of Differentiation 8
CI50	Concentration Inhibitrice Médiane
c-KIT	Tyrosine-Protein Kinase Kit
c-MET	Tyrosine-Protéine Kinase Met
CSM	Cellule Souche Mésoenchymateuse
DLG2	Disks Large Homolog 2
EC	Endothelial Cell
FDA	Food And Drug Administration
FGF23	Fibroblast Growth Factor 23
FOXP3	Forkhead Box P3
HAS	Haute Autorité De Santé

HIF1	Hypoxia-Inducible Factor 1
IGF1	Insulin-Like Growth Factor-1
IHC	Immunohistochimie
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
IL-8	Interleukine-8
IRM	Imagerie Par Résonnance Magnétique
LCN2	Lipocaline 2
lncARN	Longs ARN Non Codants
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MDM2	Murine Double Minute 2
MDP	Muramyl Dipeptide
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MiARN	Micro ARN
MKI	Multi Kinase Inhibiteur
MTP-PE	Muramyl Tripeptide Phosphatidyl Ethanolamine
NCT	National Clinical Trial
NG2	Neural/Glial Antigen 2
OC	Osteocalcine
OPG	Ostéoprotégérine
PD-ECGF	Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor
PDGFR- β	Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Beta Polypeptide
RANK	Receptor Activator Of NF-Kb
RANKL	Receptor Activator Of NF-Kb Ligand
RB	Rétinoblastome

RunX2	Runt-Related Transcription Factor 2
Sox9	Sry-Box Transcription Factor 9
SSG	Scandinavian Sarcoma Group
Stir	Short Tau Inversion-Recuperation
TK	Tyrosine Kinase
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor
TMA	Tissue Micro-Array
TNF	Tumor Necrosis Factor
TP53	Tumor Protein 53
VE	Vesicule Extracellulaire
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
α -SMA	Alpha Smooth Muscle Actin

Table des illustrations

Figure 1 : Epidémiologie de l'Ostéosarcome. Incidence de l'ostéosarcome selon l'âge et le sexe. SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) 18 data (1973–2013) (Gianferante et al., 2017).....	23
Figure 2 : Aspect clinique d'un adolescent présentant un ostéosarcome de l'humérus proximal droit. Œdème de la région deltoïdienne, et atrophie de la musculature pectorale.....	24
Figure 3 : Ostéosarcome du fémur gauche d'un garçon de 11 ans. (A) La radiographie antéropostérieure objective une lésion extensive agressive mixte, lytique et sclérotique de la diaphyse, avec une réaction périostée. (B) L'image sagittale de l'IRM en T1 montre l'étendue de la lésion de la moelle osseuse en hypersignal. (C) L'image coronale en séquence STIR (Short Tau Inversion Recovery) visualise mieux la masse extra-osseuse associée et de l'œdème péri-lésionnel.	26
Figure 4 : Ostéosarcome conventionnel de haut grade, microscopie optique avec coloration HES : prolifération dense, faite de cellules atypiques. Élaboration focale d'une matrice ostéoïde par les cellules tumorales (flèches).....	27
Figure 5: Classification des différents types d'ostéosarcomes. Présentation primitive, secondaire à une pathologie sous-jacente ou à une exposition, localisation aux parties molles, et métastatique (Themes, 2016).	28
Figure 6 : Aspect macroscopique de différents sous-types histologiques d'ostéosarcome de fémur distal produisant différents types de matrice (ostéoblastique, fibroblastique, chondroblastique)..	29
Figure 7 : Origine des sarcomes osseux. Facteur de transcription Sox9 (High-Mobility Group Box) lié à la différenciation chondrogénique, facteur de transcription Runx2 lié à l'ostéoblastogenèse, ALP : phosphatase alcaline, OC : ostéocalcine, BSP : Bone sialoprotein (sialoprotéine osseuse) (Brown et al., 2018).....	30
Figure 8 : Connexions entre l'étiologie, la biologie et le traitement de l'ostéosarcome. (Gianferante et al. 2017)	31
Figure 9 : Identification des altérations moléculaires avec potentiel métastatique des cellules d'ostéosarcome. Cette image représente les processus génétiques, épigénétiques et biologiques moléculaires dont les défauts ont été associés à des traits métastatiques des cellules	

d'ostéosarcome. lncRNA = lncARN: ARN long non codant; mRNA = mARN : ARN messenger; miRNA = miARN : microARN (Morrow and Khanna, 2015).....	33
Figure 10 : dégénérescence ostéosarcomateuse d'une maladie de Paget. Atteinte ostéolytique étendue du fémur distal (Sharma and Jane, 2005).....	35
Figure 11 : Classement histologique de l'effet de la chimiothérapie par la nécrose induite dans l'ostéosarcome. (Mintz et al., 2005)	37
Figure 12 : Evaluation de la nécrose tumorale sur pièce d'exérèse d'Ostéosarcome, tibia proximal en coupe sagittale.....	38
Figure 13 : Cartographie identifiant les zones de persistance de cellules tumorales viables avec leur zones préférentielles (Picci et al., 1985).....	39
Figure 14 : Système de classification de Birmingham associant les marges de résection et les nécroses induites par la chimiothérapie associée aux taux de survie sans récurrence locale (Jeys et al., 2017).....	39
Figure 15 : (A) Coupe transversale d'une pièce de résection d'un ostéosarcome ostéoblastique de haut grade du fémur distal, qui montre une tumeur s'étendant à travers la corticale et envahissant les tissus mous. (B) En microscopie (hématoxyline et éosine; grossissement d'origine, × 1,25), la distance de la tumeur viable à la marge de résection des tissus mous périphériques la plus fine mesure 2 mm (Jeys et al., 2017).....	40
Figure 16 : Envahissement micro-vasculaire de cellules tumorales viables en endo-vasculaire. Le côté droit de l'image montre le périoste (contre la tumeur). Les cellules tumorales viables ont envahi la lumière du vaisseau au niveau du périoste. Le côté gauche de la photo montre la tumeur (hématoxyline et coloration à l'éosine, grossissement x 200) (Tsuda et al., 2020)	41
Figure 17 :Traitement classique de l'Ostéosarome tel que décrit par le Scandinavian Sarcoma Group (SSG) en 2009 (Bruland et al., 2010).	44
Figure 18 : Situation peropératoire d'un patient atteint d'un sarcome osseux. (a) Le PSI est conçu à l'aide d'un logiciel de conception assistée par ordinateur. (b) Les PSI sont stérilisables pour être manipulés par le chirurgien dans la salle d'opération. Le PSI est positionné sur l'os et fixé temporairement à l'aide de broches de Kirschner. (c) Les coupes sont initiées avec la scie	

oscillante guidée par les surfaces planes du PSI. PSI : Patient-specific instruments (Gouin et al., 2014).....45

Figure 19 : Résection de tumeur primitive osseuse supra-acétabulaire iliaque gauche sous navigation OARM. A : positionnement des broches guide à l'aide d'un outil navigué. B : Visualisation de la navigation per-opératoire sur Scanner en coupe axiale, sagittale et frontale. ...46

Figure 20 : Essais cliniques récents en cours dans l'ostéosarcome. De nombreuses approches thérapeutiques sont en cours de développement et reposent sur un ciblage spécifique et direct des cellules cancéreuses (par exemple, réparation de l'ADN, cycle cellulaire ou ciblage des glycoprotéines), ou sur un ciblage indirect des cellules cancéreuses par modulation de leur microenvironnement (par exemple immunothérapies). Après intégration dans la matrice osseuse tumorale extracellulaire, les agents radiothérapeutiques alpha peuvent indirectement tuer les cellules cancéreuses. NCT: Number Clinical Trial, Numéro de registre de l'essai clinique national NuClinicalTrials.gov (Brown et al., 2018).....48

Figure 21 : Protocole de traitement dans l'essai Sarcoma13/OS2016, en fonction de l'âge chez des patients avec Ostéosarcomes à haut-risque (metastatiques ou mauvais répondeurs à la chimiothérapie). Association du Mifamurtide au traitement conventionnel (Brard et al., 2019) ...70

Figure 22: Courbes de survie de l'étude OS2006 avec randomisation en deux bras zolédronate et contrôle. A : Survie sans récurrence, B : survie globale.....66

Figure 23 : Caractéristiques structurelles générales et mécanisme d'activation d'un RTK. Les RTK sont des glycoprotéines transmembranaires qui sont composées d'un domaine de liaison au ligand extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine kinase intracellulaire. Ils sont activés par liaison au ligand puis transduisent le signal extracellulaire vers le cytoplasme en phosphorylant les résidus tyrosine sur les récepteurs eux-mêmes (autophosphorylation) et sur les protéines de signalisation en aval (Tian et al., 2020).49

Figure 24 : Cibles et résultats cliniques des TKI qui ont donné des résultats dans des essais cliniques contre l'ostéosarcome (Tian et al., 2020).....50

Figure 25 Contributions multifactorielles des cellules stromales aux caractéristiques de la tumeur (Hanahan and Coussen, 2012).....53

Figure 26 : Anatomie micro-vasculaire. La microcirculation fait partie du système vasculaire et se compose de petits vaisseaux : artérioles, capillaires et veinules. Les capillaires lymphatiques

transportent le liquide extravasculaire dans le système veineux. Les artérioles sont entourées de cellules musculaires lisses vasculaires responsables de la régulation du tonus des artérioles, une couverture péricytaire est présente au niveau capillaire (Güven et al., 2019).55

Figure 27 : (A) Présentation schématique de la vascularisation des os longs. (B) Gros plan de la région encadrée en (A) (Lafage-Proust and Roche, 2018).56

Figure 28 : La connexion vasculaire entre la moelle osseuse, l'os cortical et le périoste. D'après la figure 9.37 de Brooks et Revell (1998)(Cowin and Cardoso, 2015).....57

Figure 29 : Diagramme schématique résumant les principaux effets de l'oxygène sur la fonction des cellules osseuses (Marenzana and Arnett, 2013).58

Figure 30 : Représentation des vaisseaux H et L sur modèle murin d'un souris en croissance. Image de microscopie à balayage de la vascularisation tibiale en immunofluorescence pour Emcn (Endomucine) (rouge) et α -SMA (smooth actin muscle actin) (vert). Les artères couvertes par les cellules α -SMA + se connectent (flèches) aux vaisseaux métaphysaires (mp) de type H près de la plaque de croissance (lignes pointillées, growth plate : gp). Les vaisseaux sinusoidaux de type L se connectent à la grosse veine centrale (pointe de flèche jaune). (Kusumbe et al., 2014).60

Figure 31 : Représentation schématique de la prolifération des cellules tumorales et du cercle vicieux ostéolytique. Les cellules tumorales libèrent des médiateurs solubles tels que des hormones, des cytokines, des facteurs de croissance qui agissent sur les cellules stromales ostéoblastiques. Les cellules stromales produisent RANKL, qui se lie à son récepteur RANK exprimé sur les précurseurs d'ostéoclastes, améliorant la formation d'actifs ostéoclastes qui effectuent la résorption osseuse. Parfois, des cellules tumorales sont stimulées pour libérer directement une forme soluble de RANKL. Les ostéoclastes actifs libèrent alors des facteurs de croissance, cytokines ou composants de la matrice osseuse stockés qui à leur tour activent la prolifération tumorale. Le cercle vicieux induit ainsi à la fois la prolifération des cellules tumorales et la résorption osseuse. (Wittrant et al., 2004).64

Figure 32: Proposition d'algorithme de traitement pour différencier les patients en fonction de leur stratification immunologique déterminée lors du diagnostic, et proposition de traitements correspondants (Gomez-Brouchet et al., 2017).68

Figure 33 : Analyse de l'évolution locale d'un ostéosarcome de fémur distal en angiographie. A : Angiographie de l'artère fémorale superficielle avant mise en place de la chimiothérapie. On note

une volumineuse lésion avec extension dans les parties molles et une forte vascularisation. Localisations nodulaires associées. B : Après deux cycles de chimiothérapie, diminution globale de volume de la lésion mais progression des lésions nodulaires des parties molles. Flèches : nodules loco-régionaux associés (Chuang et al., 1982).....	72
Figure 34 : Différents modes de formation de vaisseaux sanguins en condition physiologique (a-c) et tumorale(a-f) (Takano, 2012).....	74
Figure 35 : Critères de normalisation vasculaire induite par les anti angiogéniques (Jain, 2005)....	78
Figure 36 : Inhibiteurs multi-kinases (multikinase inhibitors (MKI)) dans l'ostéosarcome : cibles moléculaires et cellulaires et essais cliniques en cours (Corre et al., 2020).	80
Figure 37 : Modèles de petits animaux disponibles dans la littérature pour l'étude des tumeurs osseuses primitives. Lignées cellulaires: origine humaine (en bleu), souris (en rouge), rat (en vert). PDX: xénogreffe dérivée du patient (Jacques et al., 2018).....	87
Figure 38 : A : Evolution des cinétiques tumorales en pourcentage du volume contrôle, issue de l'expérience précédente, * : $p < 0,05$; B : Modèles d'injection paratibial et intra-osseux..	107
Figure 39 : Cinétique d'évolution des volumes tumoraux moyens en fonction du traitement par Doxorubicine, selon le modèle syngénique MOS-J murin C57BL/6. A : Modèle d'injection intra-osseux ; B : Modèle d'injection para-tibial, * : $[0,05 ; 0,01[$; ns : non significatif, (Kubicek, 2018).	108
Figure 40 : IHC de RANKL. Spot d'un TMA issu de biopsie à Zoom x6,68. La coloration marron correspond à un marquage positif pour l'anticorps RANKL, (Kubicek, 2018).....	111
Figure 41 : Evaluation de l'expression de RANKL. A : IHC de RANKL sur modèle murin. Pas de différence significative entre les 3 modèles avec respectivement une moyenne de 4 cellules marquées dans le modèle intra-osseux, 5,3 dans le modèle intra-musculaire et 4,4 dans le modèle intra-osseux. B : Score d'immunomarquage Immuno-reactive score (IRS) de RANKL sur cohorte rétrospective (27 patients). BR : Bon Répondeurs, MR : Mauvais Répondeurs, ns : non significatif, (Kubicek, 2018).	111
Figure 42 : Cinétique d'évolution des volumes tumoraux moyens dans le modèle d'injection en site intra-musculaire en fonction du traitement par Doxorubicine, selon le modèle syngénique MOS-J murin C57BL/6. *** $< 0,001$; (Kubicek, 2018).	112

Figure 43 : Analyse en IHC de l'angiogenèse selon le modèle d'injection en condition contrôle : nombre d'éléments positifs pour un marquage avec l'anticorps anti-CD146 par unité de surface. IO : intra-osseux ; IM : intra-musculaire ; PT : paratibial, ; CT : Contrôle ; * [0,05 ; 0,01], (Kubicek, 2018).113

Introduction

L'ostéosarcome

Généralités et épidémiologie:

Epidémiologie

L'ostéosarcome est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente. Elle touche essentiellement les enfants, adolescents et adultes jeunes, mais aussi les patients plus âgés avec une distribution bimodale de la pathologie selon l'âge (Figure 1).

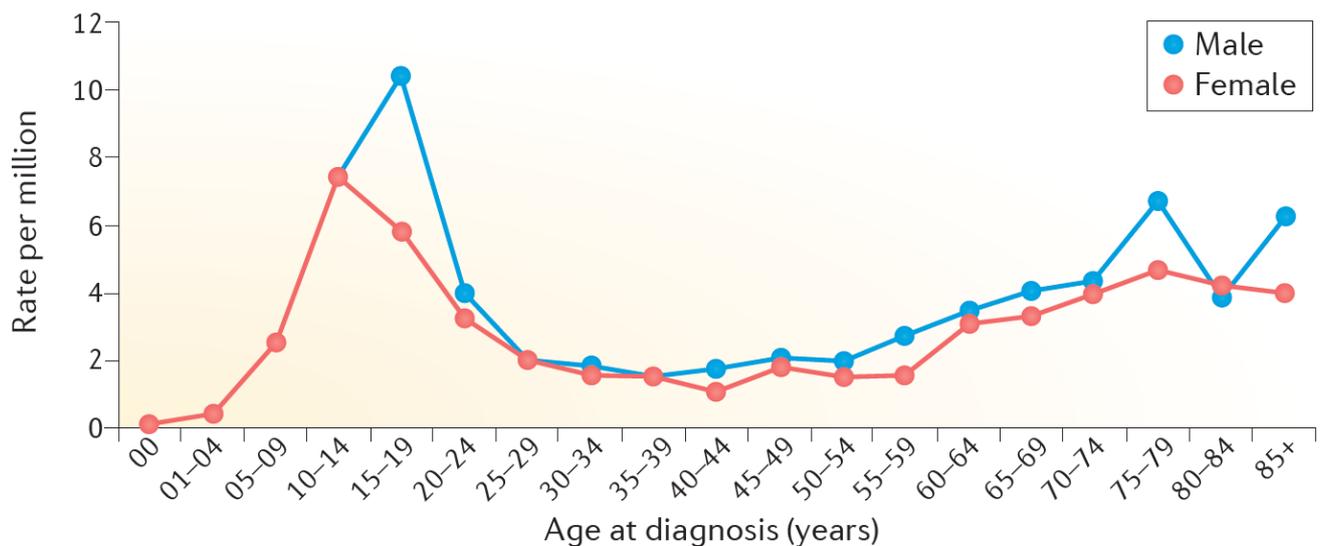


Figure 1: Epidémiologie de l'Ostéosarcome. Incidence de l'ostéosarcome selon l'âge et le sexe. SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) 18 data (1973–2013) (Gianferante et al., 2017).

L'incidence annuelle en France de l'ostéosarcome dans la population générale est de 5 cas par million de personnes (Ottaviani and Jaffe, 2009), avec une distribution géographique variable. Dans la population mondiale d'autres auteurs évaluent son incidence de 1 à 3 cas par million de

personnes (Kansara et al., 2014). Cette tumeur est plus fréquemment retrouvée chez l'homme, avec un sex-ratio global homme-femme chez les 0 à 24 ans de 1,43: 1 (Mirabello et al., 2009a).

Présentation clinique

La présentation clinique est peu spécifique, avec le plus souvent des phénomènes douloureux au premier plan, d'allure inflammatoire. L'apparition d'une tuméfaction, ou d'une masse parfois indolore est aussi fréquemment décrite (Figure 2).

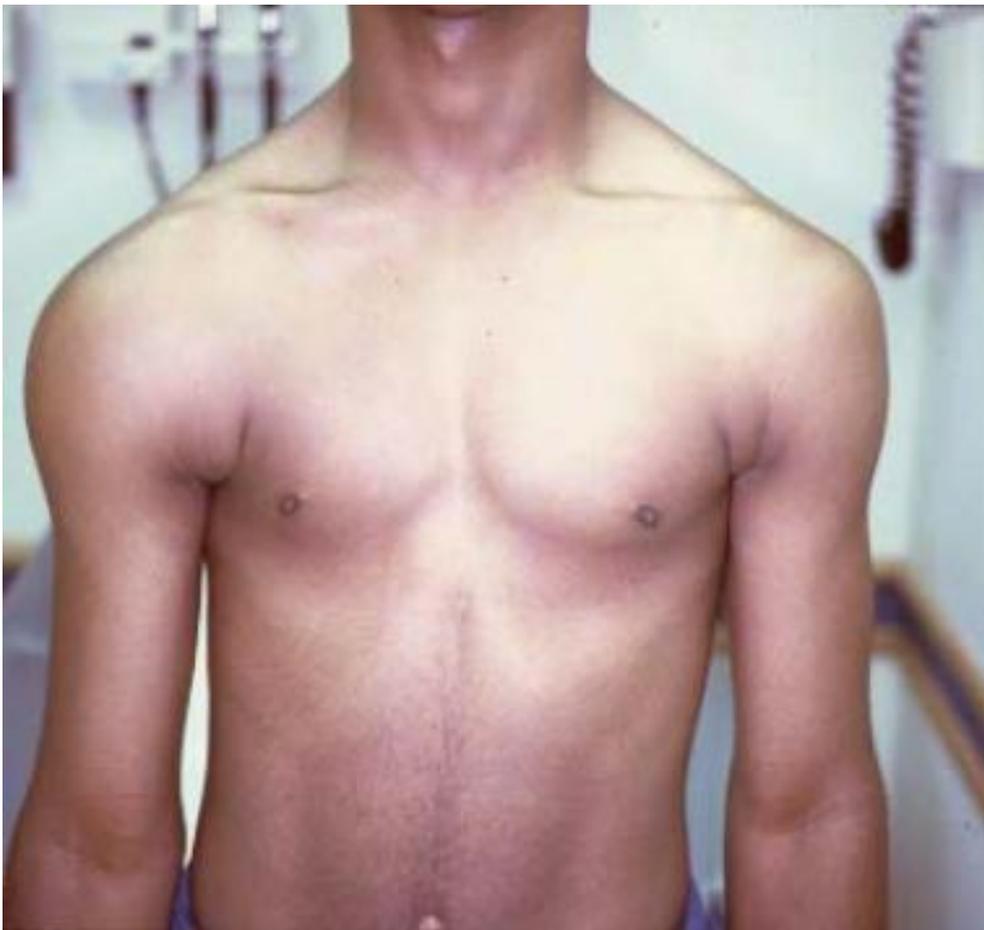


Figure 2 : Aspect clinique d'un adolescent avec un ostéosarcome de l'humérus proximal droit. Œdème de la région deltoïdienne, et atrophie de la musculature pectorale.

Enfin, il arrive qu'une fracture pathologique soit à l'origine de la découverte de cette tumeur primitive, particulièrement dans les formes telangiectasiques (Widhe and Widhe, 2000). La symptomatologie assez pauvre est fréquemment à l'origine de retards diagnostiques de plusieurs semaines, à plusieurs mois.

L'atteinte squelettique touche en premier lieu les os longs à proximité des cartilages de conjugaison. Par ordre de fréquence on retrouve : le fémur (42% dont 75% au niveau du fémur distal), le tibia (19% dont 80% dans le tibia proximal), l'humérus (10% dont 90% dans l'humérus proximal), le crâne et la mâchoire (8%) et enfin le bassin (8%). Cette tumeur agressive présente un risque de métastases élevé, en premier lieu au niveau des poumons et des os, mais aussi plus rarement au niveau du cerveau, des ganglions et du foie. Les présentations d'emblée métastatiques concernent 15 à 20% des patients (Salah et al., 2014), dont le pronostic est alors plus réservé. Ces métastases sont localisées au poumon dans 85 à 90% (Brown et al., 2018).

Aspect à l'imagerie

Les examens radiographiques standards révèlent le plus souvent des images d'ostéolyse diffuse, mais un aspect mixte, voire ostéocondant est aussi possible. Les limites de la lésion sont floues, signe d'une agressivité locale forte. On observe typiquement des réactions périostées (images en feu d'herbe, appositions en bulbe d'oignon...) (Casali et al., 2018; Yarmish et al., 2010).

Le scanner, mais surtout l'IRM sont des éléments indispensables à l'évaluation de la lésion (Figure 3). Ils permettent de préciser les limites de la tumeur en vue de la résection carcinologique, ou d'analyser la réponse au traitement néo-adjuvant.

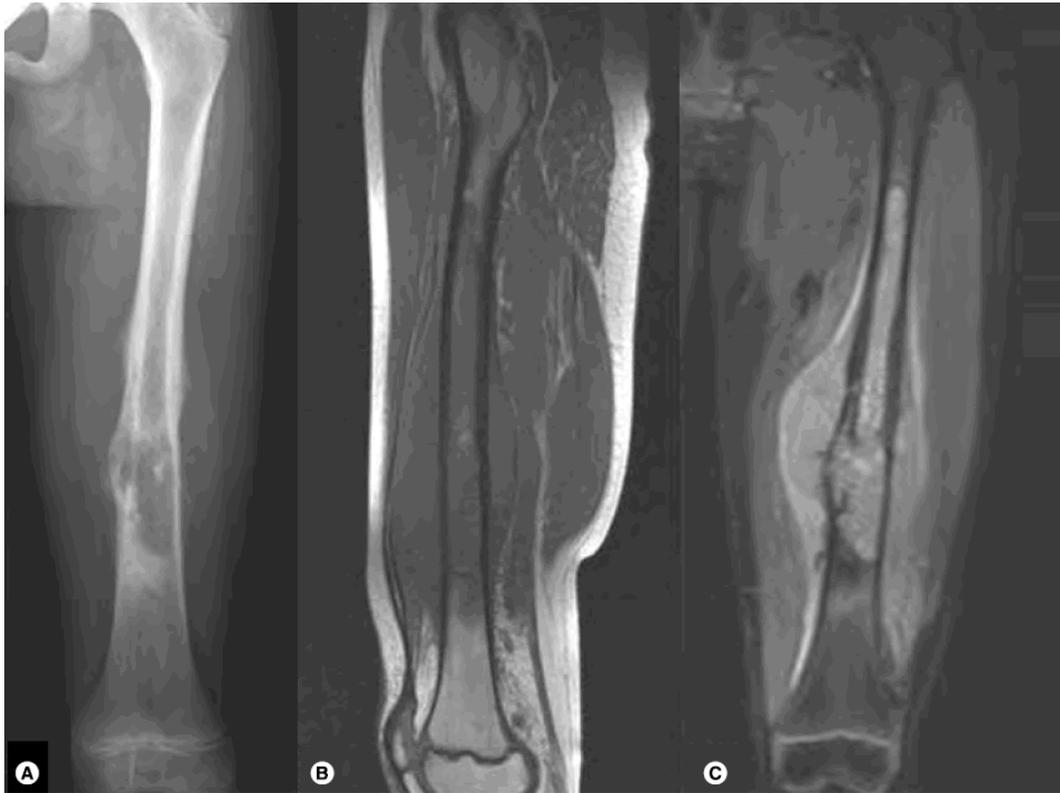


Figure 3 : Ostéosarcome du fémur gauche d'un garçon de 11 ans. (A) La radiographie antéropostérieure objective une lésion extensive agressive mixte, lytique et sclérotique de la diaphyse, avec une réaction périostée. (B) L'image sagittale de l'IRM en T1 montre l'étendue de la lésion de la moelle osseuse en hyposignal. (C) L'image coronale en séquence STIR (Short Tau Inversion Recovery) permet de mieux visualiser la masse extra-osseuse associée et l'œdème péri-lésionnel.

Diagnostic

Le diagnostic de l'ostéosarcome se fait systématiquement à l'aide d'une biopsie osseuse. Celle-ci peut être chirurgicale à ciel ouvert ou réalisée sous contrôle radiologique en percutané. L'analyse anatomopathologique, confrontée à la clinique et à l'imagerie sont essentielles pour obtenir un diagnostic de certitude (Klein and Siegal, 2006; Wadhwa, 2014). Histologiquement le diagnostic repose sur l'identification d'une prolifération cellulaire tumorale maligne (ostéoblastes atypiques) élaborant, au moins focalement, une matrice ostéoïde (Figure 4). Cependant cet aspect peut être aspécifique, avec une grande variété de situations mimant l'ostéosarcome. Les diagnostics différentiels sont nombreux : les tumeurs bénignes et malignes, les infections et les processus inflammatoires, ou même la consolidation osseuse. La réalisation et l'interprétation de

la biopsie doivent donc être réalisées dans un centre expert, par des praticiens spécialisés et rompus à ces spécificités, étant donné l'impact d'un retard ou d'un diagnostic erroné (Raymond and Jaffe, 2010).

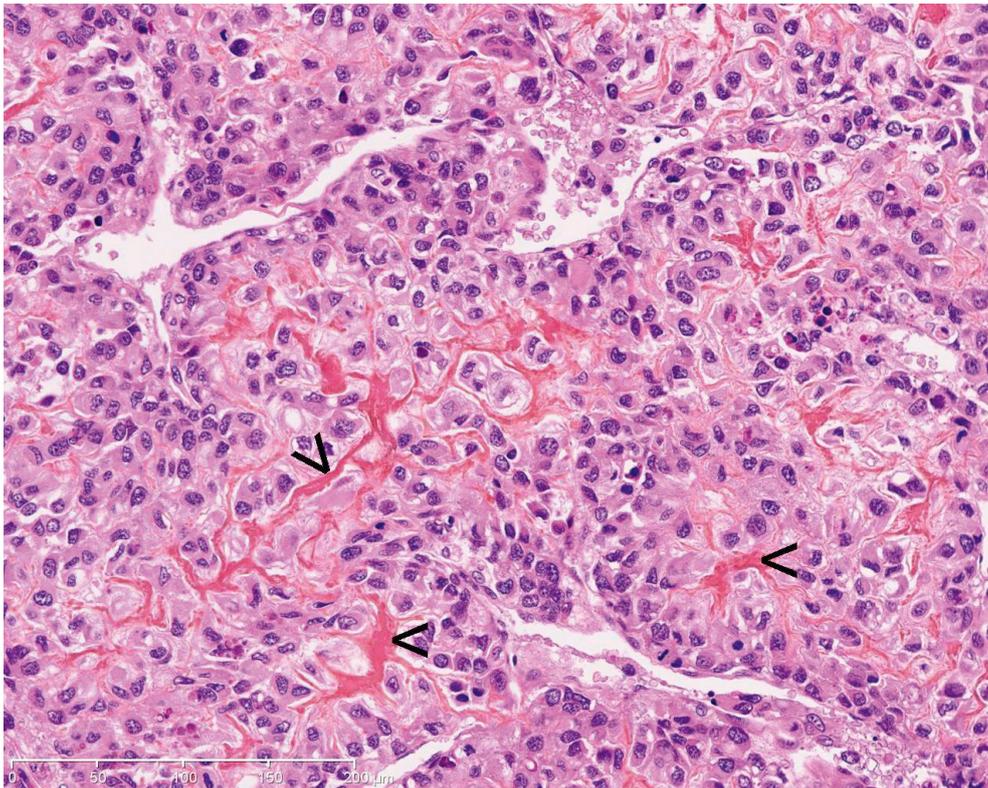


Figure 4 : Ostéosarcome conventionnel de haut grade, microscopie optique avec coloration HES : prolifération dense, faite de cellules atypiques. Élaboration focale d'une matrice ostéoïde par les cellules tumorales (têtes de flèches).

Caractéristiques tumorales générales

L'ostéosarcome dérive de cellules mésenchymateuses ostéoformatrices (Gaebler et al., 2017; Mutsaers and Walkley, 2014), sarcomateuses, produisant une matrice ostéoïde et de l'os immature (Fletcher et al., 2005). Cette tumeur qui touche particulièrement les os longs du membre inférieur (Mirabello et al., 2009b) présente de nombreux sous-types histologiques (Figures 5 et 6) (ostéoblastique, chondroblastique, télangiectasique...) (Klein and Siegal, 2006).

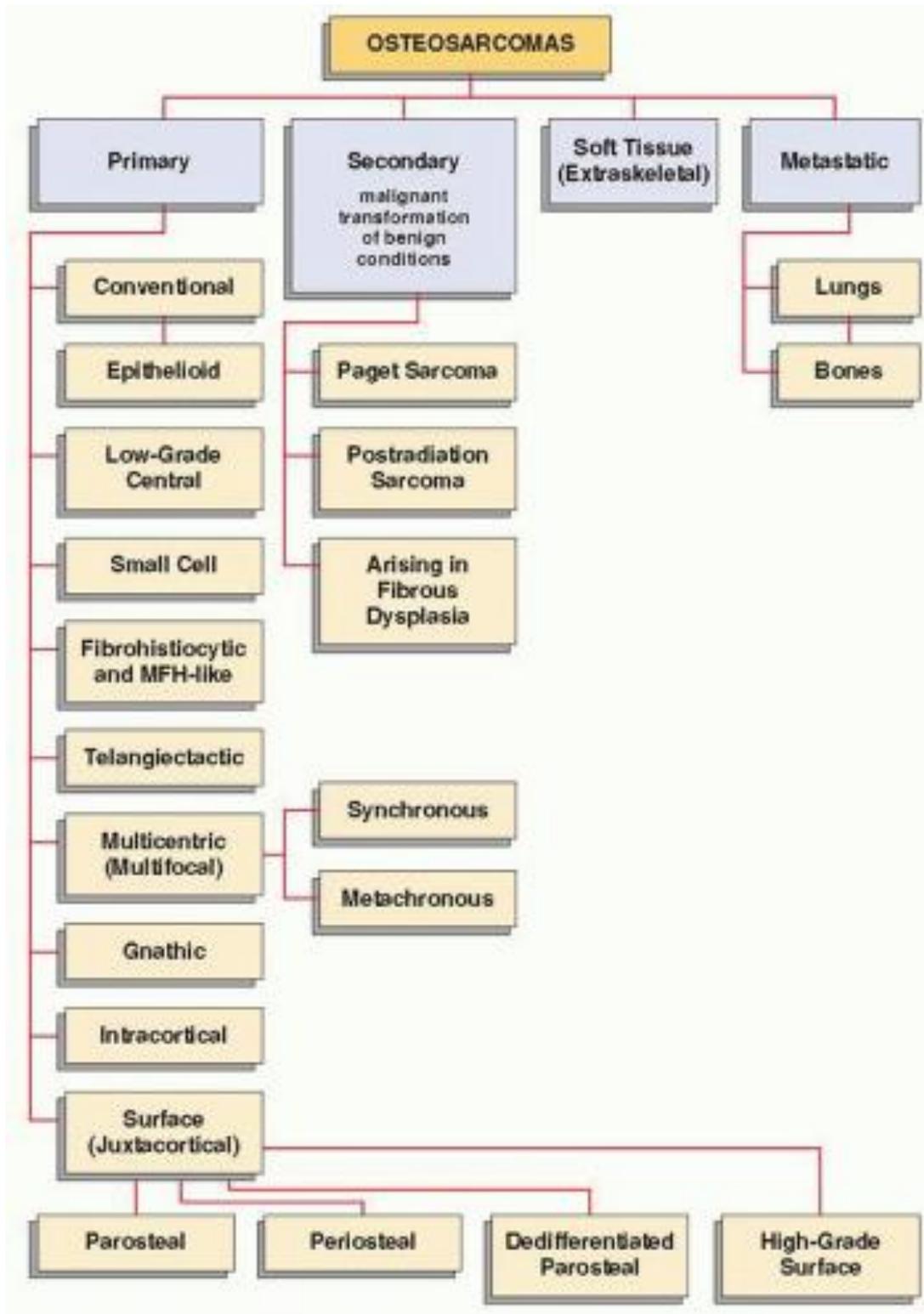


Figure 5: Classification des différents types d'ostéosarcomes. Présentation primitive, secondaire à une pathologie sous-jacente ou à une exposition, localisation aux parties molles, et métastatique (Themes, 2016).

La tumeur peut se localiser à différents niveaux de l'architecture osseuse : en centromédullaire, développées aux dépens du tissu cortical, ou encore en juxta-périosté. Des formes squelettiques sont également décrites (Choi et al., 2014). Il est à noter qu'il existe aussi des formes particulières d'ostéosarcome mandibulaire (Bertin et al., 2020), avec des modèles précliniques murins développés dans le laboratoire PhyOs (Bertin et al., 2019). Ces lésions sont de diagnostic plus difficile, mais avec un risque métastatique plus faible. En plus d'une variabilité étendue dans ses formes histologiques, l'ostéosarcome a une forte hétérogénéité intra-tumorale (Botter et al., 2014; Gibbs et al., 2011) ; rendant difficile l'identification d'une cible thérapeutique, et pouvant être à l'origine de mécanismes de résistance (Billaud, 2012). On observe en effet fréquemment des territoires de morphologie, de densité, et de remodelage osseux très hétérogènes au sein d'une même tumeur.

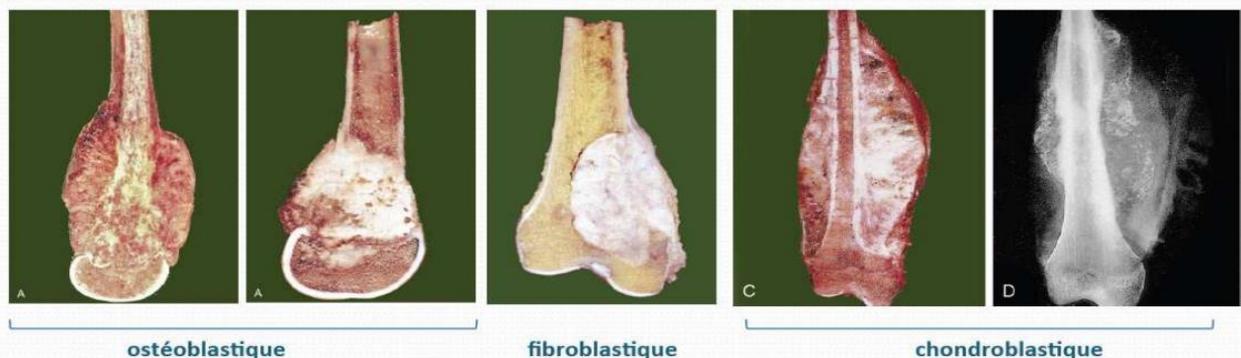


Figure 6 : Aspect macroscopique de différents sous-types histologiques d'ostéosarcome de fémur distal produisant différents types de matrice (ostéoblastique, fibroblastique, chondroblastique).

Pathogenèse :

Complexe et encore méconnue, l'origine de l'ostéosarcome est multifactorielle et fait probablement intervenir des anomalies de croissance déclenchées par des mécanismes à la fois génétiques et épigénétiques. Il est admis que les CSM sont impliquées dans la physiopathologie de l'ostéosarcome (CSM). Sur la base des connaissances actuelles, l'ostéosarcome, le sarcome

d'Ewing et le chondrosarcome partageraient ainsi une origine mésenchymateuse commune. Selon le niveau de différenciation et en association avec des événements oncogènes et un microenvironnement adapté, leur précurseur commun, une CSM, pourrait être transformée en ostéosarcome, chondrosarcome ou sarcome d'Ewing (Figure 7) (Brown et al., 2018; Mutsaers and Walkley, 2014). Des anomalies lors de la différenciation ostéoblastique sous l'effet de RUNX2 (facteur de transcription impliqué dans l'ostéoblastogénèse), seraient donc impliquées dans la physiopathogénèse de l'ostéosarcome. Cependant la découverte récente de cellules souches mésenchymateuses squelettiques pourrait remettre en cause ce mécanisme (Chan et al., 2018).

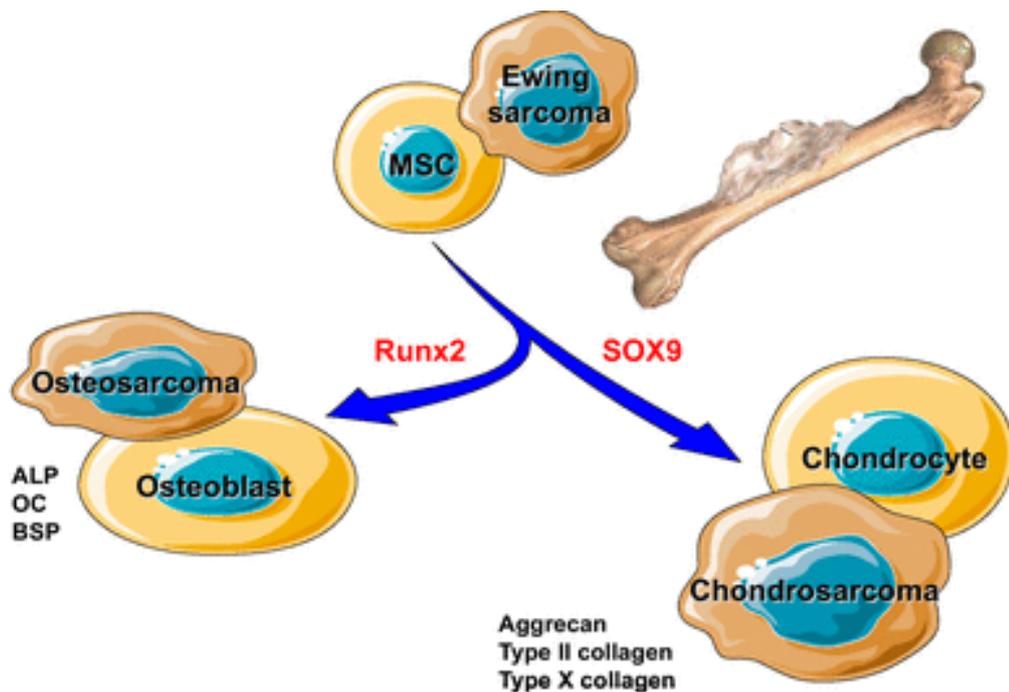


Figure 7 : Origine des sarcomes osseux. Facteur de transcription Sox9 (High-Mobility Group Box) lié à la différenciation chondrogénique, facteur de transcription Runx2 lié à l'ostéoblastogénèse, ALP : phosphatase alcaline, OC : ostéocalcine, BSP : Bone sialoprotein (sialoprotéine osseuse) (Brown et al., 2018).

Rôle de la croissance

Même si la pathogénèse de l'ostéosarcome reste en grande part méconnue; l'association entre l'os, la croissance pendant l'enfance (ou la puberté), et le diagnostic de tumeur suggèrent

fortement l'implication de facteurs de croissance dans l'apparition de la maladie (Sadykova et al., 2020). Les voies complexes liées à la croissance, au développement osseux et à la tumorigénèse sont également importantes en biologie de l'ostéosarcome (Figure 8).

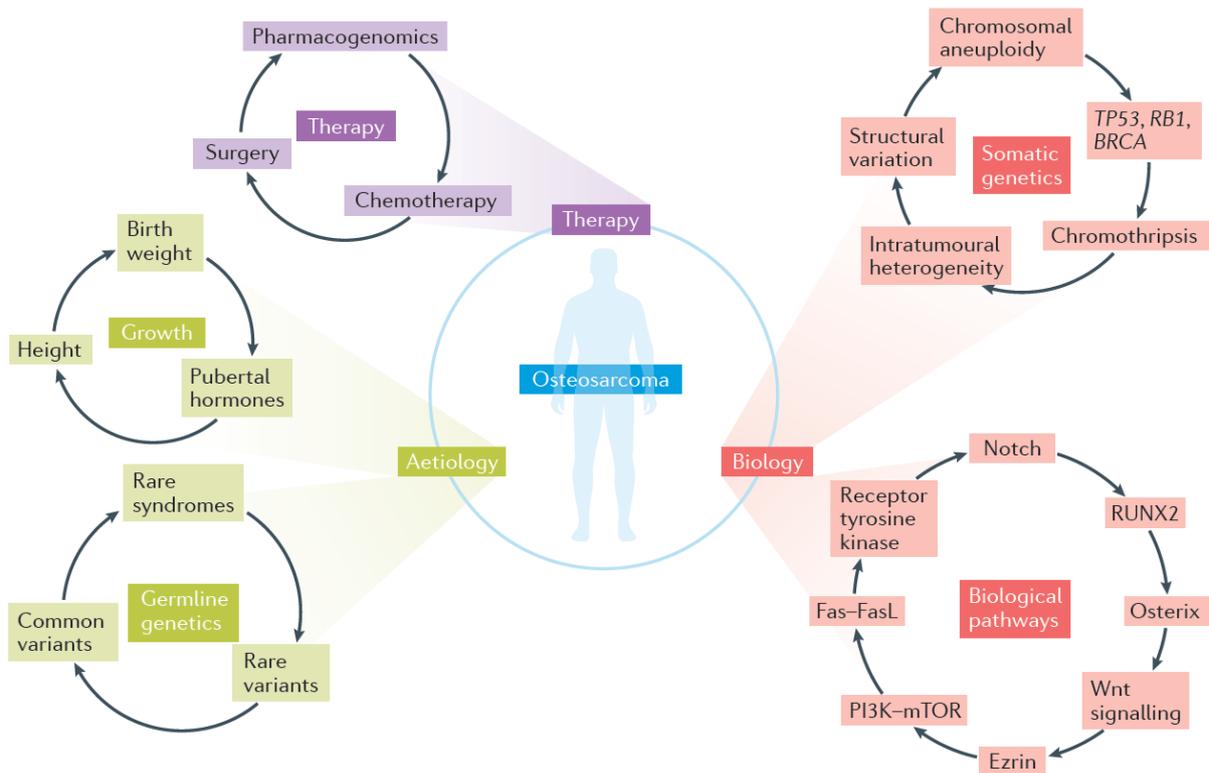


Figure 8 : Connexions entre l'étiologie, la biologie et le traitement de l'ostéosarcome. (Gianferante et al. 2017)

La propension à atteindre une taille élevée à l'âge adulte a pu être identifiée comme un facteur de risque indépendant dans plusieurs études, et suggère le rôle probablement prépondérant de l'activité du cartilage de croissance dans l'apparition de l'ostéosarcome (Longhi et al., 2005; Zhang et al., 2018). Le poids de naissance élevé semble aussi en lien avec des atteintes tumorales plus sévères, métastatiques et des localisations atypiques, plus volontiers axiales (Diessner and Spector, 2017; Endicott et al., 2017). La forte incidence chez les chiens de grande race (Dogue Allemand, Saint-Bernard, berger allemand...) et la localisation typique de

l'ostéosarcome dans la région métaphysaire adjacente à la plaque de croissance des os longs sont d'autres témoins de l'association directe entre la croissance et l'ostéosarcome.

Facteur environnementaux

Le seul facteur de risque environnemental connu est l'exposition aux rayonnements. L'ostéosarcome radio-induit est une forme d'ostéosarcome secondaire classique (Kristenson et al., 2019).

Facteurs génétiques

Lors de l'ostéogenèse, les ostéoblastes sont formés à partir de cellules mésenchymateuses pluripotentes, avec un potentiel d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation en différents types cellulaires. Ceci implique des voies de signalisation complexes, et une perturbation de ce processus peut provoquer une dérégulation de la différenciation et de la prolifération de ces cellules, conduisant à la malignité (Figure 9). Dans ce contexte, l'origine génétique de l'ostéosarcome semble être multifactorielle, impliquant la dérégulation de la différenciation des cellules mésenchymateuses et des gènes suppresseurs de tumeurs, l'activation de pro-oncogènes, mais ferait aussi entrer en jeu des événements épigénétiques et la sécrétion de cytokines (de Azevedo et al., 2020).

On identifie en règle générale une désorganisation du génome associant une aneuploïdie et des altérations chromosomiques variables. Il existe une dérégulation des gènes suppresseurs de tumeurs et du cycle cellulaire, avec un défaut des systèmes de réparation de l'ADN (de Azevedo et al., 2020).

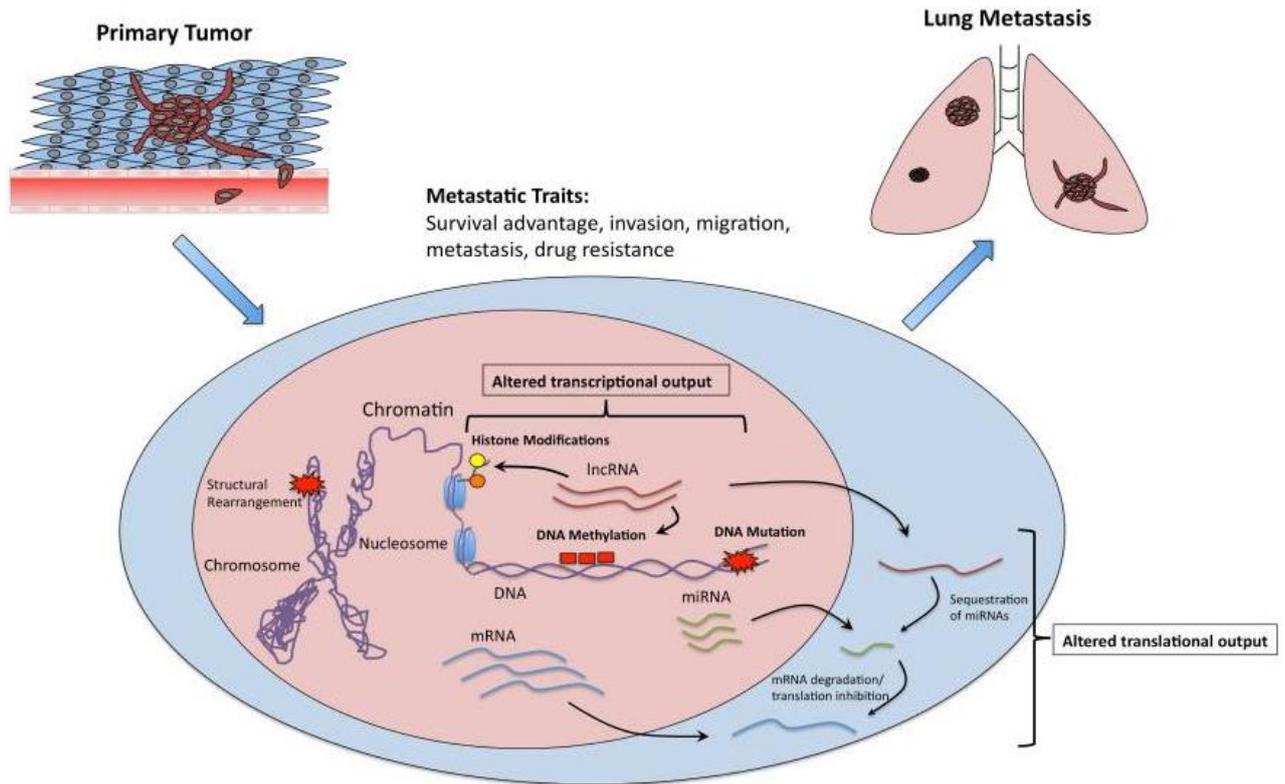


Figure 9 : Identification des altérations moléculaires avec potentiel métastatique des cellules d'ostéosarcome. Cette schéma représente les processus génétiques, épigénétiques et biologiques moléculaires dont les défauts ont été associés à des traits métastatiques des cellules d'ostéosarcome. lncRNA = lncARN: ARN long non codant; mRNA = mARN : ARN messenger; miRNA = miARN : microARN (Morrow and Khanna, 2015).

Les échecs des mécanismes de surveillance et de réparation, ou de contrôle de l'apoptose lors de l'ostéogénèse sont en cause, et permettent la survie de cellules ayant subi des altérations lors de leur différenciation.

L'éventail de mutations décrites est très large pour cette tumeur, Bousquet *et al.* ont ainsi identifié plus de 80 mutations ponctuelles et certaines délétions liées à plus de 80 gènes (Bousquet et al., 2016). Un groupe de gènes mutés de manière récurrente et plus spécifique dans l'ostéosarcome a aussi été identifié (TP53, RB, MDM2, ATRX et DLG2) par l'équipe de Chen *et al.* (Chen et al, 2014). En 2015, un sous-ensemble d'ostéosarcomes a été décrit, avec des altérations génomiques dans les gènes des voies de réparation de l'ADN, rappelant les tumeurs déficientes en BRCA1/2 (Kovac et al., 2015).

Rôle de l'épigénétique

Des événements épigénétiques comme la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, le remodelage des nucléosomes et l'expression des ARN non codants sont aussi classiquement décrits comme initiateurs tumoraux. Il a été rapporté que les gènes cibles de p53 ou les gènes dont l'activité est modulée par p53, en plus d'autres gènes suppresseurs de tumeur, sont réduits au silence dans les lignées cellulaires dérivées de l'ostéosarcome par hyperméthylation de leurs promoteurs (Asano et al., 2019; Morrow and Khanna, 2015). Le rôle de l'épigénétique est à l'origine de stratégies thérapeutiques développées dans le laboratoire PhyOs, centrées sur l'inhibition de protéines à bromodomaines de la famille BET (bromodomain and extra terminal domain) (Lamoureux et al., 2014), ou encore sur les circuits de micro-ARN favorisant le maintien de l'intégrité génomique, l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence cellulaire et l'apoptose (Jacques et al., 2020).

Prédispositions génétiques

Les dysplasies osseuses, y compris la maladie de Paget (Figure 10), la dysplasie fibreuse, l'enchondromatose sont des facteurs de risques. Il est à noter que des prédispositions génétiques sont classiquement rapportées comme étant à l'origine de l'ostéosarcome : le rétinoblastome héréditaire (Moll et al., 1997), le syndrome de Rothmund – Thomson (Hicks et al., 2007) et le syndrome de Li Fraumeni (Porter et al., 1992).

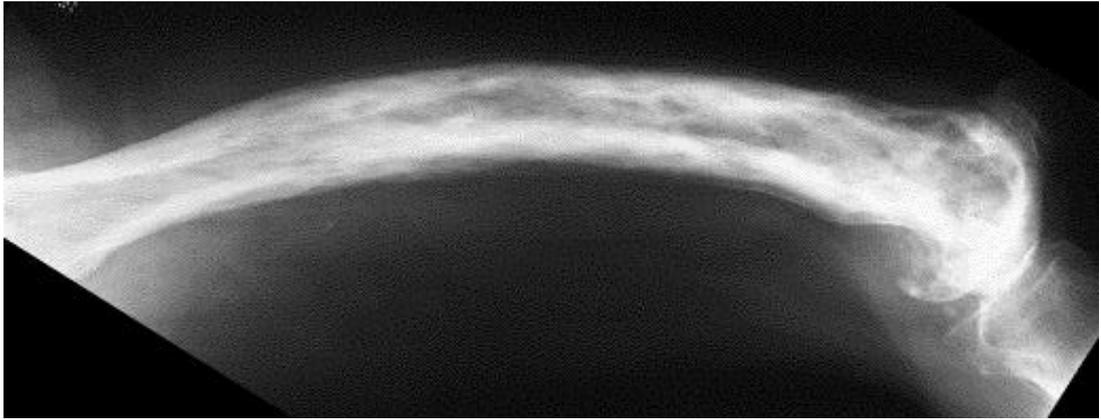


Figure 10 : dégénérescence ostéosarcomateuse d'une maladie de Paget. Atteinte ostéolytique étendue du fémur distal (Sharma and Jane, 2005).

Cependant, dans la grande majorité des cas (95%), les ostéosarcomes apparaissent comme des événements sporadiques, dont les mécanismes pro-oncogènes sont encore mal définis. Associés à une hétérogénéité cellulaire élevée, le développement de thérapies moléculaires axée sur une cible en particulier est d'autant plus difficile (Corre et al., 2020)(Annexe 1).

Facteurs pronostics et analyse anatomopathologique :

L'évaluation pronostique reste un des enjeux principaux de la prise en charge de l'ostéosarcome. Ce terrain reste à défricher et peu d'avancées significatives ont été faites dans ce domaine à ce jour. Or, l'identification précoce des patients à risque de mauvaise réponse à la chimiothérapie est primordiale au vu de l'enjeu. En effet, du point de vue de l'enjeu pronostique, ce sont ces patients à risque qui devraient bénéficier en priorité de nouvelles stratégies thérapeutiques (Tsuda et al., 2020).

Facteurs cliniques et biologiques

Classiquement, les facteurs pronostics de survie à long terme décrits dans la littérature pour l'ostéosarcome sont : la localisation et la taille de la tumeur, la présence de métastases, la qualité de la réponse à la chimiothérapie, ainsi que le caractère complet de la résection tumorale (Bielack et al., 2002; Davis et al., 1994). Des travaux cliniques récents se sont attelés à modéliser les facteurs de risques cliniques et biologiques préopératoires par des analyses statistiques multivariées : la perturbation de la concentration plasmatique en phosphatases alcalines est fréquemment rapportée. Mais les résultats sont pour le reste assez variables suivant les cohortes ; ils sont souvent fonction du taux de survie et des modalités de traitement mais aussi du niveau socio-économique, et des critères méthodologiques (critères cliniques stricts, association à des dosages biologiques, analyse histologique) (Hu et al., 2019; Hung et al., 2015; Min et al., 2013; Nataraj et al., 2015). La très forte hétérogénéité histologique de l'ostéosarcome, ainsi que le rôle prépondérant du microenvironnement tumoral rendent complexes l'appréhension de la dynamique tumorale et de l'effet des traitements dans cette pathologie. La fracture pathologique a pu être évoquée également comme facteur de mauvais pronostic par une méta-analyse de 2015 (Sun et al., 2015), mais cela n'est pas sujet à consensus, et des facteurs confondants (taille de la tumeur, caractère axial et réponse à la chimiothérapie) n'avaient pas été pris en compte par une analyse multivariée (Cates, 2016).

Des méta-analyses ont été menées à partir de ces nombreuses études de cohorte, notamment l'étude de Friebele en 2015, ou celle de Xin et Wei en 2020 (Friebele et al., 2015; Xin and Wei, 2020). Leurs résultats étaient globalement superposables, identifiant finalement le sexe masculin, l'âge avancé, la taille de la tumeur, le caractère axial de la lésion, l'absence de traitement chirurgical ou la chirurgie d'amputation comme responsables de mauvais pronostic chez les patients atteints d'ostéosarcome. Ce sont ces patients, à haut risque pronostique de mauvaise évolution, qui pourraient bénéficier le plus de l'administration de nouveaux traitements.

Facteurs histologiques

Malgré ces travaux, le principal facteur pronostic, et le plus universel, reste à l'heure actuelle l'évaluation de la réponse à la chimiothérapie. Histologiquement, c'est donc toujours le score de Huvos et Rosen qui demeure le critère principal dans l'évaluation pronostique de l'ostéosarcome (Huvos, 1987; Rosen et al., 1979). Il se fonde sur le compte du pourcentage de cellules tumorales viables restantes en post-chimiothérapie sur la pièce d'exérèse (Figure 11).

Huvos grade	Percent necrosis (%)	Histologic effect
I	0-50	Little or no effect identified
II	51-90	Areas of acellular tumor osteoid, necrotic, or fibrotic material attributable to the effect of chemotherapy, with other areas of histologically viable tumor
III	91-99	Predominant areas of acellular osteoid, necrotic, or fibrotic material attributable to the effect of chemotherapy, with only scattered foci of histologically viable tumor cells identified
IV	100	No histologic evidence of viable tumor identified within the entire specimen

Figure 11: Classement histologique de l'effet de la chimiothérapie par la nécrose induite dans l'ostéosarcome. (Mintz et al., 2005)

Un patient était initialement considéré comme bon répondeur s'il persistait, à l'analyse anatomopathologie de la pièce de résection tumorale, moins de 5% de cellules viables (grade III et IV), ce seuil a été augmenté à 10% sur les blocs tumoraux issus de lames après coupe orthogonale de la pièce tumorale (Figure 12). Une modification du protocole de chimiothérapie a

pu être proposée chez les mauvais répondeurs (grade I et II) (Huvos, 1987), même si cette attitude n'est pas sujette à consensus. Ce score pronostic a assez peu évolué depuis sa description initiale dans les années 80.

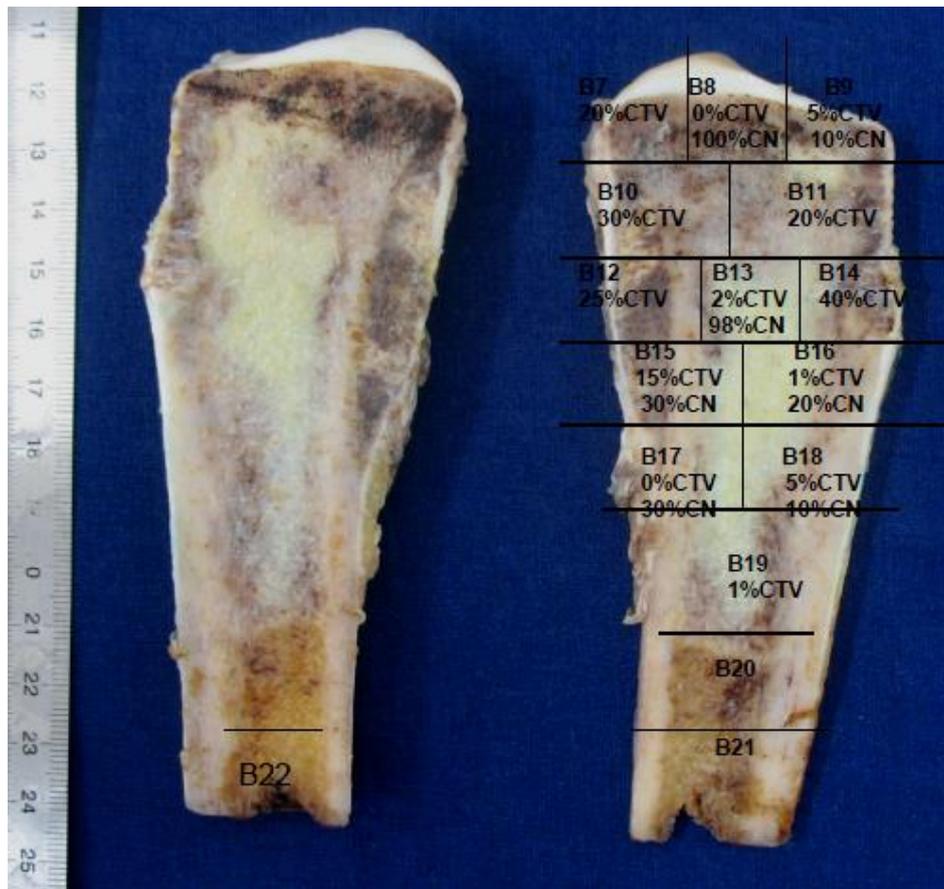


Figure 12 : Evaluation de la nécrose tumorale sur pièce d'exérèse d'ostéosarcome, tibia proximal en coupe sagittale.

Des modifications des seuils du pourcentage de nécrose ont été proposées (Tsuda et al., 2020), mais le caractère focal, ou diffus, ou la localisation spécifique des colonies tumorales vivantes n'ont jamais véritablement été pris en compte hormis par Picci et al il y a plus de 30 ans (Figure 13) (Picci et al., 1985).

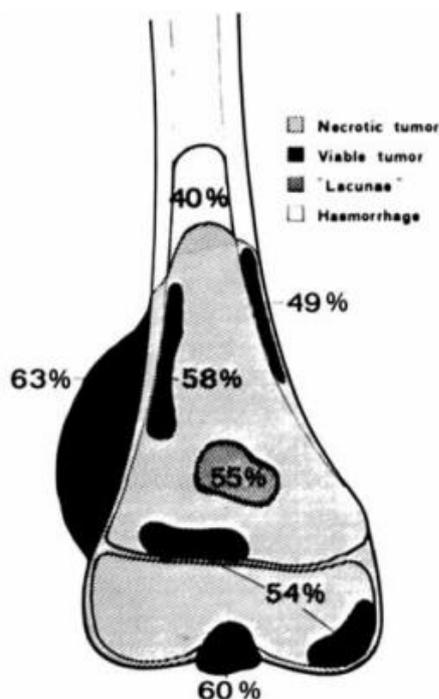


Figure 13 : Cartographie identifiant les zones de persistance de cellules tumorales viables avec leur zones préférentielles (Picci et al., 1985).

Des ajouts ont pu être proposés au sein des scores pronostics. Ainsi l'intégration de la qualité des marges est également suggérée par certaines équipes, comme celle de Birmingham avec un score composite d'évaluation pronostique, associant la nécrose tumorale induite par la chimiothérapie à la qualité des marges de résection (Figure 14) (Jeys et al., 2017).

Birmingham classification	5-year LRFS	95% CI	HR	95% CI	p value
1a: Necrosis \geq 90% and margins $>$ 2 mm	98.6%	90.5%–99.8%	1		
1b: Necrosis \geq 90% and margins \leq 2 mm	91.7%	83.3%–95.9%	5.9	0.7–47	0.09
2a: Necrosis $<$ 90% and margins $>$ 2 mm	84.0%	72.5%–90.9%	11.0	1.4–84	0.02
2b: Necrosis $<$ 90% and margins \leq 2 mm	76.1%	72.5%–90.9%	19.6	2.6–144	0.003

LRFS = local recurrence-free survival; CI = confidence interval; HR = hazard ratio.

Figure 14 : Système de classification de Birmingham associant les marges de résection et les nécroses induites par la chimiothérapie associée aux taux de survie sans récurrence locale (Jeys et al., 2017).

Le score de Birmingham a été établi sur une cohorte de 389 patients, et le cumul de marges < 2mm, associé à un taux de cellules viables résiduelles > 10% était l'association de plus mauvais pronostic en termes de rechute locale (Figure 15) (Jeys et al., 2017).

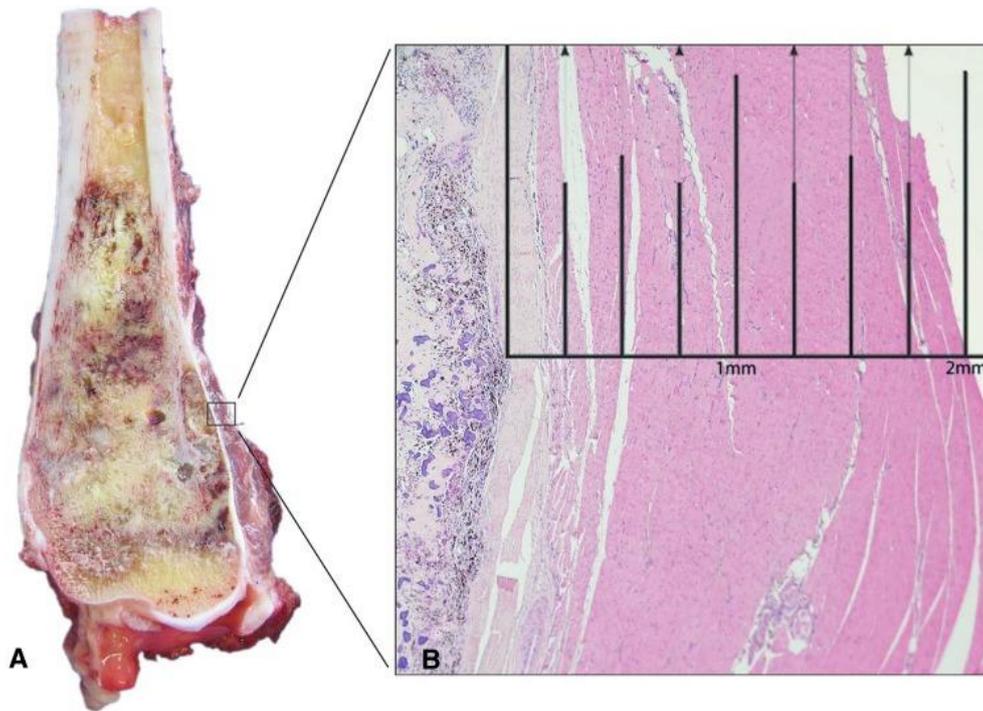


Figure 15 : (A) Coupe transversale d'une pièce de résection d'un ostéosarcome ostéoblastique de haut grade du fémur distal, qui montre une tumeur s'étendant à travers la corticale et envahissant les tissus mous. (B) En microscopie (hématoxyline et éosine; grossissement d'origine, $\times 1,25$), la distance de la tumeur viable à la marge de résection des tissus mous périphériques la plus fine mesure 2 mm (Jeys et al., 2017).

En termes d'analyse pronostique, des compléments au score de Huvos existent donc, et l'analyse des marges de résection doit logiquement être prise en compte, car elle a un impact majeur dans la récurrence et la survie du patient. Mais l'importance de la nécrose induite, bien que de description ancienne, semble utilisée de façon consensuelle comme outil pronostic majeur, mais également comme outil de décision thérapeutique. Dans la pratique et une majorité d'essais cliniques, elle reste l'outil de choix.

Cependant ce score laisse de côté certaines informations. Par sa nature, il peut lasser l'existence de colonies focales très actives non nécrotiques, et ne prend pas en compte la répartition géographique des cellules tumorales aux dépens d'un territoire particulier (épiphyse, corticale, tissus mous...).

Des compléments d'analyse sont donc nécessaires. L'invasion vasculaire microscopique et les emboles vasculaires identifiés lors de l'analyse sont de manière générale un critère de mauvais pronostic décrit récemment (Figure 16). Ils sont les témoins de l'envahissement et du franchissement tumoral des tissus adjacents (Yedururi et al., 2018).

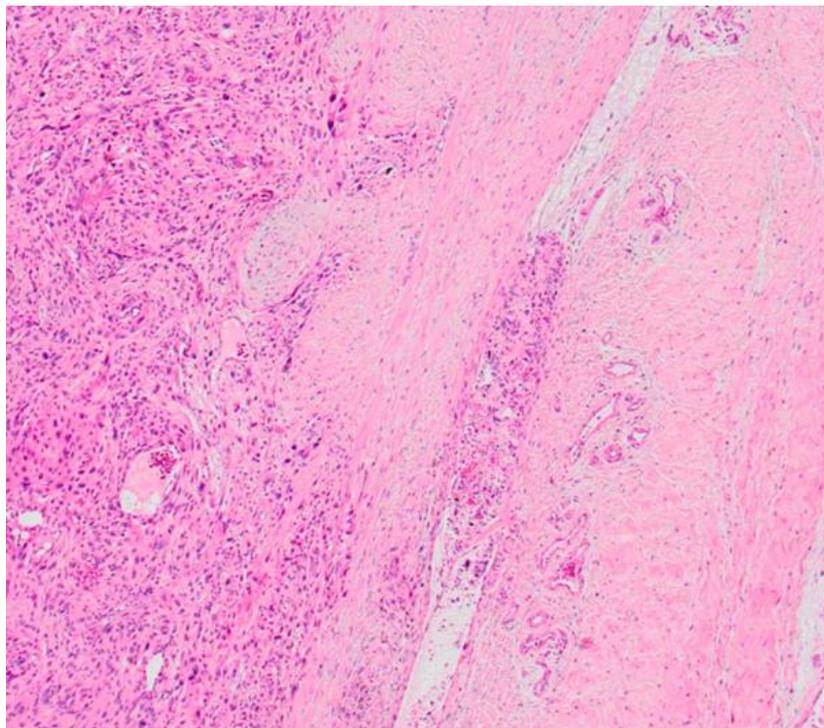


Figure 16 : Envahissement micro-vasculaire de cellules tumorales viables en endo-vasculaire. Le côté droit de l'image montre le périoste (contre la tumeur). Les cellules tumorales viables ont envahi la lumière du vaisseau au niveau du périoste. Le côté gauche de la photo montre la tumeur (hématoxyline et coloration à l'éosine, grossissement x 200) (Tsuda et al., 2020)

Ces embolies sont associées à une survie globale plus faible et à une incidence cumulative plus élevée de récurrences locales ou de métastases, en particulier chez les patients ayant une mauvaise réponse histologique à la chimiothérapie préopératoire (Benezech et al., 2016; Tsuda et al., 2020).

D'après Tsuda *et al.*, les patients mauvais répondeurs à la chimiothérapie et présentant des embolies vasculaires seraient particulièrement à risque de rechute métastatique, locale, voire même de décès. Une stratification sur ce sur-risque pourrait être évaluée, avec des propositions de thérapies plus agressives. De même, la présence d'embolies vasculaires chez un patient bon répondeur devrait attirer l'attention : ce sujet pourrait faire l'objet de travaux complémentaires dans les années à venir (Tsuda et al., 2020).

Limites des facteurs pronostics

Cependant la limite majeure de ces outils pronostics histologiques est qu'ils ne sont disponibles que sur l'analyse de la pièce d'exérèse. Dans cette situation, la chimiothérapie néo-adjuvante est terminée et le geste chirurgical déjà réalisé (avec d'ailleurs un risque de marges contaminées supérieur dans les sous-populations de patients avec embolies vasculaires tumorales, en lien avec des limites tumorales plus floues). Les modulations thérapeutiques sont de fait plus limitées après le geste de résection et la chimiothérapie néo-adjuvante.

Les limites précitées mettent en avant le besoin de l'établissement d'un score pronostique précis dès l'initiation du traitement, qui permettrait alors de préférer un traitement à un autre. Un score pronostique pré-thérapeutique histologique sur la biopsie initiale est donc nécessaire. Mais une fois de plus l'hétérogénéité intra et inter-tumorale rend cette démarche délicate dans l'ostéosarcome.

Des pistes existent néanmoins dans ce domaine. Pour exemple, certaines méthodes innovantes sont à l'essai : Klangjorhor *et al.* ont décrit dans un travail récent une méthode d'évaluation pronostique originale sur des cellules d'ostéosarcome issues de biopsie humaine. Ils identifiaient ainsi *in-vitro* les IC50 de cellules d'ostéosarcome par des tests de cytotoxicité pour les molécules de chimiothérapie d'usage dans le traitement conventionnel. Plus la sensibilité *in vitro* au médicament était basse et plus l'IC50 était élevé, et plus le pronostic de survie globale à 5 ans était mauvais (Klangjorhor *et al.*, 2020). On peut imaginer utiliser cette technique en pratique courante. La méthode semble rapide et fiable pour prédire les résultats cliniques. Ceci permettrait d'identifier les patients pour lesquels la chimiothérapie conventionnelle est la plus appropriée et, à l'avenir, contribuer à faire progresser la thérapie personnalisée. D'autres analyses ont été réalisées sur biopsies humaines, en cherchant à identifier si l'expression de VEGF ou de HER-2 pouvait être liée au pronostic global de l'ostéosarcome (Becker *et al.*, 2013), mais aucune association significative n'a pu être établie dans cette étude. Brouchet *et al.*, ont en revanche identifié des facteurs pronostics d'intérêt sur des données de biopsies issues de la cohorte OS2006. La présence de niveaux de positivité élevés de CD163 mais aussi de CD8 analysés en Immunohistochimie (IHC) sur Tissue-MicroArray (TMA) était associée à un meilleur pronostic en terme de survie avec une forte significativité. Mais la bonne réponse à la chimiothérapie n'était pas corrélée à ces hauts niveaux d'expression sur la biopsie, illustrant bien la complexité du problème (Gomez-Brouchet *et al.*, 2017).

Les scores pronostics conventionnels semblent donc encore insuffisants, et leur association avec des immuno-marquages complémentaires comme le CD163 paraît nécessaire. La nécrose induite par la chimiothérapie seule est encore trop souvent prise en défaut, et une proportion importante de patients jugés bons répondeurs vont finalement rechuter dans les 5 ans, avec une évolution métastatique pour 25% d'entre eux (O'Kane *et al.*, 2015). Notre analyse pronostique reste donc à perfectionner, notamment par la prise en compte de l'hétérogénéité tumorale ou encore de celle du microenvironnement (Botter *et al.*, 2014).

Traitement :

Le traitement de l'ostéosarcome est codifié dans le cadre d'une prise en charge multidisciplinaire, et n'a pas véritablement évolué depuis une trentaine d'années : il associe une polychimiothérapie néo-adjuvante à une chirurgie d'exérèse carcinologique puis une chimiothérapie adjuvante. Les molécules de chimiothérapie les plus utilisées sont le Methotrexate à haute dose, le Cisplatine, l'Ifosfamide ou encore la Doxorubicine... (Figure 17) (Brard et al., 2019; Bruland et al., 2010; Luetke et al., 2014; Piperno-Neumann et al., 2016; Smeland et al., 2019).

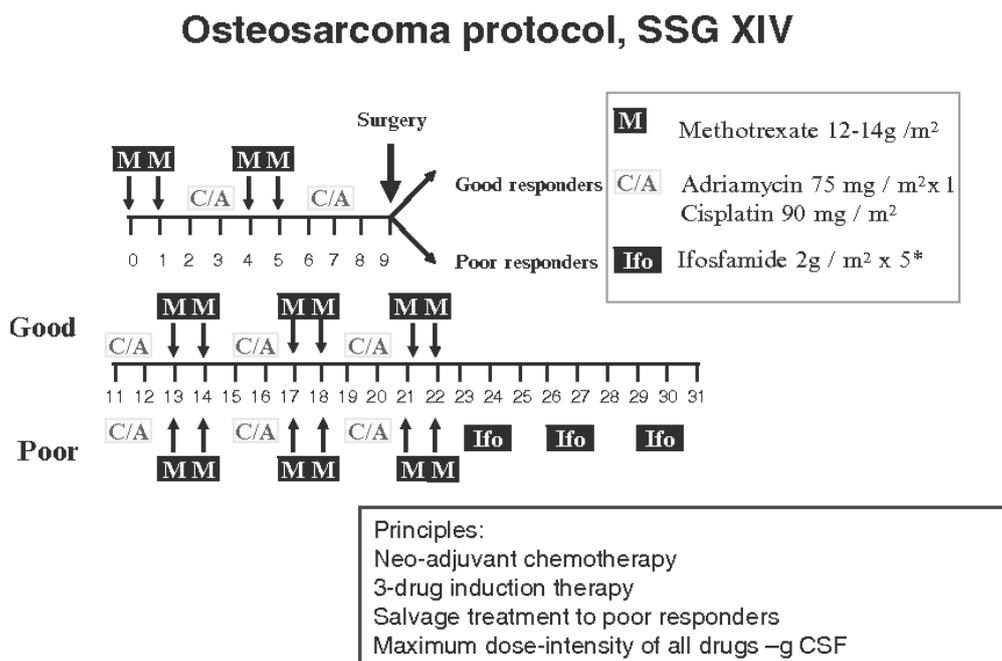


Figure 17 : Traitement classique de l'Ostéosarome tel que décrit par le Scandinavian Sarcoma Group (SSG) en 2009 (Bruland et al., 2010).

La prise en charge des sarcomes osseux devrait être systématiquement initiée en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) spécialisée. En effet le respect des recommandations de

pratique clinique et la survie sans rechute des patients atteints de sarcome sont nettement meilleurs lorsque le traitement initial est guidé par une RCP spécialisée pré-thérapeutique (Blay et al., 2017).

Chirurgie

La chirurgie de résection carcinologique doit être la règle, et les progrès en la matière ont permis à la fin du siècle dernier de limiter fortement le risque d'amputation. Ce geste est donc précédé d'une chimiothérapie néo-adjuvante. Les chirurgies conservatives sont de plus en plus fréquentes grâce aux progrès techniques en terme de reconstruction prothétique mais aussi de résection. Des outils chirurgicaux innovants sont développés pour guider et fiabiliser la résection en termes de marge et d'épargne du stock osseux. Ainsi, les guides de coupe sur mesure, ou Patient-specific instruments (PSI) (Figure 18), permettent de fiabiliser les marges dans les complexes tumeurs de bassin (Gouin et al., 2014).

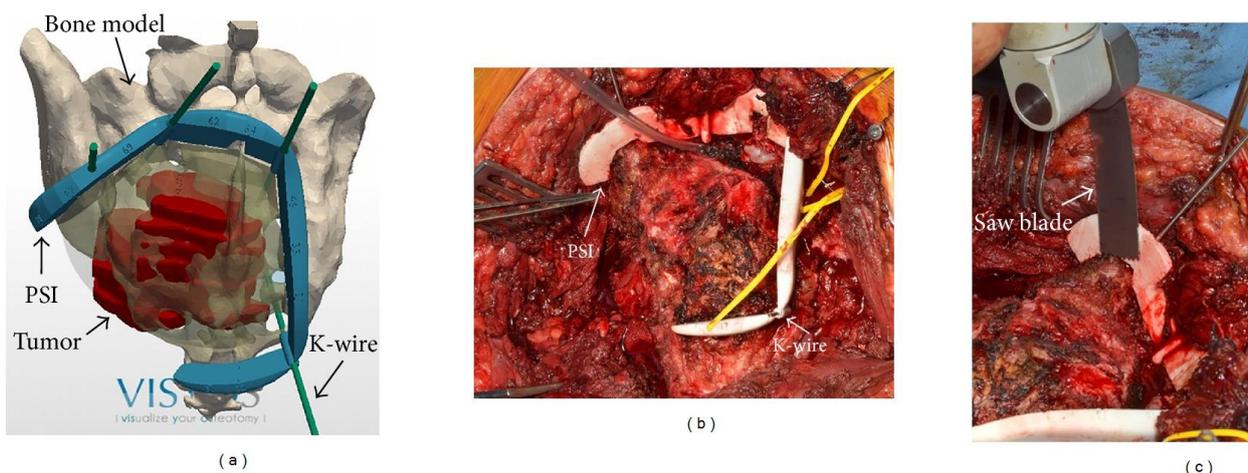


Figure 18 : Situation peropératoire d'un patient atteint d'un sarcome osseux. (a) Le PSI est conçu à l'aide d'un logiciel de conception assistée par ordinateur. (b) Les PSI sont stérilisables pour être manipulés par le chirurgien dans la salle d'opération. Le PSI est positionné sur l'os et fixé temporairement à l'aide de broches de Kirschner. (c) Les coupes sont initiées avec la scie oscillante guidée par les surfaces planes du PSI. PSI : Patient-specific instruments (Gouin et al., 2014).

La navigation per-opératoire scanno-guidée est également un outil prometteur dans les résections de tumeurs du bassin (Fujiwara et al., 2018; Ould-Slimane et al., 2016), une fois de plus pour améliorer la qualité des marges de résection en lien direct avec la survie du patient (Figure 19).

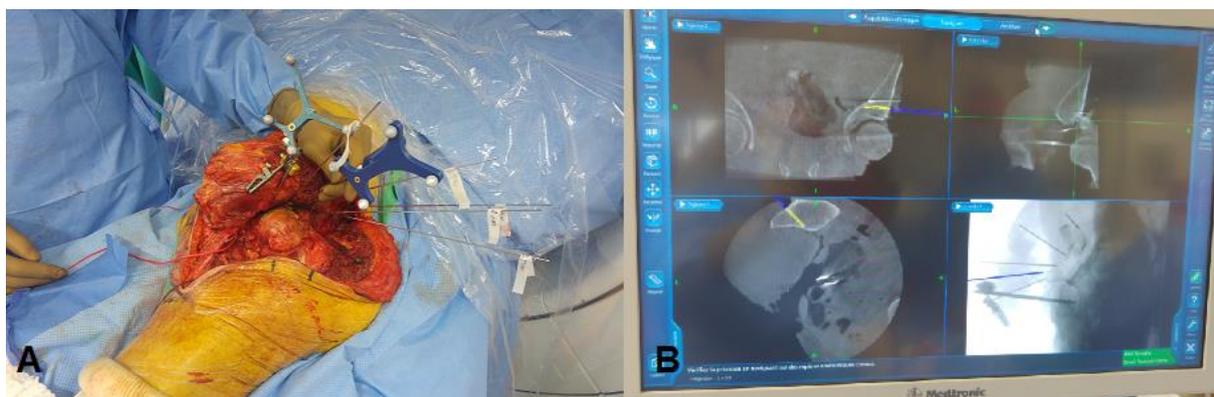


Figure 19 : Résection de tumeur primitive osseuse supra-acétabulaire iliaque gauche sous navigation O-ARM. A : positionnement des broches guide à l'aide d'un outil navigué. B : Visualisation de la navigation per-opératoire sur scanner en coupe axiale, sagittale et frontale (CHU de Nantes).

Généralités

On rapporte une survie d'environ 75% à 5 ans pour les patients atteints de formes isolées, et de 20 à 30% dans les maladies métastatiques ou chez des patients résistants à la chimiothérapie initiale (Allison et al., 2012; Luetke et al., 2014; Smeland et al., 2019). Le pronostic demeure étroitement lié à la réponse des cellules tumorales à la chimiothérapie du point de vue histologique. Ainsi la modulation du protocole de chimiothérapie adjuvante est décidée en fonction de l'évaluation de la qualité de la réponse histologique à la chimiothérapie néo-adjuvante sur la pièce d'exérèse.

La quantification de la nécrose tumorale permet de classer les patients en bons ou mauvais répondeurs (Score de Huvos et Rosen) (Rosen et al., 1979). Ce score s'appuie sur un comptage des cellules tumorales viables résiduelles au sein de la tumeur, les bons répondeurs ayant un taux inférieur à 10% (Luetke et al., 2014; Piperno-Neumann et al., 2016). Ce critère est essentiel et va guider le choix du protocole de chimiothérapie en post-opératoire. On sait cependant que 25% des patients jugés bons répondeurs vont rechuter (O'Kane et al., 2015; Rosen et al., 1979), cet outil pronostic reste donc probablement à l'heure actuelle insuffisant.

Depuis 30 ans, la survie des patients atteints d'ostéosarcome n'a pas connu de sensibles progrès (Allison et al., 2012; Luetke et al., 2014). L'amélioration des traitements reste ainsi un objectif majeur pour de nombreux chercheurs et praticiens : l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, mais aussi l'amélioration de critères prédictifs de réponse aux traitements sont des sujets critiques. Ceci est particulièrement vrai chez les patients identifiés à risque selon nos critères pronostics actuels (caractère métastatique, grade 1 et 2 de Huvos et Rosen...).

Malgré un dynamisme de recherche certain sur cette thématique, le développement de nouvelles thérapies se heurte à la forte hétérogénéité au niveau inter, mais également intra-tumoral de l'ostéosarcome, ainsi qu'à l'absence d'anomalie oncogénique unique. L'ostéosarcome a en effet un nombre de mutations beaucoup plus élevé que le sarcome Sarcome d'Ewing, et c'est pourquoi il n'a pas encore bénéficié d'un profilage moléculaire complet (Lim et al., 2015; Subbiah et al., 2015). Des pistes de traitement en dehors des chimiothérapies conventionnelles sont à l'étude, avec notamment des thérapies ciblées dirigées contre les cellules tumorales mais aussi des cibles indirectes contre le microenvironnement et la vascularisation tumorale (Corre et al., 2020; Jin and Jin, 2020). Ces tumeurs sont en effet intimement liées au microenvironnement au niveau osseux, stromal, vasculaire et immunitaire. La dissémination et la croissance tumorale sont directement en lien avec ce microenvironnement. Des propositions de traitements ciblant cet écosystème sont donc à l'étude.

Thérapeutiques innovantes et études en cours :

Plusieurs pistes de traitements innovants sont explorées. On compte actuellement dans le monde près de 150 études en cours d'inclusion sur la thématique de l'ostéosarcome déclarées sur ClinicalTrail.gov (Figure 20). Ces thérapeutiques innovantes sont le plus souvent proposées en association aux chimiothérapies conventionnelles chez les patients à haut risque ou en récurrence.

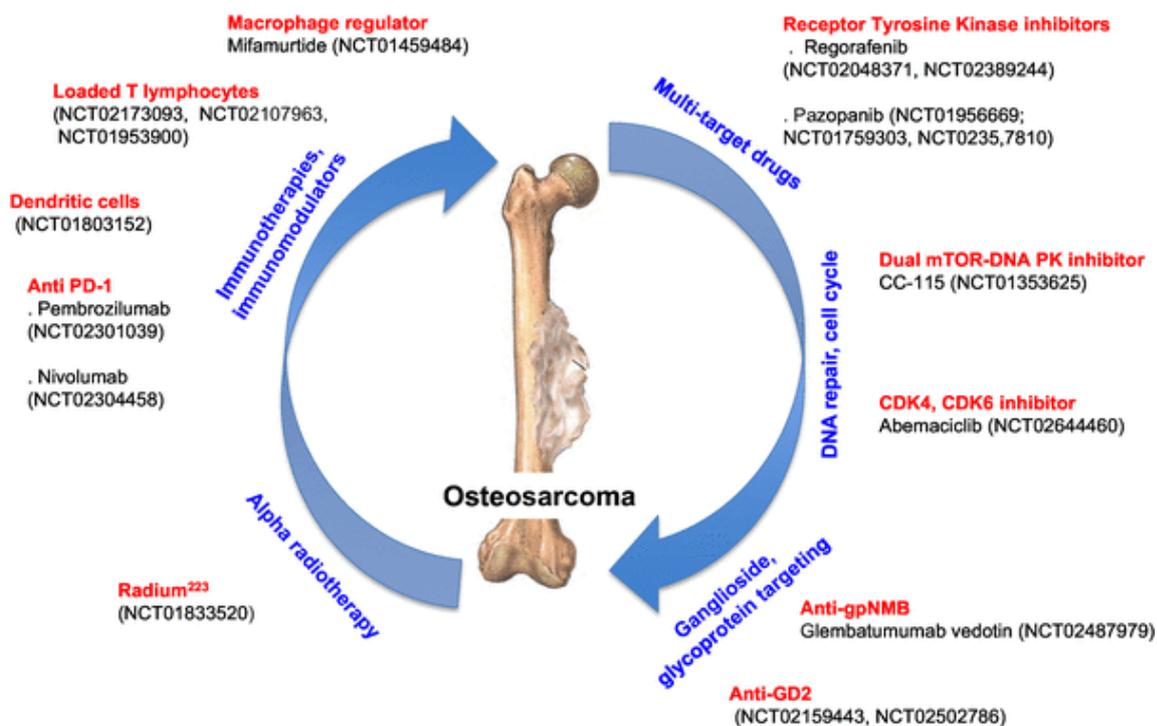


Figure 20 : Essais cliniques récents en cours dans l'ostéosarcome. De nombreuses approches thérapeutiques sont en cours de développement et reposent sur un ciblage spécifique et direct des cellules cancéreuses (par exemple, réparation de l'ADN, cycle cellulaire ou ciblage des glycoprotéines), ou sur un ciblage indirect des cellules cancéreuses par modulation de leur microenvironnement (par exemple immunothérapies). Après intégration dans la matrice osseuse tumorale extracellulaire, les agents radiothérapeutiques alpha peuvent indirectement tuer les cellules cancéreuses. NCT: Number Clinical Trial, Numéro de registre de l'essai clinique national NuClinicalTrials.gov (Brown et al., 2018)

Nous ne traiterons pas dans ce paragraphe des thérapies qui visent spécifiquement le microenvironnement tumoral, tels que le Mifamurtide ou les bisphosphonates. Ces molécules

seront décrites plus loin dans notre deuxième partie d'introduction centrée sur le microenvironnement.

Une des thérapies les plus prometteuses à l'heure actuelle semble être l'inhibiteur de tyrosine kinase (TKI), ces thérapies ciblées peuvent spécifiquement inhiber les récepteurs à tyrosine kinases (RTK). Ces molécules de signalisation ont donc un rôle crucial dans l'activité de régulation des voies de signalisation qui contrôlent la différenciation et la prolifération cellulaires (Figure 21) (Jiao et al., 2018). Il existe 90 RTK codés par le génome humain, ce qui fait autant de cibles thérapeutiques potentielles (Manning et al., 2002; Tian et al., 2020).

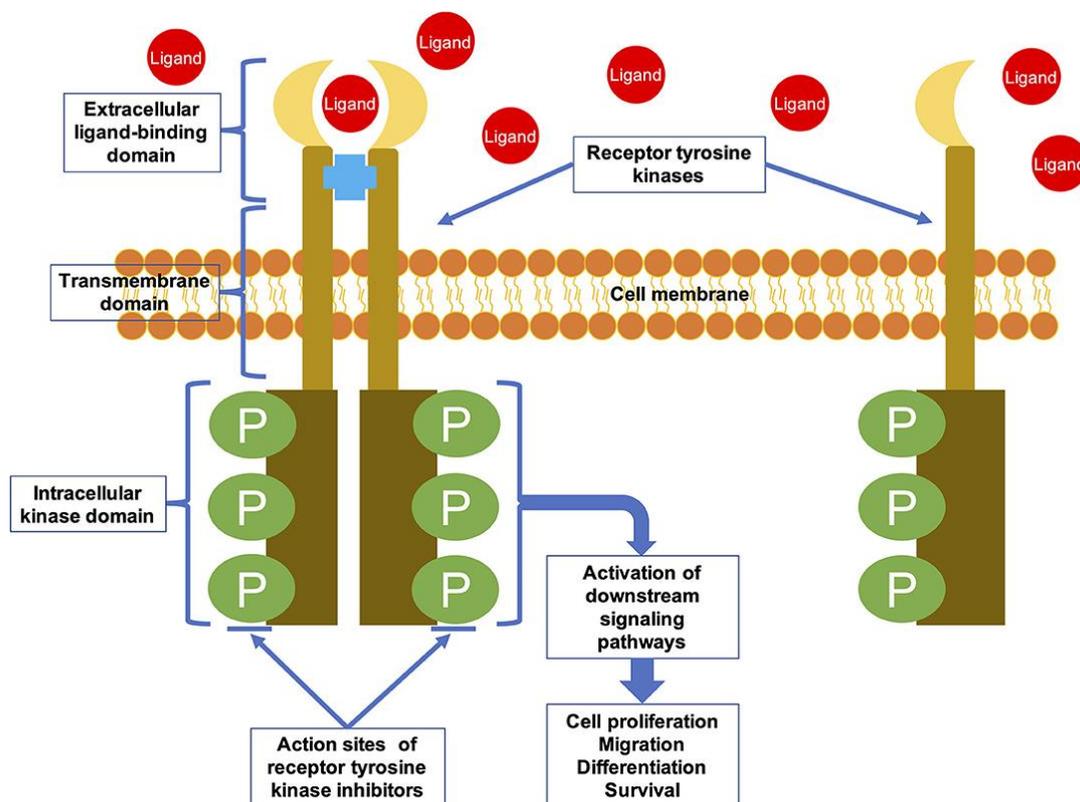


Figure 21 : Caractéristiques structurelles générales et mécanisme d'activation d'un RTK. Les RTK sont des glycoprotéines transmembranaires qui sont composées d'un domaine de liaison au ligand extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine kinase intracellulaire. Ils sont activés par liaison au ligand puis transduisent le signal extracellulaire vers le cytoplasme en phosphorylant les résidus tyrosine sur les récepteurs eux-mêmes (autophosphorylation) et sur les protéines de signalisation d'aval (Tian et al., 2020).

Les TKI ayant un effet thérapeutique intéressant dans l'ostéosarcome sont entre autres l'apatinib, le cabozantinib, le lenvatinib, le régorafénib ou le sorafénib avec différents TK ciblées de façon variable (Figure 22). Nous développerons plus loin le rôle conjoint de ces molécules sur le microenvironnement tumoral.

TKIs	RTKs and IC ₅₀ (nM, mean)								Clinical outcome
	VEGFR1	VEGFR2	VEGFR3	KIT	RET	PDGFR α	PDGFR β	FGFR1	
Apatinib	70	1	-	429	13	>1,000	-	>1,0000	PR rate 43% (16/37), 4-months PFS rate 56.76%, m-PFS 4.5 m.
Axitinib	0.1	0.2	0.29	1.7	>1,000	5	1.6	231	5-months SD rate 100% (2/2).
Cabozantinib	12	0.035	6	4.6	5.2	-	234	5,294	PR rate 12% (5/42), 6-months PFS rate 33%, m-PFS 6.2 m.
Cediranib	5	<1	3	2	-	36	5	26	One of four patient had PR after two cycles.
Imatinib	19,500	10,700	5,700	97	-	72	-	31,200	Five of 27 patients had SD at 4 months.
Lenvatinib	4.7	3	2.3	85	6.4	29	-	61	PR rate 8% (2/26), 4-months PFS rate 33%, m-PFS 3.4 m.
Regorafenib	13	4.2	46	7	1.5	-	22	202	PR rate 8% (2/26), 12-weeks PFS rate 62%, m-PFS 16.4 w.
Sorafenib	-	4	20	68	0.4	18	57	580	PR rate 9% (3/35), 4-months PFS rate 46%, m-PFS 4 m.

PFS, progression-free survival; TKI, tyrosine kinase inhibitor; RTKs, receptor tyrosine kinases; PR, partial response; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; KIT, stem cell factor receptor; RET, rearranged during transfection; FGFR1, fibroblast growth factor receptor; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; SD, stable disease.

Figure 22 : Cibles et résultats cliniques des TKI qui ont donné des résultats dans des essais cliniques contre l'ostéosarcome (Tian et al., 2020).

L'inhibition d'un type unique de TK dans le traitement de l'ostéosarcome ne semble pas efficace, il parait nécessaire d'inhiber simultanément plusieurs TK pertinents pour obtenir un effet thérapeutique majeur (Tian et al., 2020). Cette nécessité de cibles multiples est à mettre en lien avec l'hétérogénéité de cette tumeur.

Hétérogénéité tumorale :

L'ostéosarcome présente une très forte hétérogénéité, au niveau intra-tumoral d'abord, mais également entre les individus : l'analyse génomique de ces tumeurs est de fait complexe avec

de nombreux sous-types histologiques. Cette spécificité l'éloigne du Sarcome d'Ewing dont elle partage par ailleurs de nombreuses similitudes cliniques. Un ciblage spécifique, ou un facteur pronostic unique paraissent difficile à déterminer du fait de ces caractéristiques. L'appréciation de cette hétérogénéité tumorale est critique dans la compréhension de cette tumeur et le développement de nouvelles thérapies efficaces (Brown et al., 2018; Gibbs et al., 2011).

L'hétérogénéité des tumeurs est directement liée à la fois à l'histoire naturelle des cellules cancéreuses, mais aussi à leur dialogue avec les protagonistes du microenvironnement local (Schiavone et al., 2019).

Le microenvironnement

Généralités

En 2000 puis en 2011, Hanahan et Weinberg posaient et actualisaient les caractéristiques fondamentales des cellules tumorales dans leurs articles « The Hallmarks of Cancer » (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). L'émergence du concept de microenvironnement considérant la tumeur non plus comme un simple amas de cellules autonomes, mais comme un organe en perpétuelle interaction avec les cellules de son environnement a permis de considérer que sur les 8 caractéristiques des cellules cancéreuses, 7 impliquent l'action du microenvironnement tumoral (Figure 23) (Hanahan and Coussens, 2012).

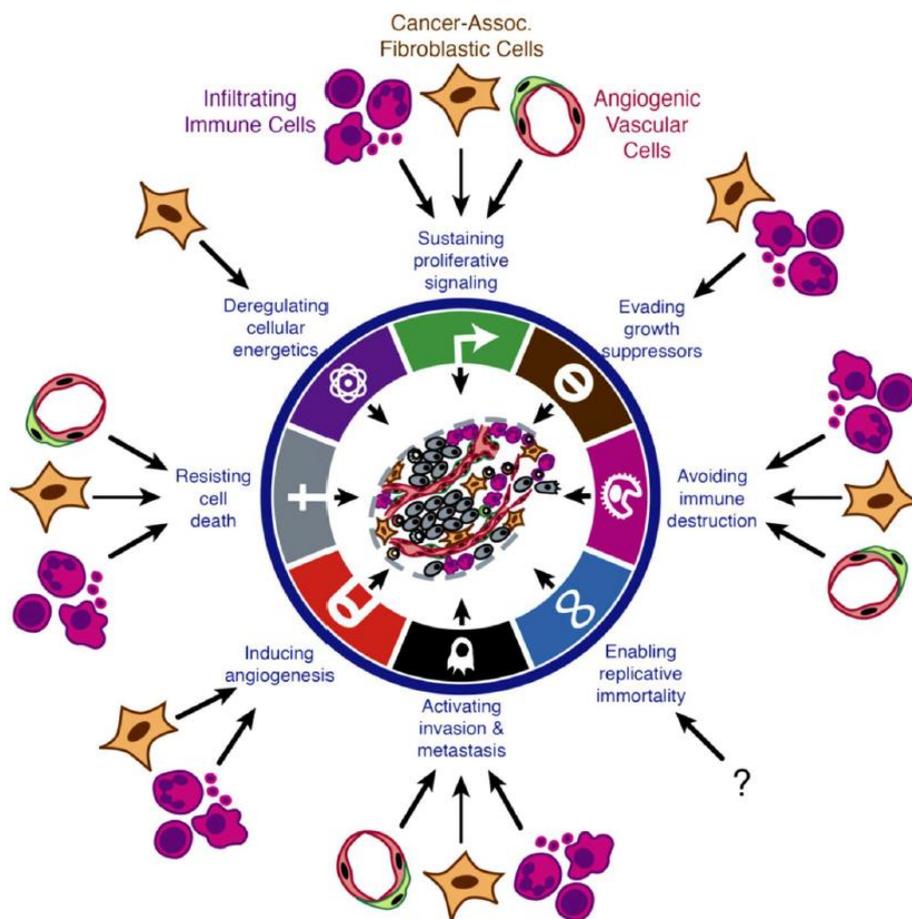


Figure 23 Contributions multifactorielles des cellules stromales aux caractéristiques de la tumeur (Hanahan and Coussens, 2012).

L'exploration du microenvironnement est donc devenue d'un intérêt crucial, tant dans la compréhension des mécanismes qu'en termes d'implications cliniques en cancérologie. Nous allons ici exposer les particularités de la vascularisation et du microenvironnement osseux normal, puis nous développerons les spécificités du microenvironnement tumoral osseux en nous intéressant une fois de plus aux intrications spécifiques de l'environnement vasculaire dans ce contexte. Enfin nous détaillerons pour chaque point les pistes thérapeutiques qui y sont spécifiquement liées.

La vascularisation osseuse et son microenvironnement en condition physiologique

Le microenvironnement est par nature complexe et dynamique. L'environnement osseux est particulier, du fait de ses différents rôles physiologiques : outre l'aspect structurel qui fait intervenir des mécanismes de remodelage spécifique, il est aussi responsable de l'hématopoïèse avec la création des lignées sanguines. Cet environnement remarquable fait donc entrer en scène de nombreux éléments cellulaires : les ostéocytes avec les ostéoblastes et ostéoclastes dans leur matrice extracellulaire (organique et minérale) ; les chondrocytes, les cellules stromales (cellules souches mésenchymateuses, dendritiques et fibroblastes), les cellules vasculaires (endothéliales et péricytes), et les cellules de l'immunité (monocytes/macrophages et lymphocytes). Le fonctionnement du tissu osseux et son homéostasie sont intimement liés à son mode de vascularisation, il apparaît donc important d'exposer la vascularisation osseuse physiologique afin de pouvoir développer ensuite ses intrications avec le microenvironnement tumoral.

Généralités, architecture et fonction de la vascularisation de l'os

Les vaisseaux sanguins sont essentiels pour le transport de fluides, de macromolécules et de cellules au sein de l'organisme. Ces structures vasculaires sont constituées de cellules endothéliales qui s'intègrent dans différents organes et se spécialisent suivant les tissus environnants. Le transport de nutriments et d'oxygène, mais également la diffusion de traitements se produisent au niveau de la microcirculation. Elle est le lieu d'échange entre le système circulatoire et les organes qu'elle vascularise au niveau des capillaires. L'organisation de ces zones de transit, très actives biologiquement, présente des spécificités tissulaires propres. Cependant il existe une architecture globale commune classiquement décrite (Figure 24) (Guyen et al., 2019).

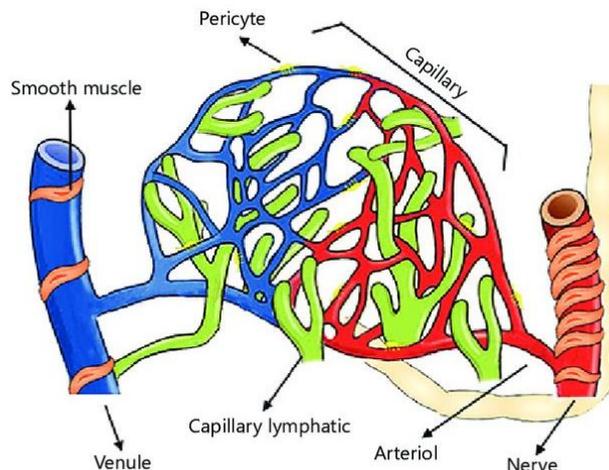


Figure 24 : Anatomie micro-vasculaire. La microcirculation fait partie du système vasculaire et se compose de petits vaisseaux : artérioles, capillaires et veinules. Les capillaires lymphatiques transportent le liquide extravasculaire dans le système veineux. Les artérioles sont entourées de cellules musculaires lisses vasculaires responsables de la régulation du tonus des artérioles, une couverture péricytaire est présente au niveau capillaire (Guyen et al., 2019).

Bien qu'elle ait retenu l'attention des anatomistes depuis plusieurs centaines d'années, la vascularisation osseuse ne révèle ses secrets que depuis peu. Les difficultés techniques liées à la

visualisation des vaisseaux au sein de l'os, ainsi que le caractère supposé inerte de ce dernier ont pu expliquer ce retard. En effet, l'examen microscopique se confronte à des difficultés techniques propres à l'os (dureté et opacité) et nécessite des outils et des techniques qui n'ont été accessibles qu'à la fin du XXème siècle. De plus, le caractère solide et immuable de l'os en a longtemps fait un sujet d'étude principalement mécanique, l'étude biologique et vasculaire étant plus récente (Brookes and Revell, 2012). Une description complète de l'anatomie de la vascularisation osseuse est désormais à disposition, et les trajets vasculaires sont mieux connus (Figure 25).

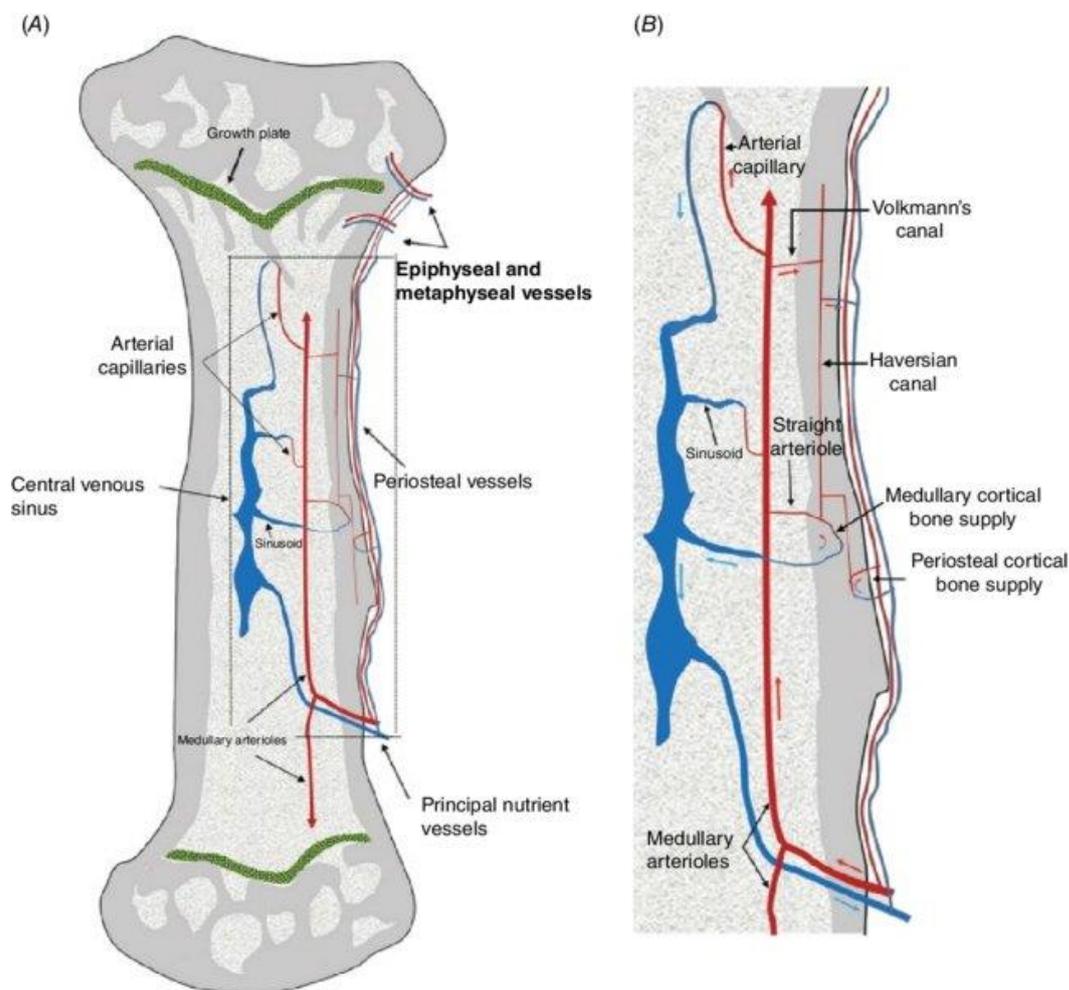


Figure 25 : (A) Présentation schématique de la vascularisation des os longs. (B) Gros plan de la région encadrée en (A) (Lafage-Proust and Roche, 2018).

Les interfaces entre la vascularisation périostée et la vascularisation centromédullaire, avec ses zones de transit (canaux de Havers, canaux de Volkman...), au niveau cortical mais également au niveau épiphysaire ou métaphysaire ont fait l'objet de descriptions précises (Lafage-Proust and Roche, 2018). La distribution complexe de la vascularisation osseuse permet à l'os de recevoir jusqu'à environ 10% du débit cardiaque, cet apport sanguin considérable sous-tendant un haut degré de cellularité, de remodelage et de réparation. La vascularisation osseuse est donc une interface entre ces grandes fonctions (Carulli et al., 2013). Du point de vue architectural, chaque unité de remodelage osseux est associée à un capillaire dans les enveloppes corticales et trabéculaires (Lafage-Proust et al., 2015). Les vaisseaux sous-périostés et ceux de la moelle osseuse sont connectés via le réseau vasculaire cortical. Les vaisseaux médullaires sont assez hétérogènes, ils sont constitués de petits capillaires « classiques » (<10-15 μ m) et d'une majorité de capillaires sinusoides (20–30 μ m), qui appartiennent au système capillaire veineux (Edwards et al., 2008). Ces réseaux capillaires et sinusoides sont reliés par des vaisseaux dits de transition (Figure 26).

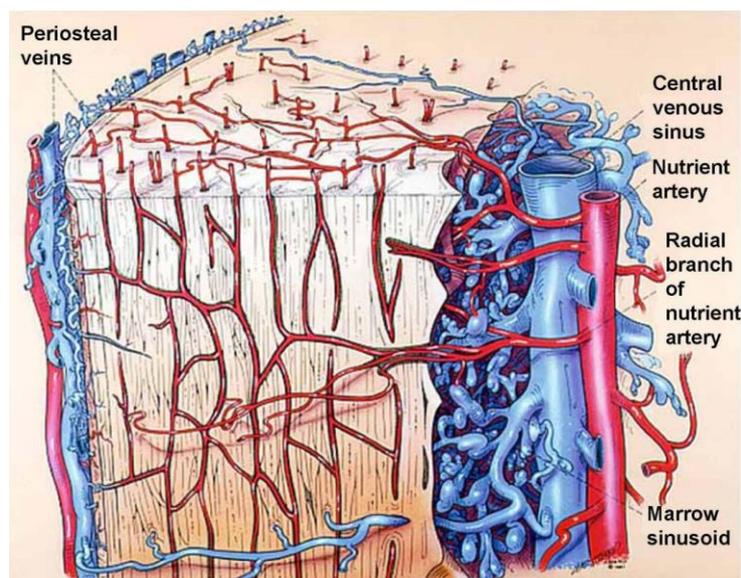


Figure 26 : La connexion vasculaire entre la moelle osseuse, l'os cortical et le périoste. D'après la figure 9.37 de Brooks et Revell (1998)(Cowin and Cardoso, 2015).

La membrane basale des vaisseaux sinusoides de la moelle osseuse est absente ou discontinue afin de faciliter les échanges. Leur paroi est perforée par des pores inter- et intra-endothéliaux à travers lesquels les cellules hématopoïétiques matures se dirigent vers la circulation sanguine, tandis que les molécules solubles intravasculaires et relativement grosses peuvent être rapidement extravasées (Wang et al., 2004).

Ces zones d'échange vont permettre le développement et la croissance, le remodelage osseux et les processus de consolidation, mais aussi l'hématopoïèse et l'homéostasie du métabolisme minéral (Su et al., 2019). L'os est en effet un organe composite qui remplit plusieurs fonctions interconnectées, avec un besoin d'échanges majeur : pour la production et la distribution dans la circulation générale des lignées sanguines, mais également pour son apport de nutriments et d'oxygène. Les liens entre l'oxygénation tissulaire et la fonction ostéoblastique (prolifération, différenciation et production de collagène) sont désormais établis (Figure 27).

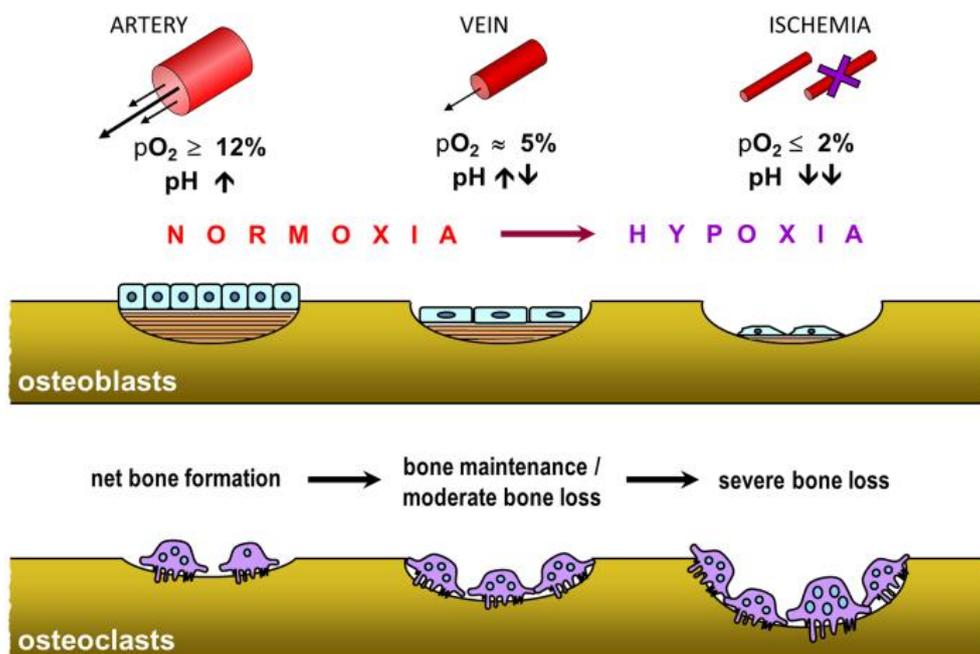


Figure 27 : Diagramme schématique résumant les principaux effets de l'oxygène sur la fonction des cellules osseuses (Marenzana and Arnett, 2013).

L'ostéoblastogenèse est donc inhibée dans un milieu hypoxique, les ostéoblastes entrant dans un état de repos. De plus l'hypoxie stimule la formation d'ostéoclastes à partir de précurseurs mononucléés (en présence de RANKL et de M-CSF), entraînant une augmentation de la résorption osseuse. L'impact négatif de l'hypoxie est exacerbé par l'acidose qui l'accompagne, bloquant la minéralisation de la matrice et stimulant la résorption des ostéoclastes matures (Marenzana and Arnett, 2013).

Mais d'autres mécanismes de régulation impliquent aussi le tissu osseux : des fonctions endocrines complexes sont par exemple régulées par des hormones dérivées des ostéoblastes (FGF23, LCN2 et OC) (Oury and Oury, 2018). L'os est donc un organe aux interactions nombreuses nécessitant un réseau vasculaire complexe.

Vaisseaux H et L dans l'os normal et en croissance

Des travaux récents ont permis de compléter la description de la vascularisation osseuse, et de préciser le rôle et la répartition de sous-types de vaisseaux spécifiques. Des avancées notables ont été faites dans ce domaine. L'équipe d'Adams *et al.* a ainsi décrit les vaisseaux de type H (qui expriment fortement le CD31 et l'endomucine : CD31+/Endomucine+), et les vaisseaux de type L (qui expriment faiblement ces marqueurs (Figure 28) (Kusumbe et al., 2014; Sivaraj and Adams, 2016) sur un modèle murin de souris en croissance.

Ils ont identifié les spécificités de marquage en IHC de ces vaisseaux et décrit leur répartition. Les vaisseaux sanguins L proviennent des vaisseaux centromédullaires, et cheminent vers les vaisseaux H qui s'organisent et fusionnent en réseau anastomotique au contact de la plaque de croissance avec un aspect bourgeonnant (Kusumbe et al., 2014).

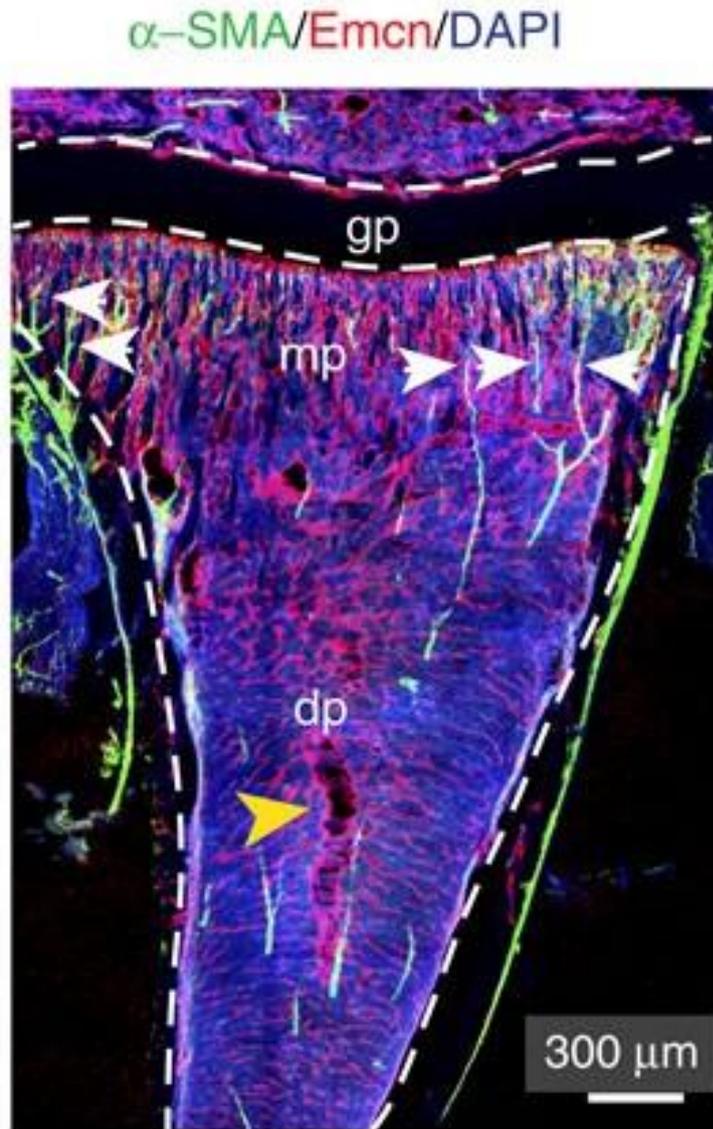


Figure 28 : Représentation des vaisseaux H et L sur modèle murin d’une souris en croissance. Image de microscopie à balayage de la vascularisation tibiale en immunofluorescence pour Emcn (Endomucine) (rouge) et α -SMA (smooth actin muscle actin) (vert). Les artères couvertes par les cellules α -SMA + se connectent (flèches) aux vaisseaux métaphysaires (mp) de type H près de la plaque de croissance (lignes pointillées, growth plate : gp). Les vaisseaux sinusoidaux de type L se connectent à la grosse veine centrale (pointe de flèche jaune). (Kusumbe et al., 2014).

Des modifications de flux vasculaire ont pu être identifiées dans les travaux de Kusumbe *et al.* en imagerie intra-vitale entre les vaisseaux H et L. Les auteurs ont ainsi observé des différences de vitesse majeures qui impacteraient directement les mécanismes d’angiogenèse et d’ostéogenèse (Kusumbe et al., 2014; Ramasamy et al., 2014; Vanderbeck and Maillard, 2019).

Plus le flux vasculaire est important dans les vaisseaux H, plus la voie Notch est stimulée, entraînant en conséquence une augmentation de l'ostéoblastogenèse et de l'angiogenèse. La maturité des souris modifierait directement la proportion des vaisseaux H et les conséquences sur l'ostéogenèse, ce phénomène pourrait être un des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'ostéoporose ; les souris les plus âgées présentent en effet une proportion beaucoup plus faible vaisseaux H (Kusumbe et al., 2014; Sivaraj and Adams, 2016). Le lien privilégié des vaisseaux H avec les missions d'angiogenèse et de d'ostéoblastogenèse pourrait en faire un point d'intérêt majeur dans le cadre de l'ostéosarcome.

Microenvironnement tumoral et spécificités dans l'ostéosarcome

On admet classiquement que les mutations oncogènes des cellules tumorales provoquent l'initiation du cancer (Balkwill et al., 2012). D'autres études font cependant mention du rôle initiateur potentiel d'un microenvironnement altéré dans la tumorigenèse, ainsi une inflammation chronique ou un processus de cicatrisation pourraient aussi devenir l'élément déclencheur avec un effet promoteur de tumeur (Khosravi et al., 2018; Mantovani et al., 2008; Todoric and Karin, 2019). Une fois cette initiation enclenchée, les cellules tumorales se multiplient et vont interagir avec les cellules environnantes, elles vont recruter ces dernières et détourner à leur profit les moyens de communications intercellulaires tels que des facteurs de croissances, des chimiokines ou des vésicules extracellulaires (Jin and Jin, 2020). Ce piratage des voie de communication a pour objectif le développement tumoral, par l'angiogenèse notamment, et conduit invariablement à une augmentation du potentiel de prolifération (Cheng et al., 2020; Puisieux et al., 2013). L'assujettissement de ce milieu par la tumeur, forme ainsi le microenvironnement tumoral, qui permet à la tumeur de croître, de disséminer, et de résister aux traitements.

En 1863, Virchow a le premier évoqué le fait que l'inflammation et le cancer étaient liés et interagissaient dans ce qu'il qualifiait « l'infiltration lympho-réticulaire ». Puis Paget en 1889 a

élaboré la théorie du « seed and soil » dite de la graine et du terreau, identifiant que les métastases ne se répartissaient pas au hasard dans l'organisme et ne pouvaient croître que dans un environnement approprié. Il fut plus tard complété par Ewing, avec la « circulation theory » en 1928, décrivant plus en détail la migration de cellules tumorales du cancer de prostate (diaspora tumorale) en utilisant la réseau vasculaire (Ewing, 1928; Paget, 1889). Depuis ces premières descriptions du concept de microenvironnement, l'exploration de ce dernier n'a eu de cesse de progresser. Sa compréhension en conditions physiologique et tumorale est devenue un sujet de recherche central. Il est classiquement décrit plusieurs sous-types de microenvironnements, faisant interagir plusieurs éléments avec les cellules tumorales (Jin and Jin, 2020). Différentes catégories cellulaires interagissent en particulier au niveau osseux avec la tumeur : les cellules du remodelage osseux, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules immunitaires, ainsi que les cellules du microenvironnement vasculaire que nous avons pu décrire en condition physiologique. Nous allons maintenant décrire les interactions et échanges entre tumeur et tissu osseux dans le cadre de l'ostéosarcome.

L'os est composé de nombreux types cellulaires distincts et spécifiques (ostéoblastes, ostéoclastes, chondrocytes, cellules souches mésenchymateuses, cellules hématopoïétiques, cellules endothéliales, immunitaires). Il est le lieu d'interactions majeures équilibrées par la formation et le remodelage osseux (Alfranca et al., 2015; Lamora et al., 2016). Le microenvironnement tumoral est également impacté par toutes les modifications physiques (pH, pression interstitielle), ou chimiques (oxygénation tissulaire, gradients de nutriments...) (Avnet et al., 2016; Nagelkerke et al., 2015). Les échanges entre l'ostéosarcome et le microenvironnement osseux font donc intervenir de nombreux signaux environnementaux, induits par de multiples cytokines, chimiokines et facteurs de croissance (Alfranca et al., 2015), mais également par des vésicules extracellulaires. Ces dernières sont considérées aujourd'hui comme des vecteurs

efficaces de communication entre les cellules, et de nouvelles cibles pour des thérapeutiques innovantes (Corre et al., 2020; Khalife et al., 2020; Mathieu et al., 2019; Perut et al., 2019).

L'équilibre physiologique et la complexe homéostasie du milieu osseux en font une niche de choix pour les cellules tumorales issues de tumeurs primitives (ostéosarcome, sarcome d'Ewing, chondrosarcome) mais également de métastases (cancers ostéophiles : sein, poumon...), qui parviennent à prendre à leur compte et à se nourrir des interactions chimiques et cellulaires de l'environnement afin de proliférer ou d'engager un processus métastatique.

Nous allons à présent décrire les sous-populations cellulaires les plus importantes décrites dans le microenvironnement de l'ostéosarcome, ainsi que les axes thérapeutiques qu'elles laissent entrevoir.

Les cellules osseuses et le remodelage osseux

Description et facteurs pronostiques

Le développement de l'ostéosarcome est généralement associé à une ostéolyse, souvent douloureuse, pouvant aller jusqu'à la fracture. L'agressivité de l'ostéosarcome a déjà été corrélée à des marqueurs de l'ostéolyse dans quelques études où elle a été identifiée comme un facteur de mauvais pronostic (Figure 29) (Avnet et al., 2008; Toledo et al., 2010).

Au stade précoce de la maladie, la prolifération tumorale dans l'environnement osseux conduit à un dérèglement de l'équilibre entre ostéoblastes et ostéoclastes, au profit d'une différenciation ostéoclastique exacerbée et d'une résorption osseuse locale (Brown et al., 2018). À leur tour, les ostéoclastes permettent la libération des facteurs pro-tumoraux (cytokines, des composants de la matrice extracellulaire comme l'insulin-like growth factor 1 (IGF1) ou le transforming growth factor- β (TGF- β)...) initialement piégés dans la matrice organique du tissu osseux (Lamora et al.,

2016; Wittrant et al., 2004). Ces molécules vont alors stimuler la prolifération tumorale, et engendrer le cercle vicieux ostéoclastique désormais bien reconnu.

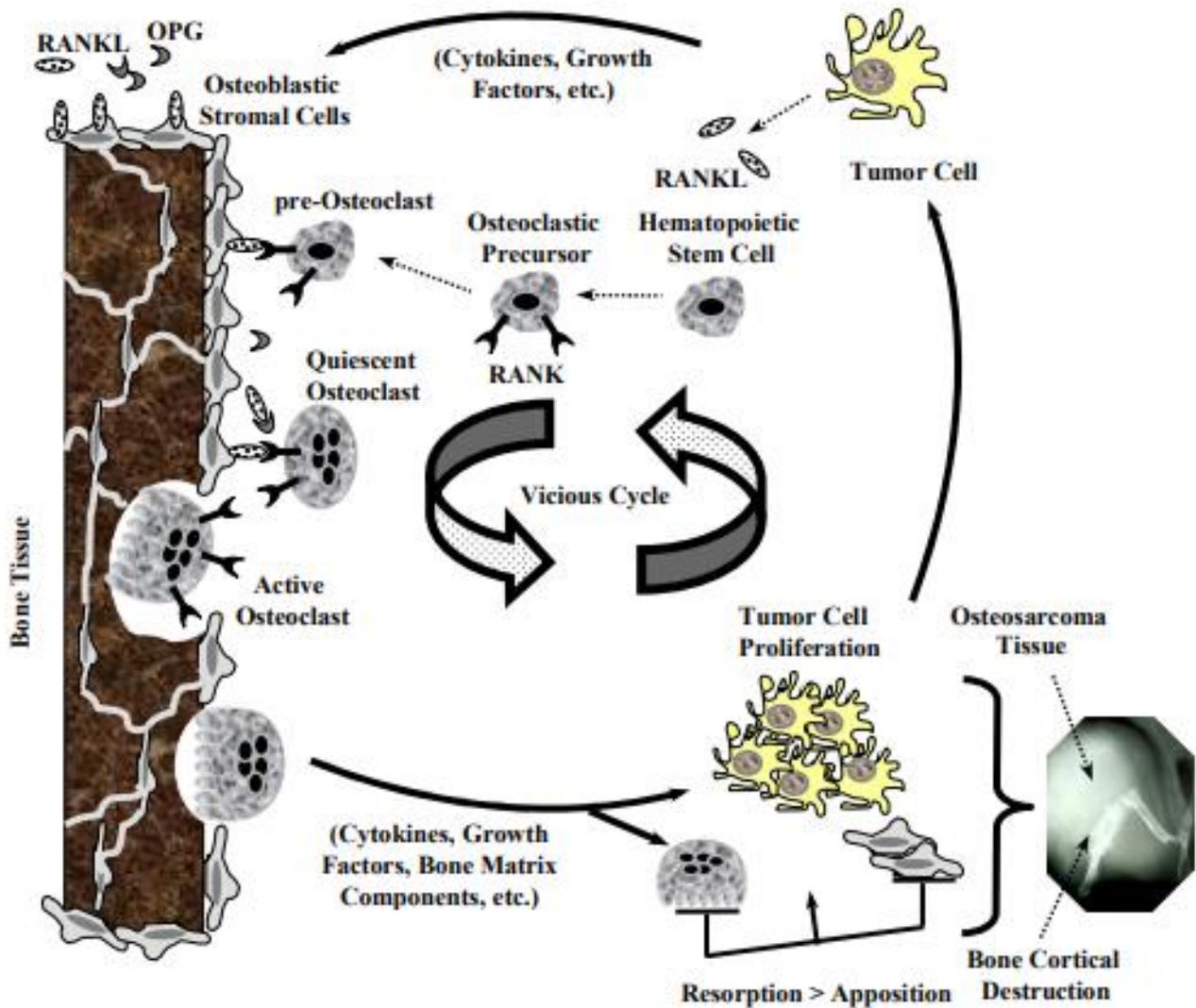


Figure 29 : Représentation schématique de la prolifération des cellules tumorales et du cercle vicieux ostéolytique. Les cellules tumorales libèrent des médiateurs solubles tels que des hormones, des cytokines, des facteurs de croissance qui agissent sur les cellules stromales ostéoblastiques. Les cellules stromales produisent RANKL, qui se lie à son récepteur RANK exprimé sur les précurseurs d'ostéoclastes, améliorant la formation d'actifs ostéoclastes qui effectuent la résorption osseuse. Parfois, des cellules tumorales sont stimulées pour libérer directement une forme soluble de RANKL. Les ostéoclastes actifs libèrent alors des facteurs de croissance, cytokines ou composants de la matrice osseuse stockés qui à leur tour activent la prolifération tumorale. Le cercle vicieux induit ainsi à la fois la prolifération des cellules tumorales et la résorption osseuse. (Wittrant et al., 2004).

Pistes de traitement

L'arrêt de cette cascade est un enjeu de choix dans le traitement de l'ostéosarcome. Plusieurs acteurs de cette voie ont été identifiés. Des tentatives de traitement inhibant le récepteur à l'IGF-1 ont été développées, puis arrêtées faute de résultats cliniques tangibles (Asmane et al., 2012). D'autres sont à l'étude pour endiguer ce cercle vicieux pro-tumoral ostéoclastique, comme l'utilisation de compétiteurs à la fixation de RANKL à son récepteur RANK (Chen et al., 2015; Lamoureux et al., 2007; Rousseau et al., 2011). Le Denosumab, un anticorps dirigé contre RANKL est aussi en essai. Il inhibe efficacement l'activité des ostéoclastes, et est surtout utilisé pour le traitement des métastases osseuses, du myélome multiple ou des tumeurs à cellules géantes. Actuellement, aucun résultat clinique n'a été rapporté, sauf en association avec le Multi-Kinase Inhibiteur (MKI) Sorafénib, mais une étude clinique est en cours chez des patients en situation de récurrence (NCT02470091) (Cathomas et al., 2015; Savvidou et al., 2017). Cependant il faut rester prudent en termes d'association, car le récent travail de Punzo *et al.* identifie une action inhibitrice de l'effet thérapeutique de la Doxorubicine par le Dénosumab sur des lignées humaines d'ostéosarcome (MG63 and U-2 OS) (Punzo et al., 2020).

La mise en évidence du cercle vicieux ostéoclastique dans l'ostéosarcome est donc à l'origine de nombreuses investigations précliniques et cliniques. La plus prometteuse pourrait porter sur l'inhibition de l'action des ostéoclastes par des agents chimiques anti-résorptifs comme les bisphosphonates (Zolédronate) (Brown et al., 2018; Moriceau et al., 2010; Odri et al., 2014; Ory et al., 2005). Ce traitement a été analysé avec des résultats précliniques identifiant une augmentation de la survie chez la souris ainsi qu'une diminution du taux de métastases. L'efficacité sur modèle murin n'a malheureusement pas été suivie de résultats favorables chez l'homme. L'essai clinique de phase III OS2006, n'a pas permis de retrouver d'effet bénéfique sur la survie à l'ajout du Zoledronate à la chimiothérapie conventionnelle, illustrant la limite d'un modèle préclinique (Figure 30) (Piperno-Neumann et al., 2016).

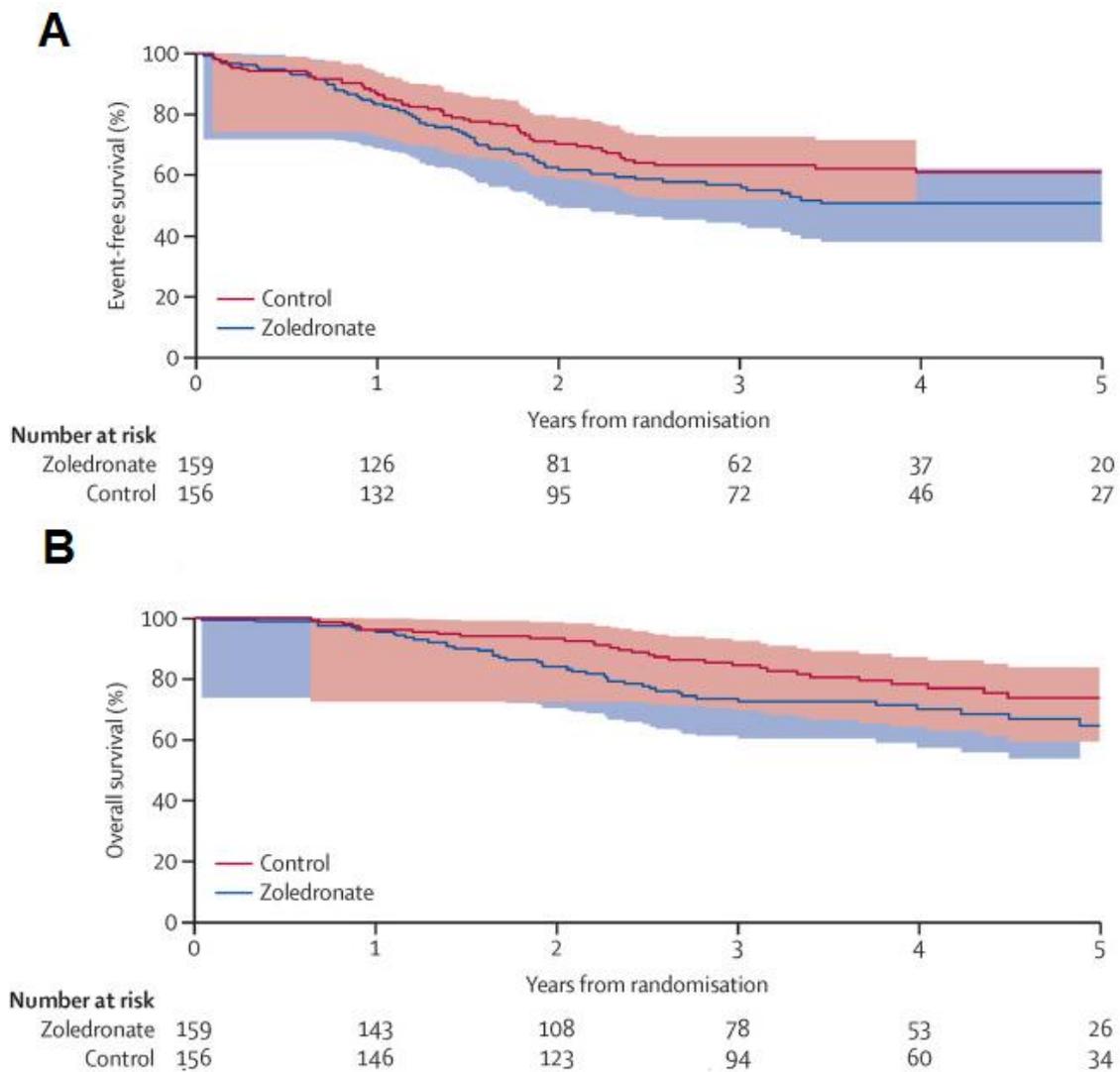


Figure 30: Courbes de survie de l'étude OS2006 avec randomisation en deux bras zoledronate et contrôle. A : Survie sans récurrence, B : survie globale.

Par ailleurs, on note que les bisphosphonates agiraient également sur le microenvironnement immunitaire avec un rôle inhibiteur non seulement sur la différenciation, mais aussi sur l'apoptose des macrophages. Ces cellules jouent ainsi un rôle majeur dans le microenvironnement tumoral de l'ostéosarcome (Brown et al., 2018; Junankar et al., 2015; Piperno-Neumann et al., 2016).

Les cellules immunitaires

Description et facteurs pronostiques

La relation entre l'ostéosarcome et l'environnement immunitaire pourrait être une des clés du traitement de l'ostéosarcome comme l'avancent Hong *et al.* (Hong et al, 2020). A ce titre, les macrophages pourraient être un des composants cellulaires les plus étudiés à l'heure actuelle dans l'ostéosarcome. En effet, les macrophages associés aux tumeurs ou tumor-associated-macrophage (TAM) initialement décrits (Gordon and Taylor, 2005), ont été subdivisés en deux sous-populations : les macrophages polarisés M1 considérés comme ayant une activité pro-inflammatoire anti-tumorale et les macrophages polarisés M2, qui sont définis comme des modulateurs pro-tumoraux en raison de leur impact sur le processus néo-angiogénique et métastatique (Dumars et al., 2016; Qian and Pollard, 2010).

Cette dichotomie s'est finalement révélée discutable, mais le rôle des macrophages apparaît malgré tout primordial dans l'initiation et la progression des ostéosarcomes. L'étude de Gomez-Brouchet *et al.* a clairement mis en évidence une corrélation positive entre l'infiltrat macrophagique (éléments marqués CD68+ et CD163+) et la survie globale, et moins de phénomènes métastatiques. Cette analyse a été réalisée à partir de biopsies issues de la cohorte OS2006 (Gomez-Brouchet et al., 2017; Piperno-Neumann et al., 2016).

L'infiltrat lymphocytaire s'avère également important pour le pronostic de la maladie, puisque la présence de nombreux éléments CD8+ était corrélée à une meilleure survie. Ces conclusions rejoignent celle de l'étude de Fritzsching *et al.* qui observe qu'un ratio CD8+/FOXP3+ élevé peut être considéré comme un facteur de bon pronostic (Fritzsching et al., 2015; Gomez-Brouchet et al., 2017). Les résultats de ces études plaident pour un rôle majeur de l'environnement immunitaire dans le degré d'agressivité de la tumeur.

Pistes de traitement

Un screening systématique de ces marqueurs sur biopsies humaines permettrait de stratifier les patients en fonction de leur environnement immunitaire et ainsi de leur proposer des thérapies spécifiques, un algorithme a d'ailleurs été proposé dans ce sens (Figure 31) (Gomez-Brouchet et al., 2017).

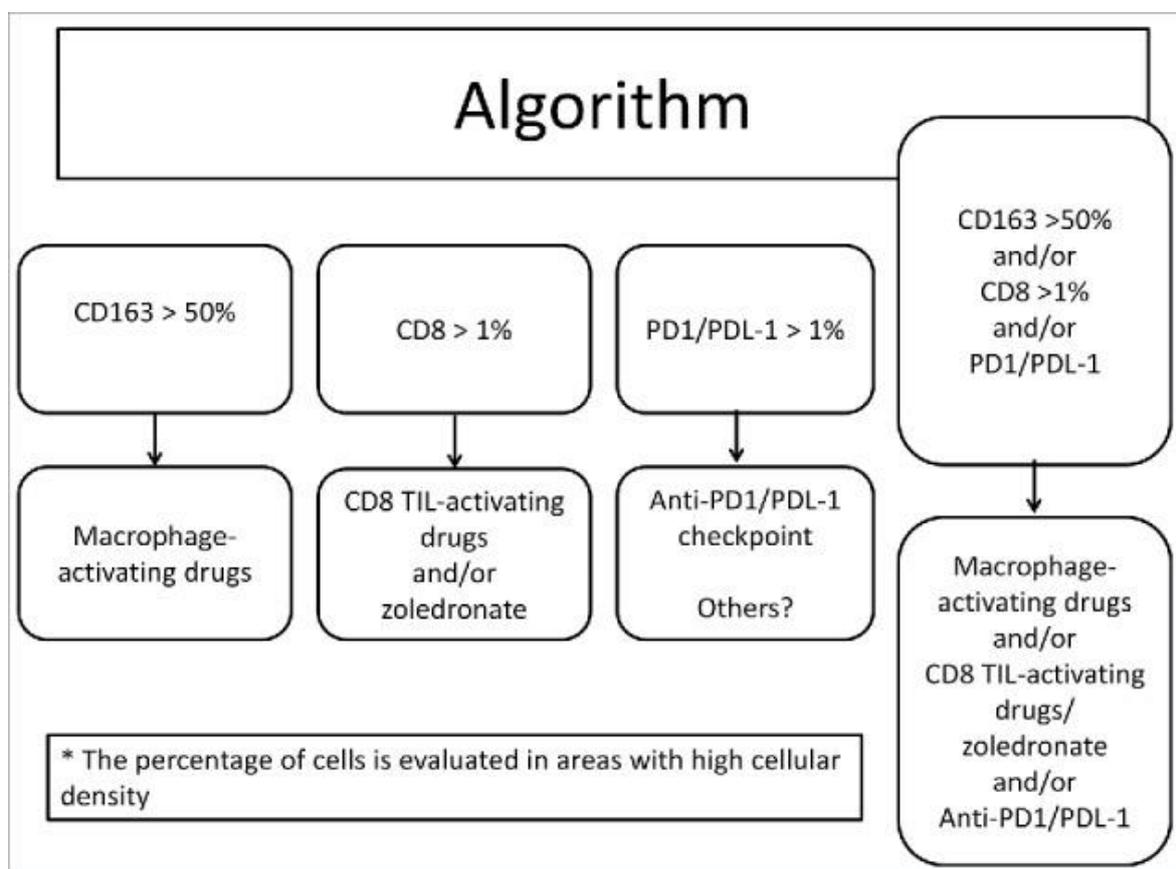


Figure 31: Proposition d'algorithme de traitement pour différencier les patients en fonction de leur stratification immunologique déterminée lors du diagnostic, et proposition de traitements correspondants (Gomez-Brouchet et al., 2017).

Le Mifamurtide (MEPACT) (muramyl tripeptide phosphatidyl ethanolamine, MTP-PE) est un dérivé synthétique du muramyl dipeptide (MDP), encapsulé dans des liposomes. Cet

immuno-stimulateur naturel des parois cellulaires de *Mycobacterium sp.* a une action immuno-stimulatrice similaire à celle du MDP naturel avec une demi-vie plasmatique plus longue.

Cet agent activateur macrophagique est actuellement utilisé pour stimuler ces cellules dans l'ostéosarcome, avec des résultats prometteurs (Brard et al., 2019; Chou et al., 2009; Meyers, 2009). Son rôle d'activateur des monocytes et des macrophages, favoriserait ainsi l'activité antitumorale par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6, IL-8, IL-1...). L'étude de l'équipe de Meyers en 2009 observait que la survie sans récurrence et la survie globale étaient améliorées pour les patients qui recevaient le Mifamurtide en plus de leur protocole de chimiothérapie conventionnelle (Chou et al., 2009). Ces résultats cependant ne permettaient pas de trancher définitivement pour son utilisation en pratique courante en situation de haut risque de récurrence, du fait d'interactions possible avec l'Ifosfamide, de biais d'attrition, et d'analyse intermédiaires trop nombreuses. Il n'y a pas eu de validation de la FDA (Food and Drug Administration) ni de l'HAS (Haute Autorité de Santé) pour cette molécule dans ce contexte. L'étude Sarcome13/OS2016 qui propose le traitement par Mifamurtide actuellement en cours au niveau national, pourra peut-être valider rigoureusement l'effet de cette molécule dans les situations d'ostéosarcome à haut risque de récurrence (Figure 32) (Brard et al., 2019).

High-Risk osteosarcomas

- Metastasis at diagnosis
- Or Localised disease and poor histological response

Sarcoma 13

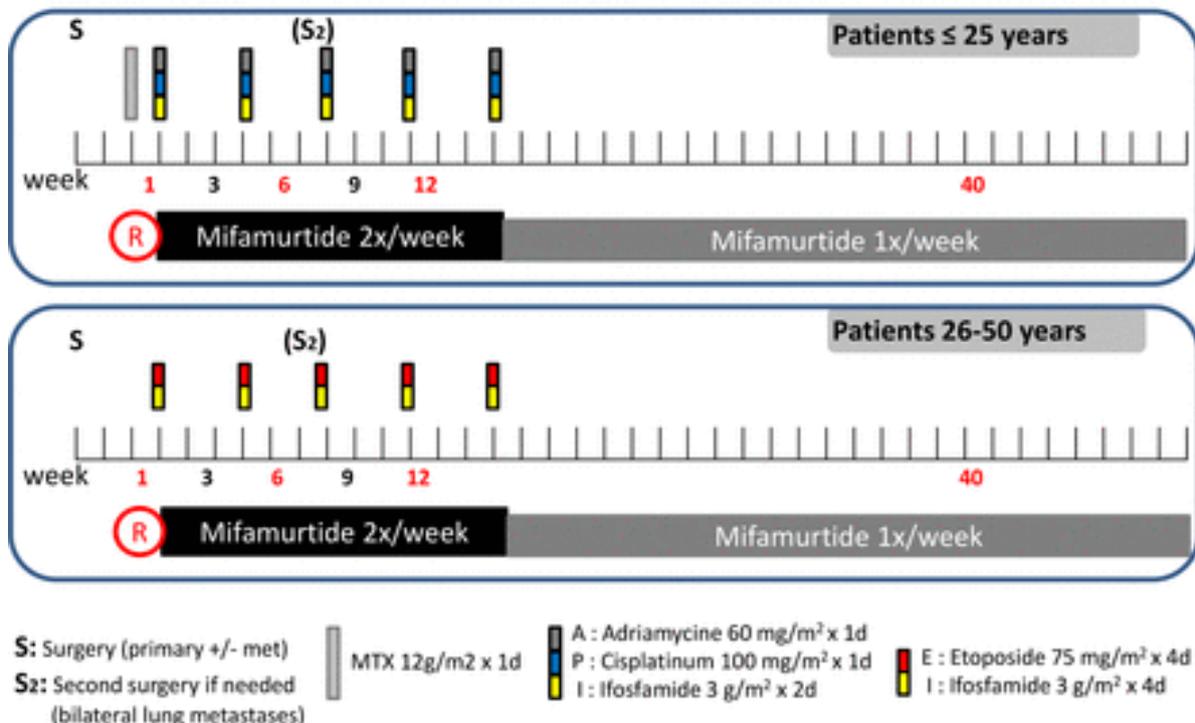


Figure 32 : Protocole de traitement dans l'essai Sarcoma13/OS2016, en fonction de l'âge chez des patients avec Ostéosarcomes à haut-risque (métastatiques ou mauvais répondeurs à la chimiothérapie). Association du Mifamurtide au traitement conventionnel (Brard et al., 2019)

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Description et facteurs pronostics

Les interactions entre la tumeur et le stroma osseux non tumoral, et notamment les CSM sont nécessaires pour le développement tumoral et la progression métastatique (Le Nail et al., 2018; Pietrovito et al., 2018). Les CSM ont dans cette configuration un rôle central, de chef d'orchestre, car elles captent et modulent les variations de l'environnement osseux (MEC, facteurs de croissance, cytokines, chimiokines, métalloprotéases...)(Corre et al., 2020). Par leur capacité autocrine et paracrine, les CSM sont une source de sécrétion de facteurs de croissance qui peuvent stimuler la différenciation et la prolifération cellulaire des ostéoblastes, des CSM elles-mêmes ou des cellules endothéliales (Humbert et al., 2019). La sécrétion de VEGF par

exemple est à l'origine de mécanismes d'angiogenèse, de prolifération et de dissémination métastatique (Zheng et al., 2018).

Le sécrétome des CSM contient également des vésicules extracellulaires (VE) bioactives (Chu et al., 2019; Humbert et al., 2019), qui vont être utilisées par les cellules tumorales comme messagers à leur profit, en transportant des protéines, métabolites, micro-ARN tumoraux (Vallabhaneni et al., 2015). Enfin les lactates produits par les CSM stimulent également les capacités de migration des cellules tumorales dans l'ostéosarcome (Bonuccelli et al., 2014).

Pistes de traitement

Des molécules capables de bloquer l'activité paracrine des CSM pro-oncogènes (aussi appelées CSM-éduquées par la tumeur) ont été développées, et pourraient avoir un effet de blocage de la progression tumorale (Baglio et al., 2017). Des traitements centrés sur les VE issues de CSM sont aussi évoqués comme un nouveau mode d'action sur ces cellules liées à la tumeur (Park et al., 2019).

Les cellules du microenvironnement vasculaire

Prémises à l'échelle macroscopique

Au niveau macroscopique, des travaux dans les années 70 et 80 ont évalué la vascularisation tumorale par des analyses angiographiques. Ces travaux bien qu'anciens, offrent des images qui illustrent parfaitement le lien étroit entre le réseau vasculaire et l'ostéosarcome (Figure 33) (Albisinni et al., 1988; Chuang et al., 1982; Yaghmai, 1977).

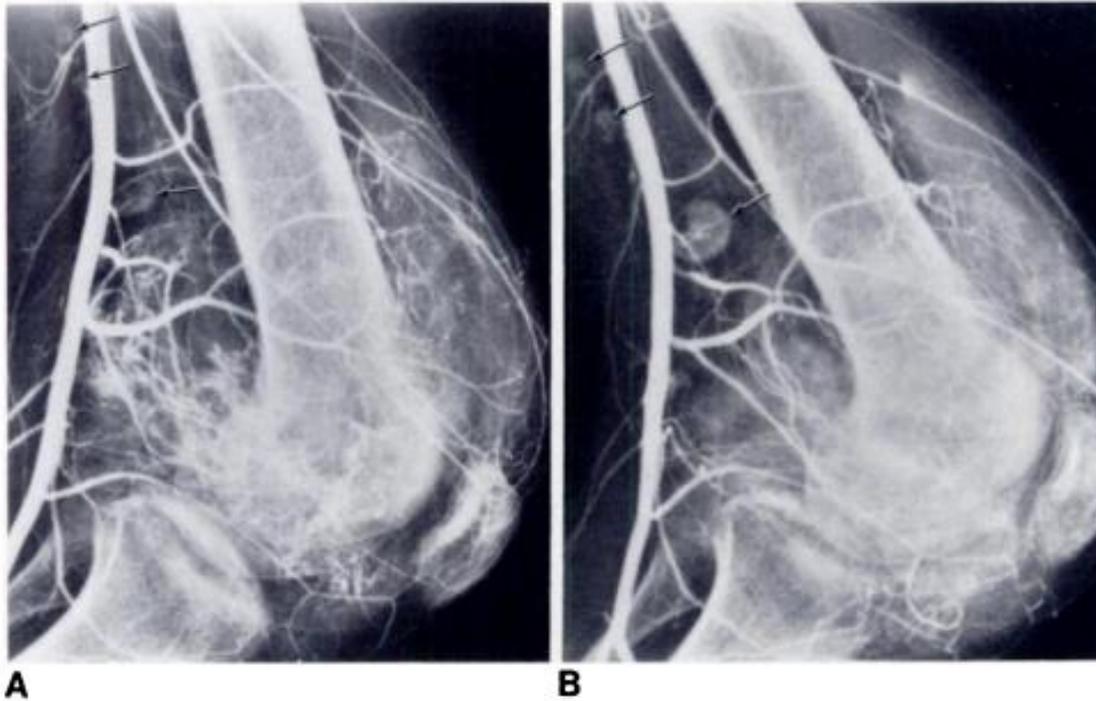


Figure 33 : Analyse de l'évolution locale d'un ostéosarcome de fémur distal en angiographie. A : Angiographie de l'artère fémorale superficielle avant mise en place de la chimiothérapie. On note une volumineuse lésion avec extension dans les parties molles et une forte vascularisation. Localisations nodulaires associées. **B :** Après deux cycles de chimiothérapie, diminution globale de volume de la lésion mais progression des lésions nodulaires des parties molles. Flèches : nodules loco-régionaux associés (Chuang et al., 1982).

Les conclusions de ces travaux sont intéressantes, car déjà en 1977, on percevait que d'une part les zones tumorales les plus dédifférenciées étaient les plus hyper-vascularisées, mais également, qu'à un stade avancé de l'évolution tumorale, la vascularisation de celle-ci se faisait en grande majorité via les vaisseaux des parties molles plutôt que par la vascularisation intra-osseuse (Yaghmai, 1977).

Description et facteurs pronostics

Le réseau vasculaire et l'angiogenèse permettent la croissance, la réparation des tissus mais peuvent toutefois être altérés dans les situations pathologiques. La vascularisation joue en effet un rôle prépondérant dans les phénomènes de tumorigenèse, de dissémination métastatique, ou de réponse à la chimiothérapie. Cette vascularisation est un élément central, car elle interagit de

façon plus ou moins directe avec l'ensemble des sous-composants du microenvironnement global (Jin and Jin, 2020).

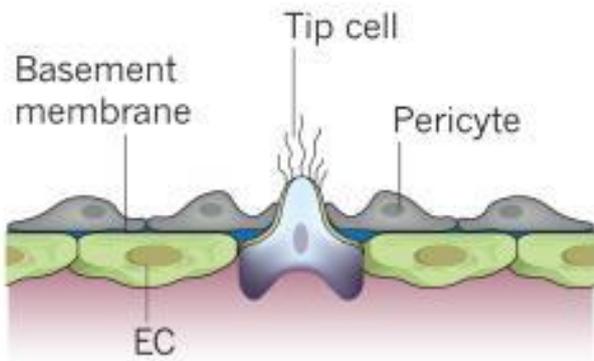
La vascularisation est un des éléments essentiels au développement du cancer. L'apport de nutriments et d'oxygène permet la croissance et la dissémination tumorale. Les vaisseaux supportent également l'intravasation et l'extravasation de cellules cancéreuses. Hanahan et Weinberg rappellent par ailleurs que l'élaboration d'un environnement vasculaire dédié à la tumeur est une des marques de fabrique du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011).

J. Folkman en 1971 (Folkman, 1971) fut le premier à poser l'hypothèse que la croissance tumorale nécessitait un approvisionnement en oxygène et en nutriments par un réseau vasculaire néo-formé par le processus d'angiogenèse et que l'inhibition de ce processus pouvait être envisagé comme une arme thérapeutique .

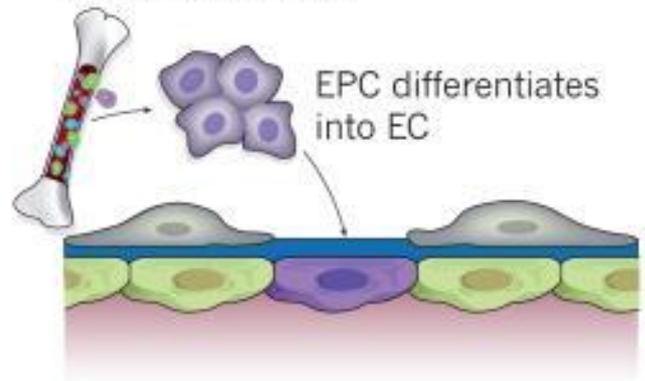
Initialement, les tumeurs débutent leur croissance de façon avasculaire, puis finissent par atteindre un état de dormance où persiste un équilibre entre prolifération et apoptose. C'est ensuite que survient le « switch angiogénique » qui permet la croissance tumorale par un apport de nutriments et d'oxygène (Bergers and Benjamin, 2003). Un déséquilibre des facteurs pro et anti-angiogéniques engendre cette cascade continue, qui est accentuée par la libération de facteurs inflammatoires et une hypoxie élevée, qui compromet l'hydroxylation inhibitrice des HIF (Butler et al., 2010).

Les stress hypoxique et acide sont donc des initiateurs de la néo-angiogenèse, aboutissant à un déséquilibre stimulant la néo-angiogenèse. Il existe dans ce contexte plusieurs modes de formation de vaisseaux sanguins (Figure 34).

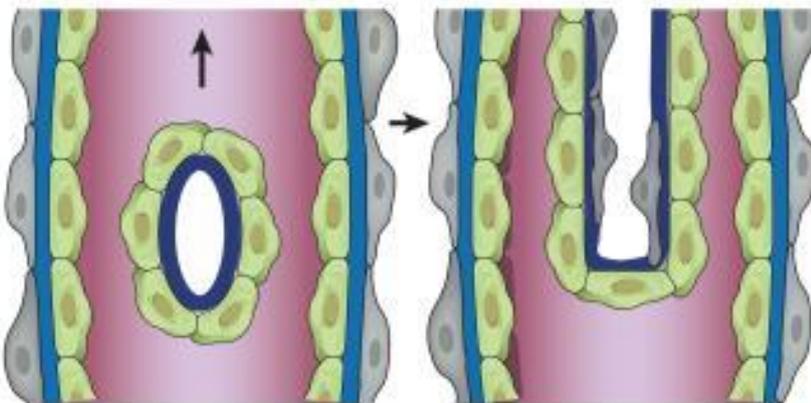
a Sprouting angiogenesis



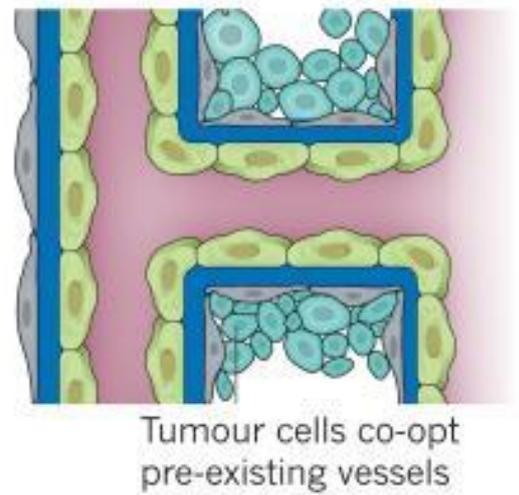
b Vasculogenesis



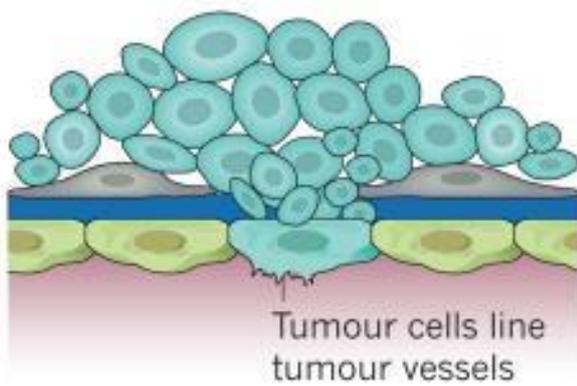
c Intussusception



d Vessel co-option



e Vascular mimicry



f Tumour cell → EC differentiation

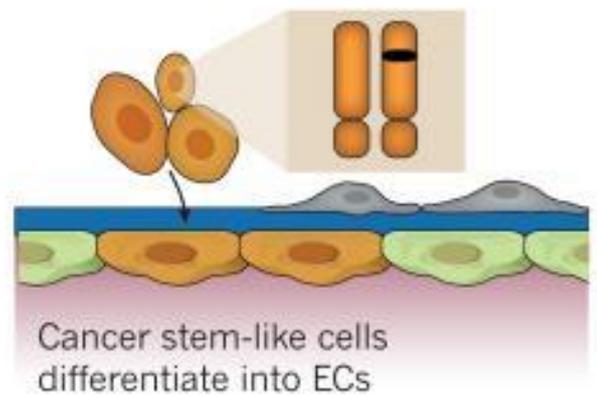


Figure 34 : Différents modes de formation de vaisseaux sanguins en condition physiologique (a-c) et tumorale(a-f) (Takano, 2012).

La néo-angiogenèse peut suivre des modes de formation physiologiques : tout d'abord par angiogenèse germinative avec une « tip cell » en tête de pont stimulée par un gradient de VEGF autocrine, mais aussi par recrutement de cellules progénitrices endothéliales qui se différencient en cellules endothéliales, ou enfin par un mécanisme de division des vaisseaux appelé intussusception. Les cellules tumorales ajoutent à ces moyens classiques d'autres mécanismes de formation des vaisseaux : comme la cooptation de vaisseaux préexistants (avec un tapissage de cellules tumorales à la paroi des vaisseaux), le mimétisme vasculaire (les cellules tumorales jouent le rôle de cellules endothéliales) et enfin la différenciation des cellules souches tumorales en cellules « endothéliales-like » (Figure 26) (Takano, 2012). Le réseau vasculaire tumoral est bien le fruit d'une exploitation détournée des mécanismes fondamentaux de l'angiogenèse physiologique, avec cependant des mécanismes propres (Carmeliet and Jain, 2011).

La pression angiogénique forte et l'absence de gradient de VEGF vont engendrer une vascularisation moins structurée qu'en condition physiologique, avec un réseau serpigneux et désorganisé. Ces vaisseaux présentent de nombreux shunts, des parois comblées par le mimétisme vasculaire, et une membrane basale anormale sécrétant elle aussi des facteurs pro-angiogéniques (Baluk et al., 2005; Clement-Colmou, 2018). La couverture péricytaire est également défailante, par défaut de recrutement et de fixation à l'endothélium, elle ne joue pas non plus son rôle de régulateur de l'angiogenèse (Raza et al., 2010).

Ces vaisseaux non fonctionnels vont conduire à des zones d'hypoxie forte, et on comprend ainsi le cercle vicieux de l'angiogenèse tumorale qui s'applique à l'ostéosarcome, qui est une tumeur hyper-vascularisée dans un environnement acide et hypoxique. Comme nous l'avons vu précédemment, les modes de formation des vaisseaux sanguins dans le contexte tumoral sont multiples. L'implication de cellules endothéliales progénitrices est avancée dans plusieurs études pour l'ostéosarcome (An et al., 2018; Marçola and Rodrigues, 2015). Quant au phénomène de mimétisme vasculaire, il est retrouvé dans 22,7% des ostéosarcomes ostéoblastiques de haut

grade, et semble être un facteur de mauvais pronostic (Bao et al., 2018; Ren et al., 2014). L'origine précise de ce phénomène demeure encore en grande partie inexpliquée. Une sécrétion autocrine de VEGF dans une population de cellules d'ostéosarcome humain possédant des récepteurs au VEGF (VEGFR1) est également un facteur de progression tumorale décrit et pourrait expliquer ces phénomènes de mimétisme vasculaire (Ohba et al., 2014). Enfin l'expression de niveaux élevés de VEGF pourrait être corrélé à l'apparition de métastases comme cela est rapporté dans plusieurs études cliniques (Chen et al., 2013; Kaya et al., 2000; Lammler et al., 2012).

Vaisseau H : un acteur du microenvironnement tumoral ?

Les vaisseaux H pourraient aussi jouer un rôle dans le processus tumoral, primitif ou métastatique restant à déterminer (Peng et al., 2020). Le caractère sinusoïde et la lenteur du flux sanguin dans l'os pourraient être des facilitateurs d'interactions entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales osseuses (Virk and Lieberman, 2007), mais ces caractéristiques correspondent d'avantage aux vaisseaux de type L qu'aux vaisseaux de type H. Toutefois, les vaisseaux de type H fournissent du sang riche en oxygène, en nutriments, en cytokines et en facteurs de croissance qui sont des éléments nécessaires à la prolifération tumorale (Peng et al., 2020). Le couplage des rôles d'angiogenèse et d'ostéogénèse décrit comme la caractéristique principale des vaisseaux H pourrait en revanche trouver une place de choix dans l'environnement tumoral de l'ostéosarcome où ces deux fonctions sont intimement liées. On pourrait aller jusqu'à l'hypothèse d'une stimulation accrue de l'angiogénèse via les cellules endothéliales de type H par des cellules d'ostéosarcome.

Des recherches complémentaires sur ces marqueurs d'intérêt (CD31, Endomucine, α -SMA) semblent donc essentielles pour évaluer le rôle de ces vaisseaux dans le processus tumoral, et particulièrement dans l'ostéosarcome. Ils pourraient permettre de comprendre les mécanismes de prolifération, de dissémination tumorale, mais également de résistance aux traitements. Enfin des

cibles thérapeutiques potentielles sont envisageables dans ce nouveau paradigme vasculaire osseux.

Pistes de traitement

Dans ce contexte il semble opportun et logique d'agir sur la néo-angiogenèse, et les mécanismes qu'elle sous-tend. Plusieurs études cliniques de phase I et II ont été menées en ce sens, le plus souvent dans le cadre d'ostéosarcomes en poursuite évolutive, en deuxième ou troisième ligne de traitement (Xie et al., 2017). L'objectif actuel au regard des échecs des thérapies anti-angiogéniques n'est pas seulement de détruire le système vasculaire de la tumeur, la privant ainsi d'oxygène et de nutriments ; mais plutôt de «normaliser» de façon transitoire la structure et la fonction de sa vascularisation tumorale pour la rendre plus efficace afin de délivrer oxygène et drogues (Figure 35). La diminution de l'hypoxie tissulaire et la synergie de ces traitements anti-angiogéniques avec les thérapies conventionnelles est visée (Jain, 2005).

Properties	Vessel type	
	Tumor (untreated)	Tumor (normalized)
Global organization	Abnormal	Normalized
Pericyte	Absent or detached	Closer to normal
Basement membrane	Absent or too thick	Closer to normal, some ghost
Vessel diameter	Dilated	Closer to normal
Vascular density	Abnormal, heterogeneous distribution	Closer to normal
Permeability to large molecules	High	Intermediate
MVP and IFP	MVP ~ IFP	MVP > IFP
Plasma (P) and interstitial (I) oncotic pressure*	P ~ I	P > I
pO ₂	Hypoxia	Reduced hypoxia

Figure 35 : Critères de normalisation vasculaire induite par les anti angiogéniques (Jain, 2005).

Le récepteur du VEGF est le plus souvent ciblé par ces molécules anti-angiogéniques dans l'ostéosarcome. Mais l'utilisation en pratique de l'anticorps anti-VEGF Bevacizumab a par exemple montré des résultats mitigés (Navid et al., 2017). De façon globale, les nombreux traitements anti-angiogéniques développés ont eu un effet décevant dans l'ostéosarcome. Des propositions de traitement existent en lien avec l'angiogénèse tumorale. L'association de ces

thérapeutiques anti-angiogéniques avec la chimiothérapie conventionnelle a été proposée et est l'une des voies pour améliorer la survie dans les ostéosarcomes. Des études cliniques ont été menées sur l'ostéosarcome de haut grade en situation à haut risque de récurrence avec des résultats mitigés (Ebb et al., 2012; Schuetze et al., 2012).

Ces résultats décevants des anti-angiogéniques peuvent être expliqués par deux grands mécanismes de résistance: le premier dit de « résistance évasive », est le fruit d'un phénomène adaptatif avec un contournement secondaire du blocage angiogénique spécifique, on observe alors chez ces patients un effet transitoire du traitement qui s'épuise secondairement ; le second mécanisme de résistance est nommé « indifférence intrinsèque », ce qui signifie l'inefficacité d'emblée de la molécule sur la néo-angiogenèse (Bergers and Hanahan, 2008). La difficulté de ces traitements se focalisant sur la vascularisation réside dans l'impact de ces molécules sur la diffusion de la chimiothérapie. En effet en ciblant les vaisseaux, et donc en réduisant la vascularisation tumorale nourricière, la délivrance des molécules de chimiothérapie peut être altérée (Xie et al., 2017).

Les TKI ont également un rôle connexe dans l'axe du microenvironnement vasculaire. Ces petites molécules, faisant partie de la catégorie des thérapies ciblées, diffusent à travers la membrane cellulaire et agissent sur le processus de transduction de signal au niveau de récepteurs des facteurs de croissance ou de protéines cytoplasmiques dotées d'une activité tyrosine kinase (TK). Initialement ces TKI visaient spécifiquement une kinase oncogénique et donc directement la cellule tumorale.

Les dernières générations de ces inhibiteurs ciblent plusieurs TK, ce sont désormais des Multi Kinase Inhibitor (MKI), ayant un effet conjoint sur les cellules tumorales et vasculaires

(endothéliales ; pericytes). Les MKI ont en effet un champ d'action plus large, et sont de plus en plus fréquemment utilisés dans les sarcomes (Hosaka et al., 2012; Wilding et al., 2019), comme par exemple le Glivec (imatinib) dans les gastrointestinales stromales (GISTs) (Figure 36) (Nilsson et al., 2009; Schnadig and Blanke, 2006).

MKI	Targets		Clinical Trials
	Molecular	Cellular	
Sorafenib	RAF, KIT, FLT3, RET VEGFR1-3 PDGFR β	Tumor Endothelial Stromal	NCT 00889057 NCT 01804374
Regorafenib	KIT, RET, RAF VEGFR1-3, Tie-2 PDGFR β FGFR	Tumor Endothelial Stromal	NCT 0238244 NCT 02048371
Pazopanib	KIT, FMS VEGFR1-3 PDGFR $\alpha\beta$ FGFR	Tumor Endothelial Stromal	
Cabozantinib	MET, KIT, RET VEGFR-2, Tie-2	Tumor Osteoblasts Endothelial	NCT02243605
Lenvatinib	KIT, RET VEGFR-1, 2, 3 PDGFR- α FGFR1-4	Tumor Endothelial Stromal	NCT04154189

Figure 36 : Inhibiteurs multi-kinases (multikinase inhibitors (MKI)) dans l'ostéosarcome : cibles moléculaires et cellulaires et essais cliniques en cours (Corre et al., 2020).

Les MKI sont en plein essor et ont une activité cliniquement importante quand la TK ciblée est activée par une mutation ou bien se comporte en « gène-maître » dans un mécanisme tumoral. Elles peuvent aussi être considérées comme ayant une action sur l'environnement vasculaire. Ces molécules vont probablement occuper une place importante dans le dispositif thérapeutique

contre le cancer, et en particulier contre l'ostéosarcome, et leur part d'activité anti-angiogénique doit être soulignée (Boutayeb et al., 2012).

Perspectives dans la compréhension et le ciblage du microenvironnement de l'ostéosarcome

La compréhension de l'ensemble de ces mécanismes identifie autant de cibles thérapeutiques potentielles en lien avec les différentes composantes du microenvironnement (Jin and Jin, 2020), dont tous les mécanismes ne sont pas encore clairement élucidés.

Nous avons pu évoquer plus haut les études et essais cliniques en cours sur les thérapeutiques innovantes. Le microenvironnement pourrait en effet porter de nombreuses informations sur le plan pronostic d'une part, mais également thérapeutique. En plus d'un traitement directement actif sur le processus de réplication tumorale comme la chimiothérapie, il apparaît nécessaire de prendre en compte et de cibler la mécanistique de son environnement, dans une approche globale.

Le Mifamurtide, molécule d'immunothérapie prometteuse, induisant l'activation macrophagique illustre bien les possibilités thérapeutiques ciblant l'axe immunitaire, et les résultats de l'étude de phase 2 randomisée SARCOME13/OS2016 devraient permettre de mieux positionner son usage dans l'arsenal thérapeutique conventionnel, en fonction du pronostic tumoral et d'éventuels marqueurs immunohistochimiques définis (Brard et al., 2019).

Enfin, les MKI sont peut-être les plus à même de répondre à la problématique de ciblage multiple : s'attaquant à la tumeur d'une part en inhibant de multiples voies de facteurs de croissance avec une activité oncogénique potentielle (c-MET, c-KIT), mais également avec une action anti-angiogénique complémentaire sur le microenvironnement tumoral (Corre et al., 2020). Elles répondent à la double injonction d'agir sur la tumeur et son environnement. De nombreuses

MKI sont évaluées actuellement dans l'ostéosarcome, comme le Pazopanib, le Regorafenib, ou le Cabozantinib avec des résultats intéressants sur les critères de non progression tumorale ou de réponse objective (Italiano et al., 2020; Le et al., 2019; Longhi et al., 2019).

Objectifs de la thèse

L'objectif de ce travail était donc d'évaluer l'impact du microenvironnement tumoral sur la réponse thérapeutique de l'ostéosarcome. Une analyse sur modèle murin a été proposée afin de modéliser des environnements, et donc des microenvironnements variables, et ceci afin d'évaluer les modifications de chimio-sensibilité dans ces différentes conditions.

- Dans un premier temps l'objectif fût de valider sur modèles murins l'hypothèse d'un rôle du microenvironnement sur la réponse thérapeutique de l'ostéosarcome à la chimiothérapie, puis d'utiliser ces modèles comme outils d'analyse.
- Cet outil permettra en effet d'évaluer des ostéosarcomes de chimio-sensibilité variables mimant les bons et mauvais répondeurs humains. L'étude de ces modèles permettrait d'individualiser de possibles facteurs environnementaux (mécanisme de remodelage osseux, micro-vascularisation...) spécifiques influant sur le différentiel de réponse à la chimiothérapie.
- L'identification de facteurs critiques d'intérêt pourrait in fine permettre d'établir de nouveaux outils pronostics en immunohistochimie, et de potentielles cibles thérapeutiques issues du microenvironnement tumoral.

Article original : influence du microenvironnement dans la réponse histologique de l'ostéosarcome à la chimiothérapie : approche préclinique et analyse rétrospective

BONE MICROENVIRONMENT HAS AN INFLUENCE ON THE HISTOLOGICAL RESPONSE OF OSTEOSARCOMA TO CHEMOTHERAPY: RETROSPECTIVE ANALYSIS AND PRECLINICAL MODELING

Présentation de l'article

Introduction :

L'hypothèse initiale de ce travail prend sa source dans une impression clinique vécue de façon fréquente en RCP sarcome. L'ostéosarcome est une pathologie particulièrement complexe, et pour laquelle les traitements ont peu évolué. Nous sommes parfois surpris par des évolutions cliniques surprenantes et défavorables chez des patients jugés bon répondeurs à la chimiothérapie selon Huvos et Rosen (Glasser et al., 1992; Kim et al., 2008; Rosen et al., 1979). Effectivement, malgré de bonnes marges chirurgicales, et une nécrose induite importante, certains patients vont rechuter localement, ou à distance.

Notre hypothèse est que la grille de lecture actuelle du point de vue pronostic est incomplète, et ne permet pas d'identifier ces patients, nous prenant donc parfois en défaut. L'étude de Brouchet *et al.* identifiant le rôle pronostic des marquages CD163 et CD8, sans corrélation avec la réponse histologique illustre ce propos (Gomez-Brouchet et al., 2017). L'étude du microenvironnement tumoral est un domaine d'intérêt majeur et récent, qui devrait permettre de répondre à ces questions.

Certains auteurs se sont posés la question de l'impact de l'envahissement tumoral aux parties molles adjacentes, et plus particulièrement à la persistance de colonies de cellules tumorales dans cet environnement spécifique extra-osseux associant périoste, tissu musculaire, tissus graisseux...

Cette niche tumorale juxta-osseuse, de par un microenvironnement différent pourrait-elle être à l'origine de mécanismes de résistance ?

Principes et objectifs :

Par une approche combinée - préclinique et rétrospective - nous avons cherché à identifier si un envahissement tumoral en milieu musculaire juxta-osseux répondait différemment à la chimiothérapie qu'un modèle tumoral intra-osseux pur en modèle murin. Une approche rétrospective pilote sur pièce d'anatomo-pathologie a aussi été menée.

Notre modèle préclinique a donc cherché à modéliser différents environnements tumoraux dans un modèle murin d'Ostéosarcome MOS-J afin d'évaluer les différences de réponse à la chimiothérapie. Nous avons en ce sens estimé la cinétique de volume tumoral sous traitement, ainsi que la nécrose induite.

Un versant rétrospectif pilote a également été mené, avec une relecture systématique de lames issues de pièces d'exérèse d'ostéosarcome humains. Un mapping des cellules tumorales viables a été réalisé dans le cadre d'une étude pilote. Nous avons cherché à mettre en lien la survie des patients atteint d'ostéosarcome à la répartition tissulaire des cellules viables restantes.

Choix méthodologiques :

Modèle préclinique in vitro et in vivo

L'analyse préclinique dans ce projet a nécessité la sélection de trois molécules de chimiothérapie utilisées dans le traitement de l'ostéosarcome de haut grade chez l'homme et compatible avec un modèle murin (Cisplatine, Doxorubicine, et Ifosfamide).

Une analyse in vitro de la sensibilité de la lignée MOS-J à ces molécules a été réalisée par marquage de la prolifération au cristal violet. La tolérance et l'efficacité des traitements sélectionnés ont été testées sur notre modèle murin d'ostéosarcome.

Nous avons choisi pour un modèle murin syngénique d'ostéosarcome MOS-J classiquement utilisé dans le laboratoire PhyOs (Joliat et al., 2002) afin de prendre en compte l'environnement immunitaire (Figure 37). Les nombreuses mises au points méthodologiques dans l'élaboration des modèles d'injection tumoraux de notre étude, mais également dans l'évaluation des thérapeutiques nous ont également encouragé à utiliser des souris immunocompétentes plus économiques de type C57bl/6J (Jacques et al., 2018).

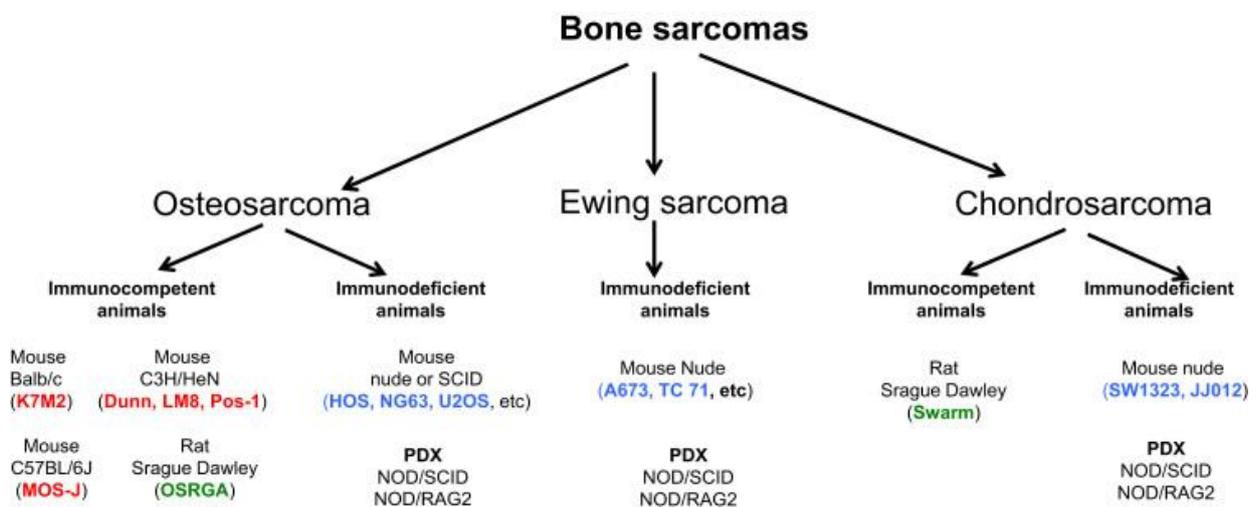


Figure 37 : Modèles de petits animaux disponibles dans la littérature pour l'étude des tumeurs osseuses primitives. Lignées cellulaires: origine humaine (en bleu), souris (en rouge), rat (en vert). PDX: xénogreffe dérivée du patient (Jacques et al., 2018).

L'injection de cellules tumorales MOS-J a initialement été prévue dans trois sites tissulaires représentant trois microenvironnements différents : un site para-tibial musculaire classiquement décrit dans la littérature. un autre intra-osseux pur, plus exigeant méthodologiquement, et enfin un dernier modèle sous-cutané (Jacques et al., 2018; Uluçkan et al., 2015).

L'analyse s'est portée ensuite sur la cinétique de progression du volume tumoral, mais également sur la nécrose induite (Hematoxyline Eosine) par analogie à la méthode utilisée chez l'homme dans le score de Huvos et Rosen. Les index de prolifération, l'évaluation de l'apoptose et l'analyse de la vascularisation ont également été évalués en IHC.

Analyse rétrospective pilote

Il nous semblait important de combiner à cette approche préclinique un versant rétrospectif. Nous avons tenté d'évaluer si la localisation extra-osseuse de colonies focales viables d'ostéosarcome pouvait être mise en lien avec une diminution de la survie.

Une relecture complète de lames issues de pièces d'exérèse de 10 patients a été réalisée avec l'aide du Dr Anne Moreau, et de Clothilde Dumars, du service d'anatomopathologie du CHU de Nantes. Ce faible échantillon a été sélectionné dans un premier temps, afin d'évaluer la faisabilité méthodologique et la rentabilité de cette analyse.

Publication

Am J Cancer Res 2017;7(11):2333-2349
www.ajcr.us /ISSN:2156-6976/ajcr0052086

Original Article

Bone microenvironment has an influence on the histological response of osteosarcoma to chemotherapy: retrospective analysis and preclinical modeling

Vincent Crenn^{1,2,3}, Kevin Biteau^{1,2}, Jérôme Amiaud^{1,2}, Clotilde Dumars⁴, Romain Guiho^{1,2}, Luciano Vidal^{1,2}, Louis-Romée Le Nail^{1,2,5}, Dominique Heymann^{1,2}, Anne Moreau⁴, François Gouin^{1,2,3}, Françoise Redini^{1,2}

¹Inserm UMR 1238, Nantes, France; ²Université de Nantes, Bone Sarcomas and Remodeling of Calcified Tissues, Faculté de Médecine, Nantes, France; Departments of ³Orthopedic, ⁴Pathology, CHU Hôtel DIEU, Nantes, France; ⁵Department of Orthopedic, CHU Trousseau, Tours, France

Received March 3, 2017; Accepted March 15, 2017; Epub November 1, 2017; Published November 15, 2017

Abstract: Osteosarcoma, the most common malignant primary bone tumor, is currently treated with chemotherapy and surgery. The effectiveness of chemotherapy is evaluated by means of histological analysis of tumor necrosis, known as “the Huvos score”. However, 25% of the patients initially considered good responders will relapse. In our practice, strong tissue heterogeneity around the residual viable cells of the osteosarcoma is observed, but this is not taken into account by the Huvos score, as it is only an average. The objective is to determine whether heterogeneity in the osteosarcoma’s microenvironment can play a role in the histological response to chemotherapy. Two complementary approaches have been developed: (i) the therapeutic response to several monotherapies (ifosfamide, cisplatin, doxorubicin) has been compared to tumor growth and the necrosis levels in different preclinical syngeneic osteosarcoma models, mimicking various microenvironments by injecting the tumor cells into subcutaneous, intra-muscular paratibial, or intra-osseous sites; (ii) a retrospective analysis was performed on patients’ osteoblastic osteosarcoma biopsies. Tissue localization mapping of residual live tumor cell colonies was evaluated for potential correlation with overall survival. The results of the preclinical studies showed a difference in tumor growth depending on the osteosarcoma model, with a higher rate in bone sites compared to subcutaneous tumors. For the therapeutic response, a higher response to doxorubicin was observed in the intra-osseous model compared to the intra-muscular model for tumor growth ($P = 0.013$) and necrosis ($P = 0.007$). These data strongly suggest that the microenvironment plays a role in how osteosarcoma responds to chemotherapy. The retrospective analysis showed no significant survival difference between residual cell sites, although the soft tissues may be seen as a potential negative factor.

Keywords: Osteosarcoma, microenvironment, histological analysis, murine model, retrospective analysis

Introduction

Osteosarcoma, derived from mesenchymal bone-forming cells, is the most common malignant primary bone tumor. Annual incidence of osteosarcoma in the general population is 5 cases per million [1]. Although this tumor is mostly characterized as being of the conventional osteoblastic type, other histological subtypes can be observed [2] (fibroblastic, chondroblastic, telangiectasia), with strong intratumoral histologic heterogeneity [3, 4]. The long-term survival prognostic factors describ-

ed in the literature are: location and size of the tumor, presence of metastasis, response to chemotherapy determined by the Huvos and Rosen score, as well as the quality of the tumor resection [5-7]. Osteosarcoma treatment is codified as part of a multidisciplinary care protocol and has not really changed in thirty years: it combines neo-adjuvant chemotherapy with surgical resection and adjuvant chemotherapy. The most commonly used chemotherapy drugs are high-dose methotrexate, cisplatin, ifosfamide, and doxorubicin for example [8]. Modifying the adjuvant chemotherapy protocol

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

is decided in relation to the histological response to neo-adjuvant chemotherapy on the resection piece. This analysis quantifies tumor necrosis and classifies patients into good and bad responders (known as the Huvos and Rosen score) [9]. This score is based on the number of remaining viable tumor cells, with good responders defined as having a rate of less than 10% [10]. This prognostic criterion is essential and guides the postoperative chemotherapy regimen. However, 25% of the patients initially considered good responders will relapse [9, 11]. Currently, the number of viable tumor cells is an average count which is made globally without distinguishing between different areas or different types of tissue. Our practice, along with data from the literature, shows that on a post-chemotherapy resection piece, the resection necrotic areas are heterogeneous with some areas with complete necrosis and some with an absence of necrosis. A unique study by Picci *et al* indicated that the preferential survival zones for osteosarcoma cells on post-chemotherapy resection pieces are observed in soft tissues [12]. The aims of the present work are to complete this initial study at preclinical and clinical levels, first by developing relevant animal models that mimic different microenvironments, and second by means of retrospective clinical assessment on survival.

The concept of microenvironment has recently emerged. It considers tumors as organs with complex interactions with the stroma, and not as merely simple clusters of autonomous tumor cells. This provides us with an opportunity for understanding tumor progression that may apply to osteosarcomas [13]. Bone is composed of many distinct cell types (osteoblasts, osteoclasts, chondrocytes, MSC (mesenchymal stem cells), hematopoietic cells, endothelial cells, immune cells) and is the site of major interactions balanced by bone formation and bone resorption. This complex osseous microenvironment influences the development and progression of osteosarcomas [14]. Our scientific hypothesis is that overall averaged therapeutic response assessment of the tumor piece, as obtained with the Huvos and Rosen score, currently masks the potential significance of post-chemotherapy necrosis heterogeneity. Cell interactions between the microenvironment and the tumor may modulate the

chemotherapy response, as suggested by Juntila or Hanahan [13, 15], with tumor response that differs depending on the type of tissue at the expense of which the tumor grows (soft tissue, cancellous bone, cortical bone). This variability may be explained by differences in environmental characteristics at the immune cell, architectural [16-18], or vascular levels, as well as at the chemical level by variations in pH or oxygenation [19-21]. Knowledge and understanding of necrosis distribution depending on the microenvironment may improve our prognostic criteria and better guide postoperative chemotherapy.

In order to validate our hypothesis, we will develop two complementary approaches: (i) in collaboration with pathologists, we will carry out a retrospective study of osteosarcoma resection pieces obtained after chemotherapy. This will make it possible to assess necrosis heterogeneity (different kinds of tissues) in correlation with disease prognosis; (ii) an *in vivo* experimental approach on syngenic MOS-J murine osteosarcoma models will be developed to compare the chemotherapy response between various tumor implantation sites mimicking different microenvironments (pure bone, muscle tissue with periosteum denudation or subcutaneous tissue) to study the influence of these different microenvironments on the therapeutic response. This modeling approach should provide us with better understanding of both the molecular and/or cellular mechanisms that may influence the response to chemotherapy, and their prognostic significance for better therapy.

Materials and methods

In vitro experiments

Cell line and culture: The murine MOS-J osteosarcoma cell line used for both the *in vitro* and *in vivo* experiments developed from a spontaneous osteosarcoma in the C57BL/6J mouse strain [22]. All experiments were performed under sterile conditions using a vertical laminar flow hood (PSM Securiplus, Astec, France). The cells were grown in 25, 75, 175 cm² or triple 175 cm² flasks (Falcon™, Becton Dickinson Labware, JN, USA) in RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Biowhitakker, Verviers, Belgium) culture medium supplemented with 5% FCS (Fetal Calf Serum, Hyclone Perbio,

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

Vigneux, France). The plates were seeded at a density of 10^4 cells/cm², then incubated in a saturated humidity atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. During subculturing, cells were detached at confluence with a Trypsin-EDTA solution [Biowhittaker, Trypsin: 0.5 g/L; EDTA (Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid): 0.5 g/L]. Trypsin was neutralized by adding 10% FCS into the culture medium, then centrifuged at 1600 rpm for 5 minutes. The cell count was realized on a Malassez cell. When cell amplification was required for the *in vivo* experiments, MOS-J cells were detached at between 70 and 80% confluence, to obtain a potentially optimal comparable division from one operation to another.

Cell proliferation test: A proliferation assay was performed to determine for the MOS-J cell line its *in vitro* susceptibility to the chemotherapy drugs commonly used in the osteosarcoma API therapeutic protocol [10]: doxorubicin, ifosfamide (mafosfamide, the active form of ifosfamide was used for *in vitro* testing, as ifosfamide requires metabolic activation) and cisplatin. The MOS-J cells were seeded in 96-well plates at a density of 3000 cells per well. After 24 hours of culture to allow the cells to adhere, the cells were incubated with different treatments in fresh medium with concentrations ranging from 0.01 μ M to 100 μ M, at 37°C for 48 hours. The cell viability rate compared to control untreated cells was determined by crystal violet staining. After cell attachment, the cells were treated with 1% glutaraldehyde for 5 minutes followed by rinsing, then the cells were stained with 0.1% crystal violet. The dye was solubilized in Sorensen's solution (45% Ethanol, 20 nM HCl, citrate trisodium 35 mM) and the absorbance was measured in a spectrophotometer at 420 nm. The dose-response curves and the doses inducing 50% of the maximum effect (IC₅₀) were determined for each molecule using GraphPad-Prism software (Center for Opportunities, USA). These manipulations were reproduced twice.

In vivo experiments

Murine models: Animal experiments were performed on mice housed in the Experimental Therapeutic Unit (Medical School, Nantes, France; agreement n°D-44045) in accordance with protocols approved by the Regional Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEA

PdL 6) and the Ministry of Agriculture, under the direction of investigators certified for animal experiments. Four-week-old male C57BL/6J mice from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) were used. For each experiment, one week of adaptation to the environment was required before starting the manipulation, with the mice being randomized into different cages. The MOS-J tumor cells were injected into various sites in order to mimic different micro-environments. All tumor cell injections were performed under general anesthesia (isoflurane 1.5% air-1 L/min) after disinfection with betadine, within one hour of detaching the cells. Preliminary experiments were performed to determine the best cell number for obtaining reproducible kinetics and optimal growth.

Injection models: Three models were developed: intra-muscular, intra-osseous and subcutaneous. (i) intra-muscular paratibial injections were carried out percutaneously on mid-diaphyseal tibia after needle periosteum denudation, with 3.10^6 MOS-J cells prepared in a solution of 50 μ L phosphate buffered saline (PBS); (ii) intra-osseous injections were carried out after a sub-centimeter infero-lateral incision to the tibial tuberosity in order to expose the bone: the cortical bone was punctured with a needle by a rotary movement and then 3.10^6 MOS-J cells prepared in 25 μ L of PBS were injected. The skin was closed using a Flexocron® 5.0 suture. These mice were treated with an intraperitoneal bolus of buprenorphine 0.1 mg/kg; (iii) subcutaneous injections of 3.10^6 MOS-J cells prepared in a 50 μ L PBS solution containing matrigel 4.5 g/L were performed after shaving the mouse's flank. In all cases, the syringes were stored on ice before the injection.

Model characterization: The primary objective was to validate the technique and reproducibility of MOS-J tumor cell inoculations in different injection sites (intra-osseous, intra-muscular/paratibial, subcutaneous), and to assess tumor growth kinetics in control C57BL/6 mice in the absence of treatment. Three groups of 5 mice were formed, one for each injection site. The mice were monitored for 28 days from the day of injection, and tumor growth was assessed by precise and regular measurement of tumor volume every 3 to 4 days with a caliper. Tumor volume (V) expressed in mm³ was calculated using the formula $V = (L \times W \times P)/2$, where L, W and P

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

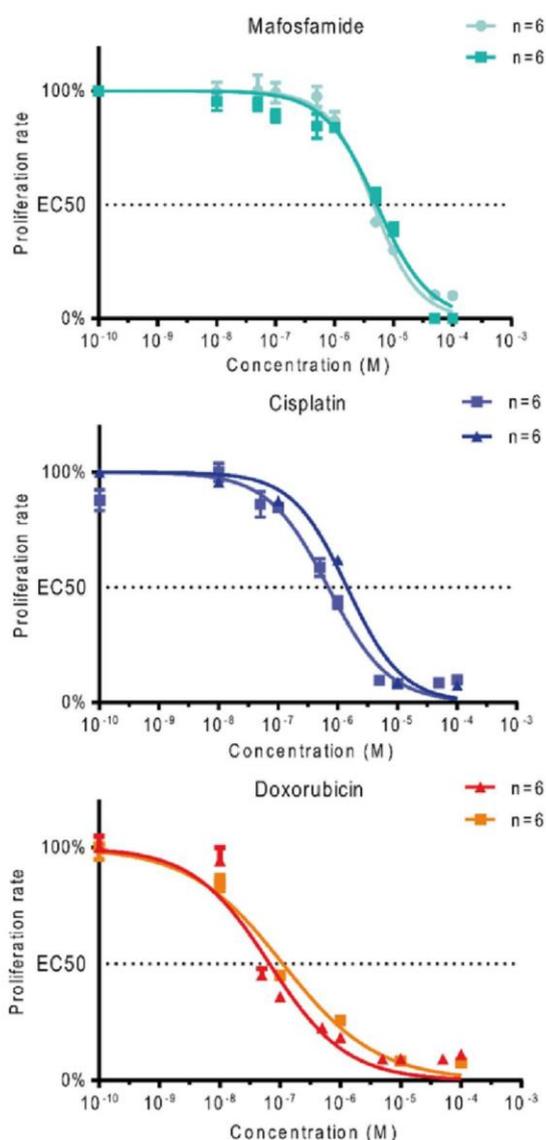


Figure 1. Effect of chemotherapy drugs (mafosfamide, cisplatin, and doxorubicin) on MOS-J osteosarcoma cell proliferation. Cell proliferation is given as a percentage of control.

are the perpendicular diameters of the tumor in the three space planes [23]. Radiographic characterization of bone lesions from the intramuscular, paratibial and intra-osseous bone groups was performed on Day 15 and Day 21 after tumor cell injection under general anesthesia. Bone lesions were also quantified after sacrifice in the same mice, with the microtomograph Skyscan 1076 (Bruker, Belgium) using the following acquisition parameters: pixel size 18 microns, 50 kV, Al filter 0.5 mm and 0.6° rotation phase. The images were reconstructed using the software NRecon Skyscan then treat-

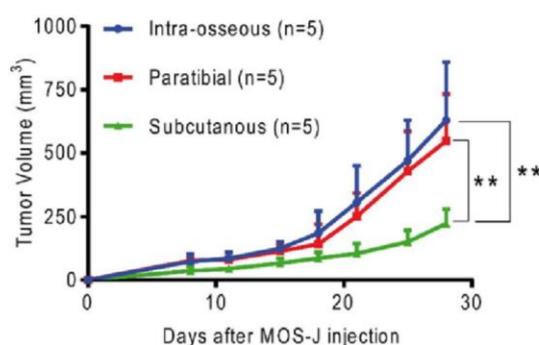


Figure 2. Mean tumor volume comparison between murine MOS-J models induced in intra-osseous, intra-muscular paratibial, and subcutaneous sites. Thresholds of significance: *: [0.05; 0.01 [, **: [0.01; 0.001 [, ***: ≤ 0.001 .

ed in three dimensions using the 32-bit software CTVox Skyscan. Histologic tumor characterization was performed by standard HE (hematoxylin-eosin) staining and by immunohistochemistry (IHC) for CD146 (vascularization), Ki67 (proliferation) and caspase 3 (apoptosis) markers. For this, the legs with tumors or subcutaneous tumors were fixed in 10% buffered formaldehyde solution, decalcified if necessary in 4% ethylene diamine tetraacetic acid solution (EDTA) and 0.2% pH 7.4 paraformaldehyde, embedded in paraffin, cut into 3 μm sections and mounted on slides. CD146, Ki67 (ImmunoRatio [24]), active caspase 3 staining and necrosis degree evaluation were obtained with the ImageJ software [25].

Evaluating tolerance and treatment effectiveness in the MOS-J cell line: The aim of this experiment was to evaluate the safety and efficacy of chemotherapy drugs (doxorubicin, cisplatin, ifosfamide) on the MOS-J model, and to allow us to choose optimal chemotherapy doses. 71 mice were injected in the intramuscular/paratibial site with 3.10^6 MOS-J cells for this experiment. The tumor volume and growth kinetics were assessed biweekly. Tolerance to chemotherapy was evaluated weekly by measuring weight, and by assessing mouse behavior and lethality. Chemotherapy treatment was initiated when the average tumor volume in one group exceeded 100 mm^3 [26, 27]. The molecules were injected alone, at three different doses with an intermediate dose for the most commonly-used dose in the literature [26-31]. The intravenous (retro-orbital) injections were

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

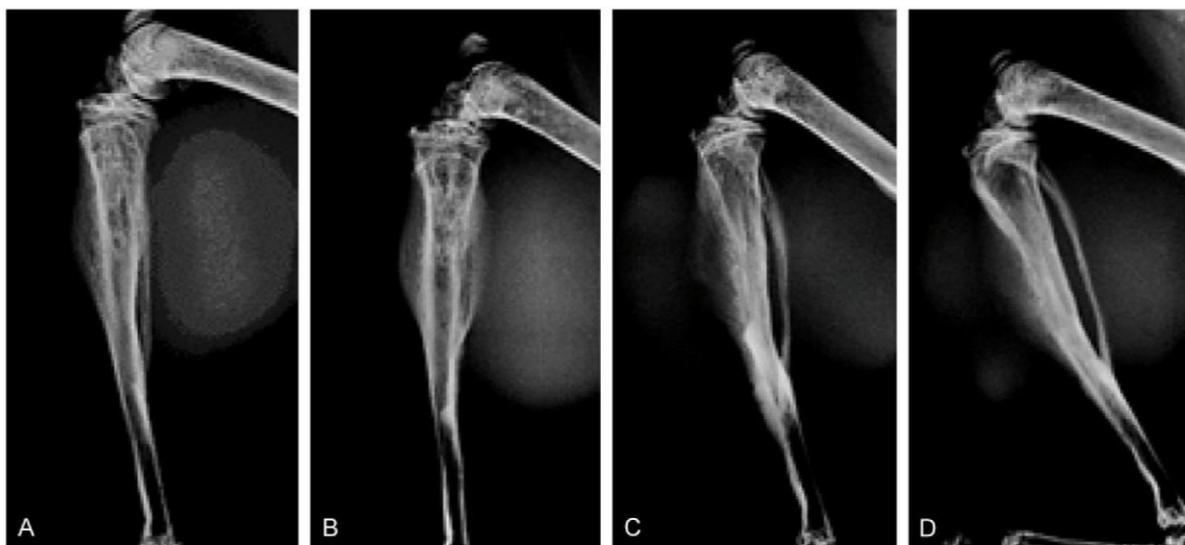


Figure 3. Bone lesions analyzed by X-ray profiles of injected legs. Day 15 (A, C), Day 21 (B, D) after tumor cell injection. Intra-osseous injection site (A, B), intra-muscular paratibial injection site (C, D).

all performed biweekly in 50 or 100 μ l of PBS solution: cisplatin 0.5 mg/kg, 2 mg/kg and 4 mg/kg; ifosfamide 10 mg/kg, 50 mg/kg and 100 mg/kg; doxorubicin 0.5 mg/kg, 2 mg/kg and 4 mg/kg. The control group received injections of 50 μ l PBS.

Evaluating the impact of different injection environments on the effects of monotherapy: The aim of this experiment was to compare the therapeutic efficacy of chemotherapeutic molecules on tumor growth in the MOS-J model induced in different injection sites (paratibial/intramuscular, intra-osseous and subcutaneous), and to assess the histologic response to these different treatments. Three groups of 28 mice were established (one group for each injection zone) and $3 \cdot 10^6$ MOS-J cells were injected per mouse. Each group was then divided into 3 sub-groups, receiving different treatments: cisplatin 2 mg/kg, doxorubicin 4 mg/kg, and ifosfamide 100 mg/kg, plus a control group. The tumors were characterized histologically by analyzing CD146, Ki67 (ImmunoRatio application), and caspase 3 staining, and evaluating the degree of necrosis.

Retrospective clinical analysis

In the second part of the study, the main objective was to determine a potential correlation between the location of residual live tumor cells on post-chemotherapy resection pieces and the overall survival of patients with osteo-

sarcoma (OS2006 cohort of 350 patients) [10]. We initially focused on a pilot phase in ten patients operated on in Nantes, to assess the feasibility and potential trends between overall survival and localization of live tumor cells. The following criteria were required: patients had to have been operated on in Nantes, with histological blades available in the archives of the pathology department. The osteosarcomas had to be of the osteoblast type in an initial biopsy carried out before 2012 for a minimum follow-up period of 3 years (Cohort OS2006). Huvos and Rosen I, II and III scores were included in this study. Huvos and Rosen scores of IV were excluded (complete necrosis). Patients whose biopsies were not available were also excluded. The location of residual live osteosarcoma cells was evaluated in relation to tissue type (cancellous bone, cortical bone, cartilage, soft tissue). General clinical data, together with tumor (pathology, metastases), surgical (margins, type of resection), medical (adjuvant chemotherapy and neo-adjuvant) and survival data were also collected. Mapping of the viable residual tumor cells based on different types of tissue: cancellous bone, cortical bone, cartilage, and soft tissue, was carried out in coordination with the pathology team, all slides being read and blind analyzed by a pair of pathologists. Our histology analysis was similar to that reported in the study by Picci *et al* [12]. Preferential areas of live cells were determined using anatomical frame patterns filled during

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

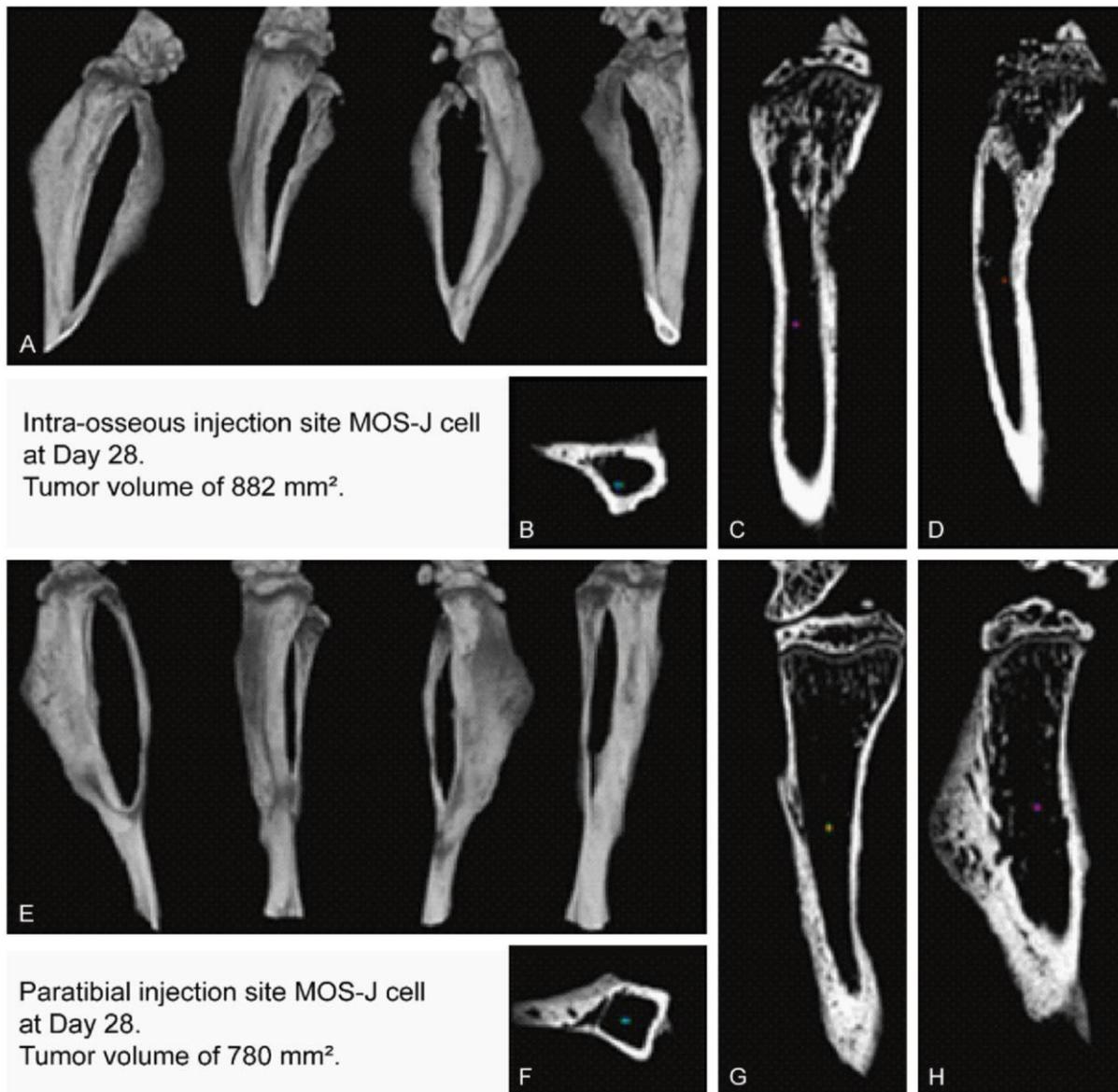


Figure 4. Bone micro-architecture analysis by micro-CT on Day 28 after tumor cell injection of legs with the tumor. Tumors were induced by intra-osseous (A-D) or intra-muscular paratibial (E-H) injection. Tridimensional reconstructions with lateral, anterior, medial and posterior view (A, E). Axial mid-diaphyseal view (B, F), frontal view (C, G), and sagittal view (D, H).

blade proofreading. All sagittal and frontal blades with a rate of live tumor cells $\geq 1\%$ were read. Cell density was divided into 2 levels: high (corresponding to very individualized focal osteosarcoma colonies) and low, corresponding to diffuse distribution. Histological proofreading was carried out blinded to the survival outcomes.

Statistical analysis

Data were collected on Microsoft Excel and analyzed with the GraphPad Prism 7 software.

In vitro experiments were analyzed with the IC50 logarithmic curve. The *in vivo* experiment results were analyzed between more than two distinct populations using the ANOVA One-way (only one condition tested) or Two-way (two conditions tested) test, applying the Sidak test correction for multiple comparisons. Analyses of two populations were carried out using the non-parametric Mann-Whitney test. The standard deviations are shown in the figures. Survival curves were estimated with the Kaplan-Meier test, and the comparison between these curves was performed using the Log-Rank test. The

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

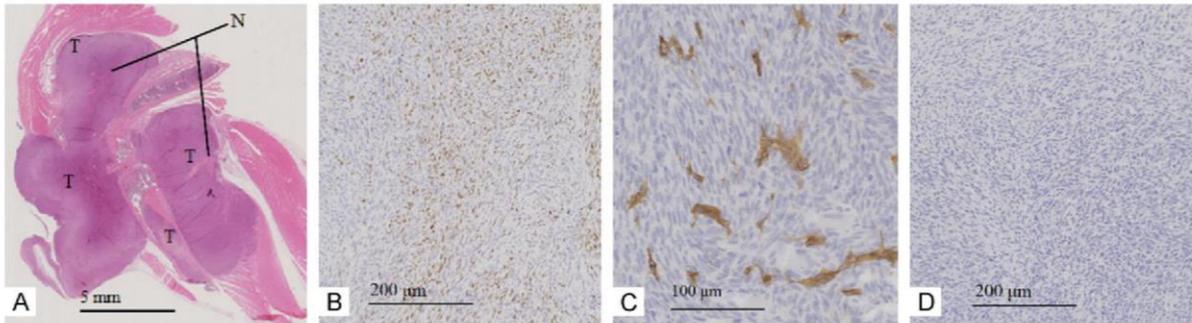


Figure 5. Histological analysis of mice developing MOS-J tumors induced by intra-osseous injection. Longitudinal leg section with HE staining to assess degree of necrosis (A), IHC staining of tumor at $\times 5$ magnification for proliferation with Ki67 (B), $\times 10$ for vascularization with CD146 (C) and $\times 5$ for apoptosis with caspase 3 (D). T: Tumor, N: areas of necrosis.

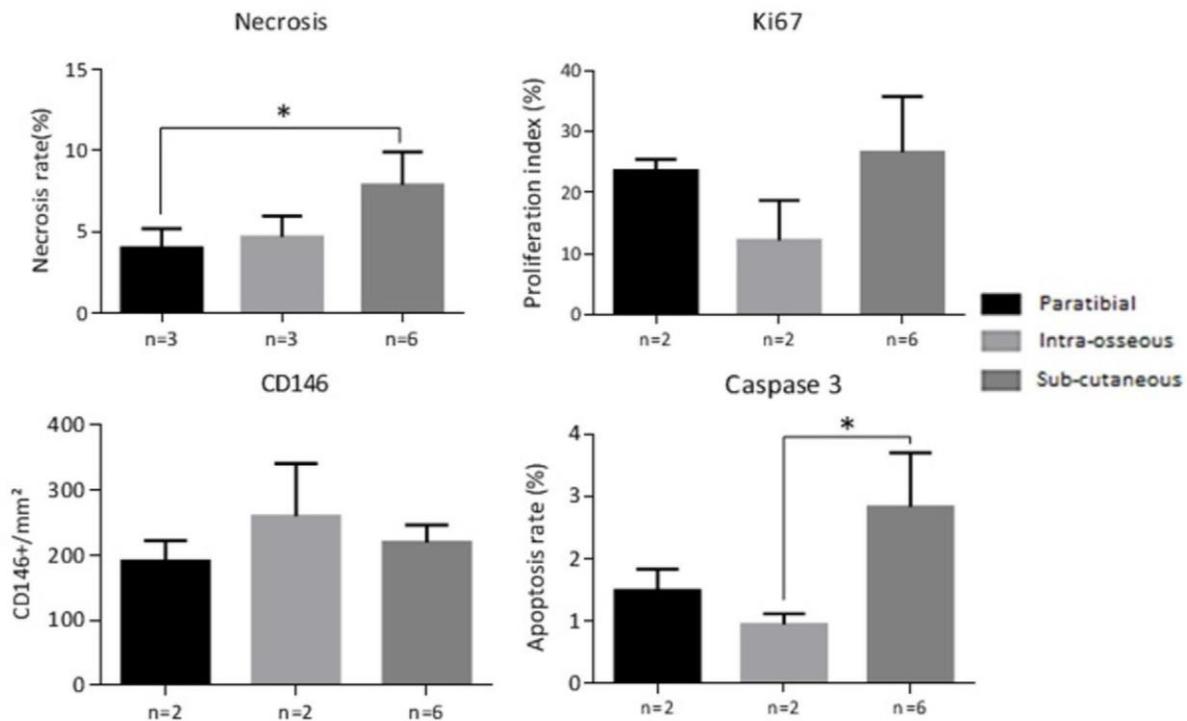


Figure 6. Histological analysis of necrosis (as a percentage of tumor area), cell proliferation with IHC Ki67 labeling (expressed as a proliferation index), vascularization with IHC CD146 labeling, and the rate of apoptosis with IHC caspase 3 labeling. Thresholds of significance: *: [0.05; 0.01], **: [0.01; 0.001], ***: ≤ 0.001 .

alpha risk for all of these tests was set at 5% with a significance of $P < 0.05$.

Results

In vitro experiments

Cell proliferation was determined by crystal violet staining in 96-well plates. Mafosfamide (the metabolized form of ifosfamide), doxorubicin and cisplatin were added at increased concentrations (from 10^{-8} M to 10^{-3} M) to fresh culture

medium. All three treatments induced a cytotoxic effect on the MOS-J osteosarcoma cell line, but with varying patterns (Figure 1). All the compounds tested inhibited tumor cell proliferation *in vitro*, with a mean of median inhibitory concentrations (IC₅₀) of 1.09 μ M (1.43 and 0.69 μ M) for cisplatin (two independent series of experiments), 0.11 μ M (0.14 and 0.07 μ M) for doxorubicin, and 4.90 μ M (4.57 and 5.22 μ M) for mafosfamide (Figure 1). These *in vitro* experiments allowed us to both validate the

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

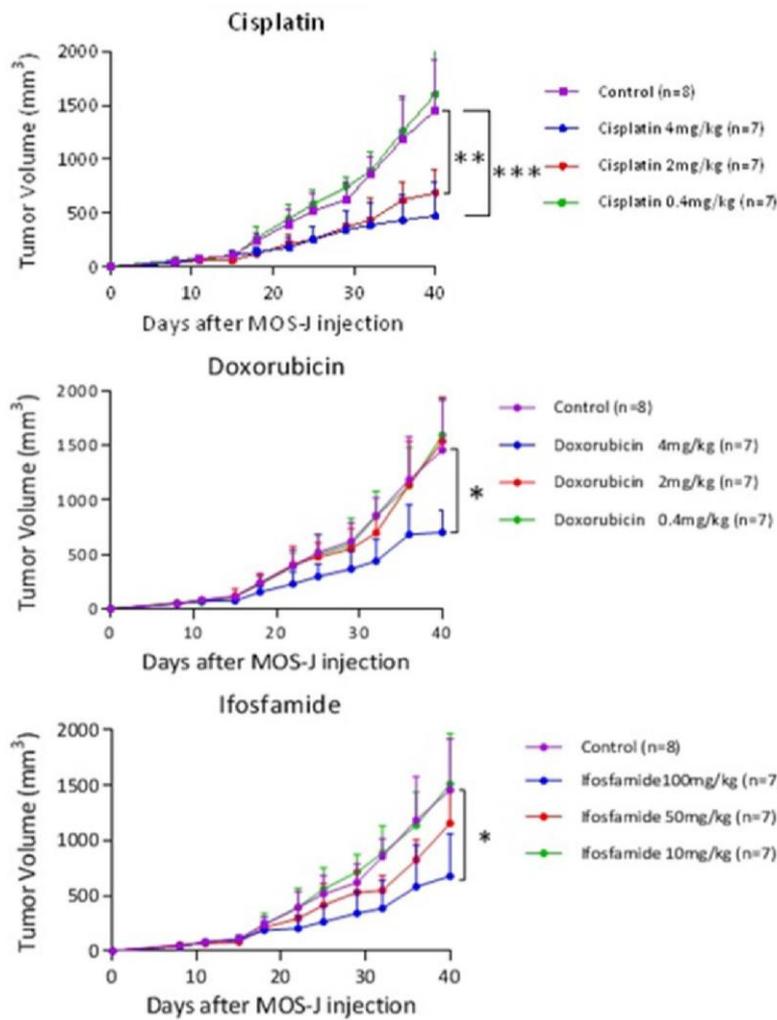


Figure 7. Kinetics of average tumor volumes according to treatment (cisplatin, doxorubicin, ifosfamide) at different doses. The treatment was introduced on D15. Thresholds of significance: *: [0.05; 0.01], **: [0.01; 0.001], ***: ≤ 0.001 .

sensitivity of the MOS-J cell line to the 3 chemotherapy molecules of interest, and develop *in vivo* approaches in models induced from this cell line.

In vivo experiments

Model characterization: Tumor growth was compared in C57BL/6J mice in models induced by injection of 3.10^6 MOS-J cells into different sites (intra-muscular paratibial, intra-osseous, subcutaneous). No significant difference was observed in tumor growth between the models induced in the intra-osseous and intra-muscular paratibial sites, with respective average volumes on D28 after tumor cell injection (end of experiment) of $628.8 \text{ mm}^2 \pm 230.1$ and $547 \pm$

185.9 mm^2 (Figure 2). These tumor volumes were, however, significantly higher than the average volume of the tumors induced by cell injection in the subcutaneous site (mean tumor volume of $222.6 \pm 56.2 \text{ mm}^2$ on D28, respectively $P = 0.0049$ and $P = 0.0056$ compared with the intra-osseous and intra-muscular models). All injected mice developed a tumor after injection of 3.10^6 MOS-J cells.

Radiographic morphological analysis was performed on D15 and D21 after tumor cell injection, and revealed for the intra-osseous site a progressive evolution in metaphyseal heterogeneity with osteolysis and sclerosis (Figure 3). For the paratibial injection site, the images evoked a periosteal reaction with cortical sclerosis (Figure 3).

Micro CT morphometric analysis was performed 28 days post-injection, when the mice were sacrificed (Figure 4). Mice with intra-osseous injections predominantly developed metaphyseal lesions with cancellous bone heterogeneity. For mice with intra-muscular paratibial injections, the damage predominated in the periosteal region, with thickening of the anterior cortical.

Histological analysis of vascularization (CD-146), proliferation (Ki67) and apoptosis (caspase 3) was performed by standard HE staining, as well as by immunolabeling of a representative tumor (median tumor volume) in the group induced by the intra-osseous site injection, as well as intra-muscular paratibial injection (Figure 5). Three sections spaced at least one millimeter apart were analyzed with HE staining for these two groups. For tumors from the subcutaneous injection site, three tumor volumes were analyzed with HE staining at two different levels, spaced at least one millimeter apart. Only soft tissue not subjected to decalci-

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

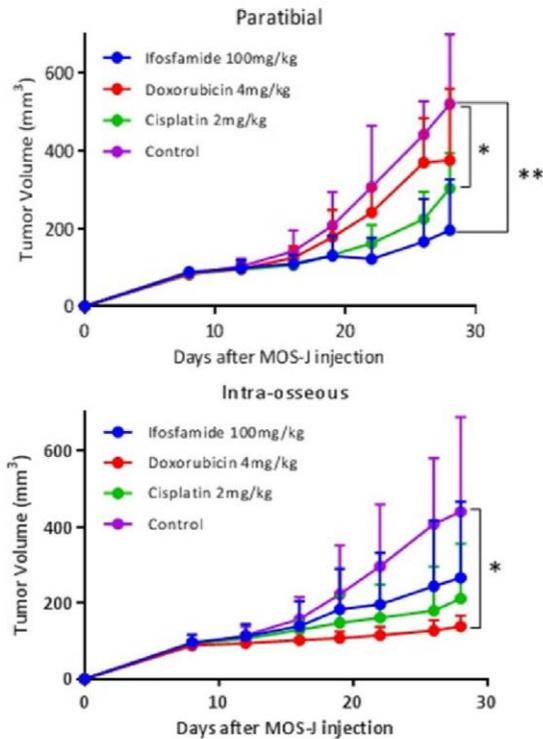


Figure 8. Kinetics of average tumor volumes according to different injection sites and treatments (cisplatin 2 mg/kg, doxorubicin 4 mg/kg, ifosfamide 100 mg/kg and control group). The treatment was introduced on D12. Thresholds of significance: *: [0.05; 0.01 [, **: [0.01; 0.001 [, ***: ≤ 0.001 .

fication was analyzed with IHC to ensure better comparability. HE staining of histological sections was quantified with the ImageJ software with necrosis areas determined relative to the whole surface of the tumor. For CD146 and caspase 3 staining, IHC analysis was conducted through a semi-automated enforcement macro used in the laboratory. The analysis of Ki67 labeling was performed using the ImageJ ImmunoRatio software.

Regarding necrosis, a significant difference was measured by the one-way ANOVA test between the tumor necrosis rate in tumors induced in the subcutaneous site ($7.88\% \pm 1.18$) and in the intra-muscular paratibial site ($4.03\% \pm 2.06$, difference of 3.85% , 95% CI [0.62; 7.08]; $P = 0.02$). No significant difference was observed in the tumor necrosis rate between tumors induced by subcutaneous injection and intra-osseous tumors $4.69\% \pm 1.30$ (difference of 3.20% , 95% CI [-0.03; 6.42]).

For the proliferation rate assessed by Ki67 labeling, no significant difference was observed between the proliferation index values of tumors induced in the intra-muscular paratibial ($23.6\% \pm 1.83$), intra-osseous ($12.15\% \pm 6.57$) and subcutaneous ($26.67\% \pm 3.73$) sites. Similarly, no significant differences were observed regarding vascularization, with values of 190.81 ± 31.87 CD146 positive cells/mm² for the intra-muscular paratibial site, 260.04 ± 80.97 for the intra-osseous site, and 219.6 ± 26.96 for the subcutaneous site. Regarding apoptosis (caspase 3 staining), a significant difference was measured by the One-Way ANOVA test between the apoptosis index in the model induced in the subcutaneous intra-osseous sites (respectively $2.83\% \pm 0.87$ and $0.94 \pm 0.17\%$, difference of 1.89% , 95% CI [0.20; 3.57]; $P = 0.03$), with the apoptosis index of tumors induced in the intra-muscular paratibial site being $1.49\% \pm 0.34$ (Figure 6).

Evaluating tolerance and treatment effectiveness on MOS-J models: The treatments were administered biweekly to the mice at three increasing doses. A control group was injected with a PBS solution with the same volume. We did not observe major weight loss secondary to chemotherapy (weight loss averages remained below 10% even at the highest doses). On the other hand, one mouse died on D29 in the cisplatin 4 mg/kg group, due to intolerance in the absence of an obvious cause. The mice in this group appeared to slow down, with a decrease in vivacity. The cisplatin 4 mg/kg dose was considered to be poorly tolerated. Cisplatin inhibits tumor growth at doses of 2 mg/kg and 4 mg/kg with a threshold at the dose of 2 mg/kg. 40 days post-injection, the difference was highly significant (ANOVA One-Way test). A significant difference of 770.7 mm^3 95% CI [233.7; 1307.7] between the cisplatin 2 mg/kg ($686.7 \text{ mm}^3 \pm 216.0$) and the control groups was observed. For doxorubicin, only the dose of 4 mg/kg inhibits tumor growth, with a significant difference compared to the control group of 756.0 mm^3 95% CI [284.3; 1227.6] and an average tumor volume of $701.4 \text{ mm}^3 \pm 205.1$ on day 40. For the group treated with ifosfamide, the dose of 100 mg/kg inhibits tumor growth, with a significant difference of 779.8 mm^3 compared to the control 95% CI [251.2; 1308.5] and an average tumor volume of 677.6

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

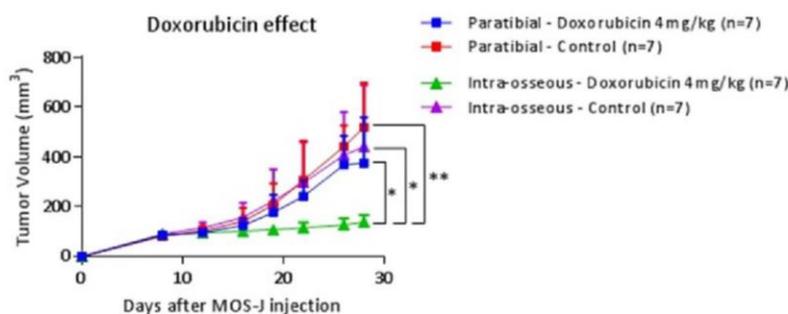


Figure 9. Kinetics of average tumor volumes in doxorubicin 4 mg/kg and the control group in intra-muscular paratibial and intra-osseous injection sites. The treatment was introduced on D12. Thresholds of significance: *: [0.05; 0.01 [, **: [0.01; 0.001 [, ***: ≤ 0.001 .

$\text{mm}^3 \pm 384.4$ on day 40. The doses of cisplatin 2 mg/kg, doxorubicin 4 mg/kg and ifosfamide 100 mg/kg were then selected (Figure 7).

Evaluating the impact of different injection environments on the effects of monotherapy: Growth kinetics study: the treatment injections were performed biweekly and started as soon as the average tumor volume in one of the groups exceeded 100 mm^3 . They were started on D12 for this manipulation.

In the intra-muscular paratibial model, significant differences in mean tumor volume were observed on D28 between ifosfamide 100 mg/kg ($195.9 \text{ mm}^3 \pm 130.6$; 95% CI [75.08, 316.6]) and the control group ($519.9 \text{ mm}^3 \pm 518.4$; 95% CI [370.7, 669.0]) and between cisplatin 2 mg/kg ($303.0 \text{ mm}^3 \pm 90.7$; 95% CI [219.2, 386.8]) and the control group (One-Way ANOVA, $P = 0.03$). Doxorubicin 4 mg/kg ($376.6 \text{ mm}^3 \pm 183.9$; 95% CI [205.6, 545.7]) did not induce a significant inhibitory effect on D28 in this model.

In the intra-osseous model, a significant difference in tumor volume of 301.2 mm^3 95% CI [47.8; 554.7] was observed on D28 between doxorubicin 4 mg/kg ($138.8 \text{ mm}^3 \pm 27.8$; 95% CI [109.9; 167.8]) and the control group ($440.1 \text{ mm}^3 \pm 248.3$; 95% CI [210.4; 669.7]; One-Way ANOVA test; $P = 0.038$). No difference was observed between cisplatin 2 mg/kg ($211.2 \text{ mm}^3 \pm 144.4$; 95% CI [59.7; 362.7]) and the control group, or between ifosfamide 100 mg/kg ($266.4 \text{ mm}^3 \pm 200.0$; 95% CI [81.4, 451.4]) and the control group. The control groups for the intra-muscular paratibial and intra-osseous

models were not significantly different on D28 (One-Way ANOVA test) (Figure 8). In the subcutaneous model, we were unable to draw any conclusions because of tumor failure. A significant difference in tumor volume of $236.8 \text{ mm}^3 \pm 76.26$ was observed on D28 with treatment with doxorubicin 4 mg/kg ($P = 0.024$) between the intra-osseous and intra-muscular paratibial models using the Two-Way ANOVA test. These

results suggest that the response to doxorubicin varies in relation to the microenvironment (Figure 9).

Histological analysis was performed by standard hematoxylin eosin (HE) staining, as well as by immunolabeling of vascularization, proliferation and apoptosis (respectively by CD146, Ki67, and caspase 3 assessment). A significant difference in necrosis rates of 9.78%; 95% CI [0.09; 19.47] was observed with doxorubicin 4 mg/kg between the intra-muscular paratibial model ($3.80\% \pm 3.48$) and the intra-osseous model ($13.59\% \pm 9.24$) (Two-Way ANOVA test, $P = 0.045$). No other significant difference could be observed within the same treatment between the intra-muscular paratibial and intra-osseous models. Regarding Ki67 proliferation, vascularization by CD146 as well as caspase 3 markers, no significant difference could be shown between the various treatments or for the different sites by the ANOVA Two-Way multiple comparison test (Figure 10).

Retrospective analysis

General data: The population used in our study included 10 patients (Table 1) with a sex ratio of 1.5, an average age at diagnosis of 17.4 years ± 4.9 (range: 9-24 years). In six out of 10 cases (60%), the osteosarcoma was localized in the lower femur, and pathological fractures were present 3 times out of 10 (30%). The resection margins were R0 for all the patients in the series (absence of resection margin invasion).

Histologic mapping: The population presented a Huvos and Rosen score of III in 8 cases, one

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

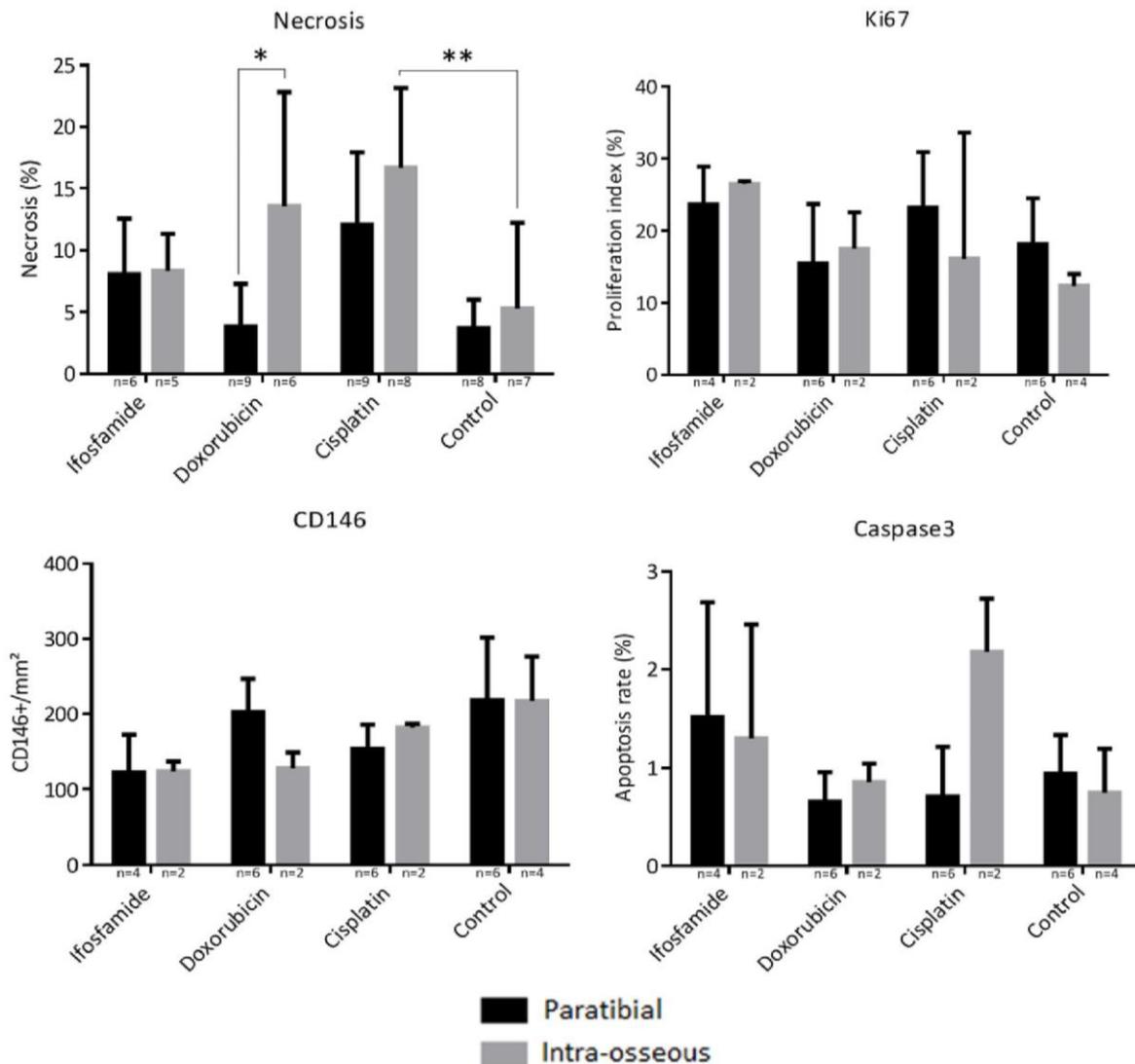


Figure 10. Histological analysis of necrosis (percentage of necrosis relative to the tumor area), cell proliferation with IHC labeling of Ki67 (expressed as a proliferation index), vascularization with IHC CD146 labeling, apoptosis with IHC cell labeling of caspase 3. Thresholds of significance: *: [0.05; 0.01], **: [0.01; 0.001], ***: ≤ 0.001 .

had a score of II with 13% viable cells, and one case a score of I with 80% viable cells (Table 2). The initial tumor had affected both the spongy, cortical and soft tissues in all cases, but had reached the cartilage only once. Cells remained alive in the soft tissues in 70% of cases, in cancellous bone in 100% of cases, in cortical tissue in 80% of cases, and in the cartilage in 0%, even in the case of extra-articular excision.

When viable cells formed focal colonies, they could affect spongy bone alone, or spongy bone and cortical bone, or the association of spongy bone, cortical bone, and soft tissue. No residual viable cell colony was identified within the cartilage (Figure 11).

Survival analysis: A significant difference in survival was shown between scores ≥ 3 (8 cases) and scores ≤ 2 (score II and score I) by the Log-Rank test ($P < 0.001$) (Figure 12).

However, we did not observe any significant difference in survival between patients with viable soft-tissue osteosarcoma cells (7 cases) and others (3 cases), or between patients with focal (8 cases) or diffuse repartition (2 cases) of these cells (Figure 13).

Feasibility: We were able to map viable cells remaining on the tumor with the help of anatomic pathologists. The analysis focused only on the slides with a viable cell rate $> 1\%$, defined

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

Table 1. General data-patients with osteoblastic osteosarcoma

Patients	Sex	Age	Location	Fracture	Metastasis	Excision	Margins
1	Male	19	Distal femur	No	No	Extra-articular	RO
2	Female	19	Distal femur	Yes	No	Articular	RO
3	Male	20	Distal femur	Yes	No	Articular	RO
4	Male	11	Distal femur	No	Pulmonary	Articular	RO
5	Female	24	Medium femur	No	No	Intercalary	RO
6	Female	9	Proximal tibia	No	No	Articular	RO
7	Male	15	Distal femur	No	No	Articular	RO
8	Male	22	Proximal humerus	No	No	Extra-articular	RO
9	Male	14	Distal femur	No	No	Extra-articular	RO
10	Female	21	Complete femur	Yes	No	Femorectomy	RO

Table 2. Initial anatomopathological data (Huvos and Rosen scores) and then as observed during the study (location of the necrotic tumor and viable osteosarcoma cells, as well as their density)

Patients	Huvos & Rosen		Tumor Location							
			Soft tissue		Cancellous bone		Cortical bone		Cartilage	
	Score	%	Necrosis	Viable	Necrosis	Viable	Necrosis	Viable	Necrosis	Viable
1	III	3.5	Yes	Focal	Yes	Focal	Yes	Focal	No	No
2	III	5	Yes	No	Yes	Focal	Yes	No	No	No
3	II	13	Yes	Focal	Yes	Focal	Yes	Focal	No	No
4	III	1.3	Yes	Diffuse	Yes	Diffuse	Yes	Diffuse	No	No
5	III	3	Yes	Diffuse	Yes	Diffuse	Yes	Diffuse	No	No
6	III	4.2	Yes	No	Yes	Focal	Yes	Focal	No	No
7	I	80	Yes	Diffuse	Yes	Diffuse	Yes	Diffuse	No	No
8	III	1.3	Yes	No	Yes	Focal	Yes	No	Yes	No
9	III	7.4	Yes	Focal	Yes	Focal	Yes	Focal	No	No
10	III	3	Yes	Focal	Yes	Focal	Yes	Focal	No	No

during the initial analysis. It was impossible to identify well-defined colonies due to the extent and low density of the osteosarcoma cells in some patients. In these cases, the term “diffuse distribution” was chosen, with the cells present in soft tissue, cortical bone and cancellous bone.

Discussion

The origin of this work is based on the clinical observation that certain osteosarcoma patients defined as good responders to neo-adjuvant chemotherapy by the Huvos and Rosen score (about 25%) will nevertheless relapse or go metastatic [9, 11]. Our research project is based on recent interest in microenvironment as a means of understanding tumor mechanisms in oncological research [13-15]. We hypothesize that the microenvironment influences the histological response to chemothera-

py in osteosarcoma, depending on the different types of tissue invaded. Cellular, architectural, biological and chemical variability may be at the origin of such regulation.

In this context, two complementary approaches were carried out to support our hypothesis: (i) a retrospective anatomopathological analysis was performed on excision pieces from ten patients from the OS2006 cohort [10]. A potential correlation was evaluated between the localization of residual viable tumor cells and patient survival. The purpose of this pilot study was to assess feasibility and potential trends; (ii) complementary preclinical modeling was also performed to study the concept of response to chemotherapy that depends on the environment. Different tumoral microenvironments were mimicked by inducing several mouse models of syngenic osteosarcoma following intra-muscular paratibial, intra-osseous, and subcutaneous injection of tumor cells.

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

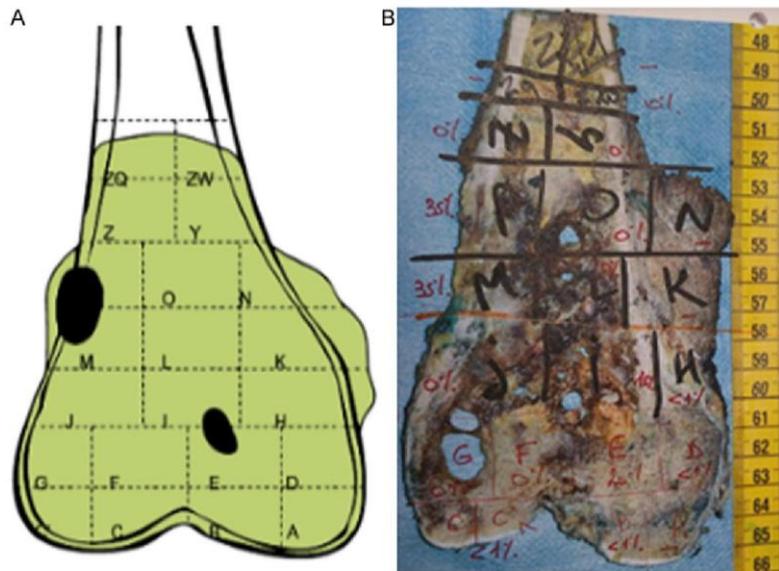


Figure 11. Frontal section of the distal femur resection piece of patient n° 1. Schematic representation of areas where viable tumor cells were observed (A), in black: focal colonies with high cell density (one between soft tissues, cortical bone and cancellous bone, the other in cancellous bone), in green: necrotic tumor. Picture identifying the different slides with percentage of residual viable tumor cells in red (B).

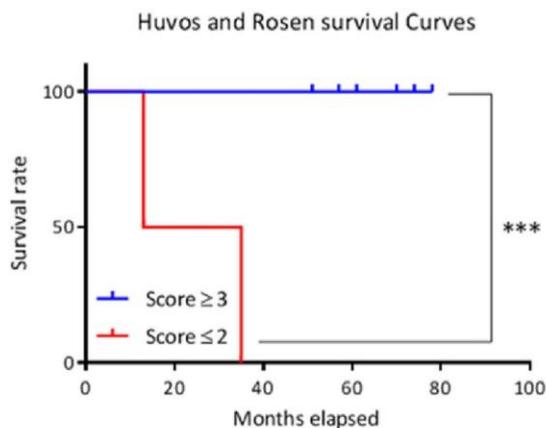


Figure 12. Survival curves according to Huvos and Rosen score. Thresholds of significance: *: [0.05; 0.01 [, **: [0.01; 0.001 [, ***: ≤ 0.001 .

In vitro experiments allowed us to demonstrate MOS-J line sensitivity to the therapeutic molecules selected for our research project (cisplatin, ifosfamide, doxorubicin), chosen for their use in the treatment of osteosarcoma. These molecules are most often used as part of the API-AI protocol [10, 32, 33] as an alternative to high dose methotrexate in patients over the age of 18. The proliferation inhibition observed *in vitro* allowed us to develop models induced with the same MOS-J cells in C57BL/6J mice

for the three molecules tested. There are no results on these molecules on the MOS-J cell line in the literature to our knowledge [34].

The murine MOS-J osteosarcoma cell line was used to develop the corresponding syngeneic model in C57BL/6J mice, allowing us to take into account the immune system, which is crucial for studying the influence of the microenvironment. These experiments need to be reproduced in other models of syngenic osteosarcoma (murine K7M2, POS-1), as well as in models induced from human biopsies (PDX models) or cell lines in Nude mice, even if the immune compartment does not totally imitate the human situation. We were thus able to

compare the responses of chemotherapy-resistant or -sensitive tumors as a means of assessing the potential role of different environments in the respective responses.

Of the three models we developed in the *in vivo* experiments, the subcutaneous-induced model has never been described in the literature with MOS-J cells. In the first set of experiments, all tumors developed, reaching a minimum volume of 150 mm³ on D28 (making histological analysis possible). However, we did not succeed in reproducing these results in our second subcutaneous model (tumor volume regressions were observed and no tumors had exceeded the volume of 125 mm³ on D28). The intra-muscular paratibial model induced with MOS-J cells with tumor initiation in muscle tissue in C57BL/6J mice is well described in the literature [22, 35] and is frequently used in our laboratory for its easy handling and reproducibility. The intra-osseous model is the one that best reproduces osteosarcoma development in humans (as cancellous bone is the tumor niche). In spite of this advantage, from a technical point of view it has greater complexity, with several protocols described [36, 37]. The protocol we used is based on the one described by Uluçkan *et al* [37]. This model is mastered in our study with satisfactory reproducibility.

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

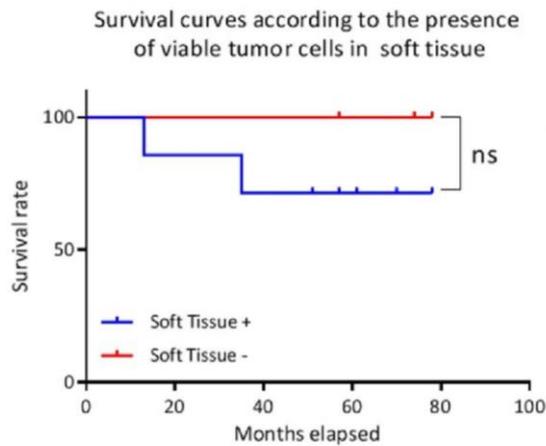


Figure 13. Survival curves according to the presence of viable tumor cells in soft tissues. Ns: not significant.

A significant difference in therapeutic response between the intra-muscular paratibial and intra-osseous models was only observed for doxorubicin 4 mg/kg, and not for ifosfamide 100 mg/kg or cisplatin 2 mg/kg. The inhibitory effect of doxorubicin on tumor progression was moderate in the intra-muscular model, while it significantly inhibited intra-osseous tumor growth, with low dispersion in tumor volumes. Histological analysis indicated a higher rate of tumor necrosis in the intra-osseous model treated with doxorubicin 4 mg/kg than in the intra-muscular model, confirming the histological difference in response to treatment between these two sites. The following hypothesis may explain this phenomenon: initial tumor growth in cancellous bone in the intra-osseous model may facilitate the diffusion of doxorubicin directly in contact with the tumor due to its strong vascularization. Conversely, the intra-muscular model, because of its aberrant neo-vascularization, may limit the diffusion of this molecule [12, 38]. Moreover, doxorubicin has limited deep tumor penetration: concentration gradients in tissue distribution have been reported for this molecule in breast cancer and murine models [21, 39, 40]. There may be several explanations for this finding: precarious vasculature, hypoxia or acid pH [21, 41-43], for example. This difference is potentially related to the tumor microenvironment even though we did not observe any difference in CD146 labeling in our series. However, other methodological approaches could be proposed: for example, in future experiments, histology focused on

perfusion or functional imaging may better evaluate tissue perfusion [44, 45]. It is therefore necessary to better characterize the microenvironment in order to understand this difference in therapeutic response: quantitative analysis by direct immunofluorescence would allow us to assess doxorubicin tissue penetration in relation to the different microenvironments [46, 47], evaluating hypoxia and pH roles should also be studied between the different models [47], as should characterizing the immune microenvironment by IHC to identify the macrophages and lymphocytes infiltrating the tumors.

The second part of our study concerned a retrospective anatomopathological analysis which was initially limited to a pilot phase in ten patients from the OS2006 cohort [10], implying that caution is required when interpreting our results. We evaluated feasibility and potential trends, focusing the analysis on the tissue localization of viable residual osteosarcoma cells in surgical resection pieces. Analyzing the tissue localization of viable osteosarcoma cells with the help of trained pathologists did not reveal any particular technical problems. Viable cells presented as either well-defined focal colonies or were dispersed in diffuse form, affecting all tissues. This re-analysis was relatively rapid, limited to slides with more than one percent of viable tumor cells. However, limitations linked to the lack of reproducibility inherent to the subjectivity of the histological analysis are possible. The results obtained in our study differ from those of Picci *et al* [12], who identified preferential survival zones in soft tissue in 63% of cases (versus 70% in our study). On the other hand, those authors only observed a 58% survival rate in spongy zones, compared to 100% in our study. Our results need to be weighted in relation to the small number studied, the possible differences in analysis protocol, and evolution in chemotherapy protocols.

Despite its small size, our series confirms the effectiveness of the Huvos and Rosen score with regard to the prognostic evaluation of survival. Patients with a Huvos and Rosen score ≤ 2 have a higher probability of death according to the literature [5-7]. On the other hand, we did not find any significant difference in survival between the different localizations of residual viable tumor cells. A potential severity criterion

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

regarding the presence of viable cells in soft tissues should be re-evaluated, with 100% survival for patients without soft tissue involvement versus 62.5% for others. Tissue microenvironment (vascularization, pH, oxygenation, etc) may explain this difference in chemotherapy response, with limited efficacy of the molecules in these tumor localizations. This would represent areas of potential chemotherapy resistance, with potentially higher metastatic power. A larger cohort is needed to explore this hypothesis.

Our translational study nevertheless seems to show a convergence of the two approaches developed. The location of viable tumor cells in soft tissues, correlated with poor potential prognosis (based on the retrospective anatomopathological analysis), may be related to the decreased efficacy of doxorubicin observed in the intra-muscular paratibial preclinical model (where the tumor was initially localized in the muscular soft tissues). This study also validated our different preclinical models of osteosarcoma as being representative of the microenvironment for the study of resistance to chemotherapy.

Acknowledgements

This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale, FRM grant number DEA20150633177 awarded to Vincent Crenn. Experimental Therapeutic unit (Guylène Hamery, UTE Phan, IRS-UN, 8 quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1).

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Dr. Françoise Redini, Inserm UMR 1238, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes Cedex 1, France. Tel: +33 240 412 960; E-mail: francoise.redini@univ-nantes.fr; Dr. Vincent Crenn, Department of Orthopedic, CHU Hôtel DIEU, 44093 Nantes Cedex, France. Tel: +33 240 084 850; E-mail: vincenn@gmail.com

References

- [1] Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 2009; 152: 3-13.
- [2] Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma anatomic and histologic variants. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 555-581.
- [3] Botter SM, Neri D, Fuchs B. Recent advances in osteosarcoma. *Curr Opin Pharmacol* 2014; 16: 15-23.
- [4] Gibbs CP, Levings PP, Ghivizzani SC. Evidence for the osteosarcoma stem cell. *Curr Orthop Pract* 2011; 22: 322-326.
- [5] Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Werner M, Winkelmann W, Zoubek A, Jürgens H, Winkler K. 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* 2002; 20: 776-790.
- [6] Davis AM, Bell RS, Goodwin PJ. Prognostic factors in osteosarcoma: a critical review. *J Clin Oncol* 1994; 12: 423-431.
- [7] Friebele JC, Peck J, Pan X, Abdel-Rasoul M, Mayerson JL. Osteosarcoma: a meta-analysis and review of the literature. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2015; 44: 547-553.
- [8] Luetke A, Meyers PA, Lewis I, Juergens H. Osteosarcoma treatment-Where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treat Rev* 2014; 40: 523-532.
- [9] Rosen G, Marcove RC, Caparros B, Nirenberg A, Kosloff C, Huvos AG. Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer* 1979; 43: 2163-2177.
- [10] Piperno-Neumann S, Le Deley MC, Rédini F, Pacquement H, Marec-Bérard P, Petit P, Brisse H, Lervat C, Gentet JC, Entz-Werlé N, Italiano A, Corradini N, Bompas E, Penel N, Tabone MD, Gomez-Brouchet A, Guinebretière JM, Mascard E, Guoin F, Chevance A, Bonnet N, Blay JY, Brugières L; Sarcoma Group of UNICANCER; French Society of Pediatric Oncology (SFCE); French Sarcoma Group (GSF-GETO). Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 1070-1080.
- [11] O'Kane GM, Cadoo KA, Walsh EM, Emerson R, Dervan P, O'Keane C, Hurson B, O'Toole G, Dudeney S, Kavanagh E, Eustace S, Carney DN. Perioperative chemotherapy in the treatment of osteosarcoma: a 26-year single institution review. *Clin Sarcoma Res* 2015; 5: 17.
- [12] Picci P, Bacci G, Campanacci M, Gasparini M, Pilotti S, Cerasoli S, Bertoni F, Guerra A, Capanna R, Albisinni U, et al. Histologic evaluation of necrosis in osteosarcoma induced by chemotherapy regional mapping of viable and nonviable tumor. *Cancer* 1985; 56: 1515-1521.

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

- [13] Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012; 21: 309-322.
- [14] Alfranca A, Martinez-Cruzado L, Tornin J, Abarategi A, Amaral T, de Alava E, Menendez P, Garcia-Castro J, Rodriguez R. Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72: 3097-3113.
- [15] Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 2013; 501: 346-354.
- [16] Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, André S, Piccart M, Campone M, Brain E, Macgrogan G, Petit T, Jassem J, Bibeau F, Blot E, Bogaerts J, Aguet M, Bergh J, Iggo R, Delorenzi M. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 2009; 15: 68-74.
- [17] Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Am Assoc Cancer Res* 2008; 14: 2519-2526.
- [18] Yu L, Guo W, Zhao S, Wang F, Xu Y. Fusion between cancer cells and myofibroblasts is involved in osteosarcoma. *Oncol Lett* 2011; 2: 1083-1087.
- [19] Ader I, Gstalder C, Bouquerel P, Golzio M, Andrieu G, Zalvidea S, Richard S, Sabbadini RA, Malavaud B, Cuvillier O. Neutralizing S1P inhibits intratumoral hypoxia, induces vascular remodelling and sensitizes to chemotherapy in prostate cancer. *Oncotarget* 2015; 6: 13803-13821.
- [20] McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol* 2014; 87: 20130676.
- [21] Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1441-1454.
- [22] Joliat MJ, Umeda S, Lyons BL, Lynes MA, Shultz LD. Establishment and characterization of a new osteogenic cell line (MOS-J) from a spontaneous C57BL/6J mouse osteosarcoma. *In Vivo* 2002; 16: 223-228.
- [23] Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 24: 148-154.
- [24] Tuominen VJ, Ruotoistenmäki S, Viitanen A, Jumppanen M, Isola J. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res* 2010; 12: R56.
- [25] Hartig SM. Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Curr Protoc Mol Biol* 2013; Chapter 14: Unit 14.15.
- [26] Sommer K, Peters SO, Robins IH, Raap M, Wiedemann GJ, Remmert S, Sieg P, Bittner C, Feyerabend T. A preclinical model for experimental chemotherapy of human head and neck cancer. *Int J Oncol* 2001; 18: 1145-9.
- [27] Wang HD, Shi YM, Li L, Guo JD, Zhang YP, Hou SX. Treatment with resveratrol attenuates sublesional bone loss in spinal cord-injured rats. *Br J Pharmacol* 2013; 170: 796-806.
- [28] Dhar S, Kolishetti N, Lippard SJ, Farokhzad OC. Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 1850-1855.
- [29] Dieudonné FX, Marion A, Marie PJ, Modrowski D. Targeted inhibition of T-cell factor activity promotes syndecan-2 expression and sensitization to doxorubicin in osteosarcoma cells and bone tumors in mice. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 2118-2129.
- [30] Hanly L, Figueredo R, Rieder MJ, Koropatnick J, Koren G. The effects of N-acetylcysteine on ifosfamide efficacy in a mouse xenograft model. *Anticancer Res* 2012; 32: 3791-3798.
- [31] Ottewill PD, Mönkkönen H, Jones M, Lefley DV, Coleman RE, Holen I. Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1167-1178.
- [32] Bielack S, Carrle D, Casali PG; ESMO Guidelines Working Group. Osteosarcoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009; 20 Suppl 4: 137-139.
- [33] Brugières L, Piperno-Neumann S. La chimiothérapie des ostéosarcomes. *Oncologie* 2007; 9: 164-169.
- [34] Yang W, Soares J, Greninger P, Edelman EJ, Lightfoot H, Forbes S, Bindal N, Beare D, Smith JA, Thompson IR, Ramaswamy S, Futreal PA, Haber DA, Stratton MR, Benes C, McDermott U, Garnett MJ. Genomics of drug sensitivity in cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: D955-D961.
- [35] Georges S, Chesneau J, Hervouet S, Taurelle J, Gouin F, Redini F, Padrines M, Heymann D, Fortun Y, Verrecchia F. A disintegrin and metalloproteinase 12 produced by tumour cells accelerates osteosarcoma tumour progression and associated osteolysis. *Eur J Cancer* 2013; 49: 2253-2263.
- [36] Cole HA, Ichikawa J, Colvin DC, O'Rear L, Schoenecker JG. Quantifying intra-osseous growth of osteosarcoma in a murine model with radiographic analysis. *J Orthop Res* 2011; 29: 1957-1962.

Microenvironment and osteosarcoma therapeutic response

- [37] Uluçkan Ö, Segaliny A, Botter S, Santiago JM, Mutsaers AJ. Preclinical mouse models of osteosarcoma. *BoneKEy Rep* 2015; 4: 670.
- [38] Eikenberry S. A tumor cord model for Doxorubicin delivery and dose optimization in solid tumors. *Theor Biol Med Model* 2009; 6: 16.
- [39] Lankelma J, Dekker H, Luque FR, Luykx S, Hoekman K, van der Valk P, van Diest PJ, Pinedo HM. Doxorubicin gradients in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1703-1707.
- [40] Primeau AJ, Rendon A, Hedley D, Lilge L, Tannock IF. The distribution of the anticancer drug doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Am Assoc Cancer Res* 2005; 11: 8782-8788.
- [41] Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 437-447.
- [42] Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 583-592.
- [43] Sullivan R, Paré GC, Frederiksen LJ, Semenza GL, Graham CH. Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Am Assoc Cancer Res* 2008; 7: 1961-1973.
- [44] Faye N. Thérapie cellulaire de l'angiogenèse tumorale: évaluation par imagerie morphologique et fonctionnelle en IRM et vidéomicroscopie de fluorescence. (Paris 11, 2011).
- [45] Jha AK, Tharp KM, Ye J, Santiago-Ortiz JL, Jackson WM, Stahl A, Schaffer DV, Yeghiazarians Y, Healy KE. Enhanced survival and engraftment of transplanted stem cells using growth factor sequestering hydrogels. *Biomaterials* 2015; 47: 1-12.
- [46] Au JL, Jang SH, Wientjes MG. Clinical aspects of drug delivery to tumors. *J Control Release* 2002; 78: 81-95.
- [47] Erapaneedi R, Belousov VV, Schäfers M, Kiefer F. A novel family of fluorescent hypoxia sensors reveal strong heterogeneity in tumor hypoxia at the cellular level. *EMBO J* 2016; 35: 102-113.

Discussion

Modèle de bons et mauvais répondeurs

Notre travail a permis de montrer que le site d'implantation tumoral dans le modèle murin d'étude influençait la réponse histologique à la chimiothérapie. En effet une bonne réponse thérapeutique à la Doxorubicine en site intra-osseux a été observée avec une faible dispersion des résultats. Par rapport au site d'injection para-tibial ces souris peuvent être considérées comme un modèle de bons répondeurs, avec une cinétique tumorale plus lente et une nécrose tumorale plus importante (Figure 38).

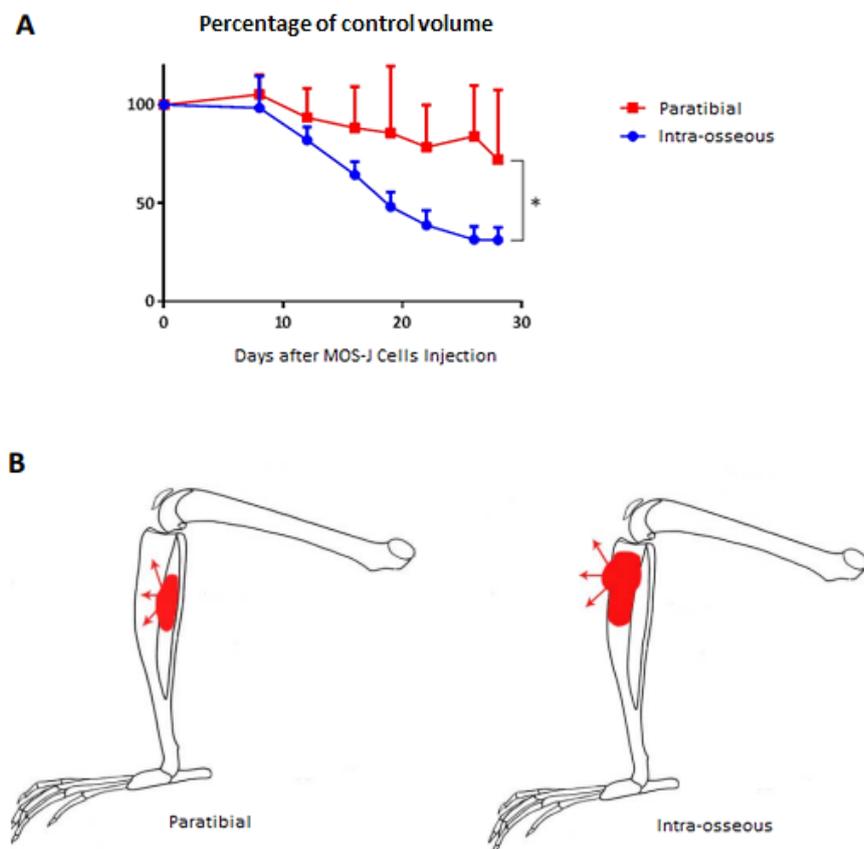


Figure 38 : A : Evolution des cinétiques tumorales en pourcentage du volume contrôle, issue de l'expérience précédente, * : $p < 0,05$; B : Modèles d'injection paratibial et intra-osseux..

L'injection en site para-tibial, dans les masses musculaires après avivement périosté, objectivait une réponse thérapeutique significativement inférieure, témoin de possibles mécanismes de résistance.

Validation de l'expérience

Cette constatation de meilleure réponse a pu être confirmée au laboratoire PhyOs dans plusieurs expériences, notamment sur souris Nude, mais également dans le cadre du travail de Master 2 de Pierre Kubicek (Figure 39). Nous retrouvons donc une reproductibilité de ce différentiel de réponse à la Doxorubicine (Kubicek, 2018).

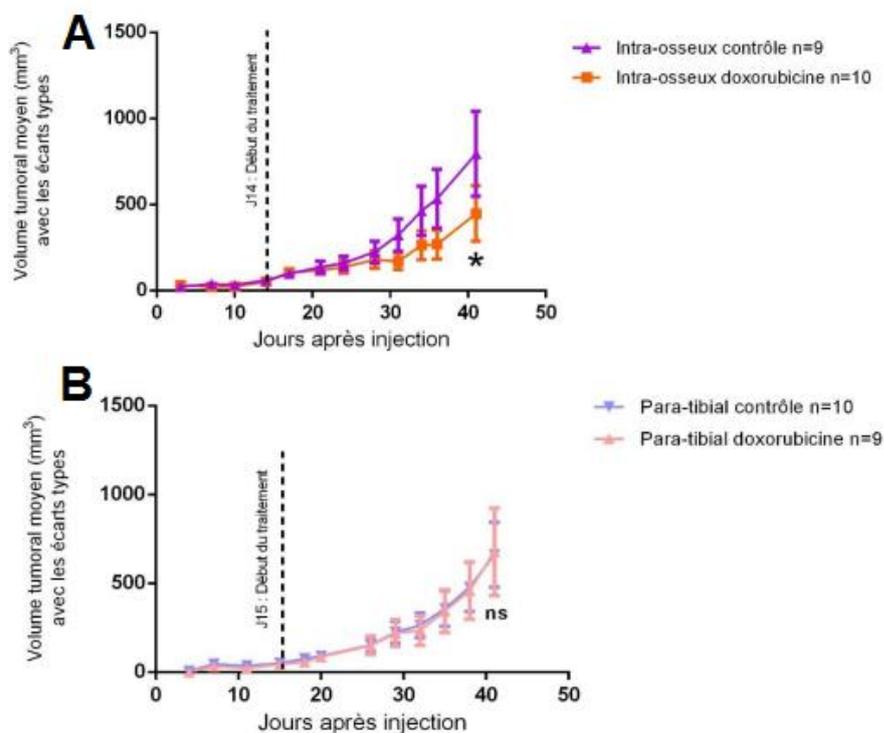


Figure 39 : Cinétique d'évolution des volumes tumoraux moyens en fonction du traitement par Doxorubicine, selon le modèle syngénique MOS-J murin C57BL/6. A : Modèle d'injection intra-osseux ; B : Modèle d'injection para-tibial, * : [0,05 ; 0,01[; ns : non significatif, (Kubicek, 2018).

Critiques et limites de l'étude :

Modèle murin

Notre modèle préclinique est développé sur un modèle murin syngénique MOS-J, avec les limites inhérentes à l'utilisation d'un modèle animal.

Son caractère microscopique le différencie aussi des ostéosarcomes humains, qui seraient plus hétérogènes. Enfin la nécrose tumorale induite dans notre modèle est beaucoup plus limitée que celle évaluée chez l'homme, qui est traité par polychimiothérapie. Les conclusions quant au transfert de nos résultats à l'homme doivent donc être formulées avec précaution.

Nous avons initialement développé un modèle en site d'injection sous-cutané qui s'est révélé peu reproductible et que nous avons abandonné. En revanche des travaux complémentaires sur des injections intramusculaires pures, à distance de l'os ont montré des résultats intéressants avec une très forte chimiosensibilité à la Doxorubicine, permettant d'élargir le panel de modèles avec des réponses variables (Kubicek, 2018).

Analyse rétrospective

Concernant l'analyse rétrospective histologique sur biopsies de patients, nous n'avons pas identifié de lien significatif entre la localisation des cellules tumorales viables, ou le caractère focal ou diffus de celles-ci, et la survie des patients.

Ce travail bien que techniquement réalisable, est particulièrement chronophage, et la relecture complète des lames implique une certaine part de subjectivité. Il était dans certains cas impossible de discerner des colonies bien identifiées de par l'étendue et la faible densité des cellules ostéosarcomateuses chez certains patients. Dans ces cas-là nous avons opté pour la formulation d'un « caractère diffus » des cellules tumorales.

On peut imaginer que les mécanismes de résistance aux traitements et de tumorigenèse diffèrent entre ces colonies focales très circonscrites de haute cellularité, et ces configurations beaucoup plus éparées et diffuses. Des analyses complémentaires sur ce point précis seraient intéressantes à réaliser. La difficulté de la poursuite d'un travail d'envergure sur cet axe rétrospectif réside dans l'absence d'informations systématisées quant à la localisation précise de colonies tumorales viables dans un tissu spécifique sur le compte rendu d'anatomopathologie. Ceci sous-entend une relecture systématique des lames d'une cohorte, ce qui implique un travail d'analyse conséquent. L'intégration d'informations relatives à la localisation et la densité des cellules viables au compte rendu anatomopathologique systématisé pourrait permettre un recueil prospectif de ces données. Mais l'intérêt d'une telle proposition reste encore à démontrer.

Travaux complémentaires et perspectives

Une fois la validation de nos modèles avec des réponses variables à la chimiothérapie identifiées, nous avons cherché à identifier les facteurs mis en jeu au niveau du microenvironnement pouvant expliquer ce phénomène. Le premier aspect exploré fut étudié par Pierre Kubicek dans le cadre son Master 2 et a porté sur la résorption osseuse (Kubicek, 2018).

L'axe de la résorption osseuse et l'ostéogénèse

L'impact de l'expression de la triade RANK-RANK L-OPG a été étudié dans le laboratoire PhyOS, pour évaluer si l'expression de RANKL pouvait être un facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie (Figure 40).

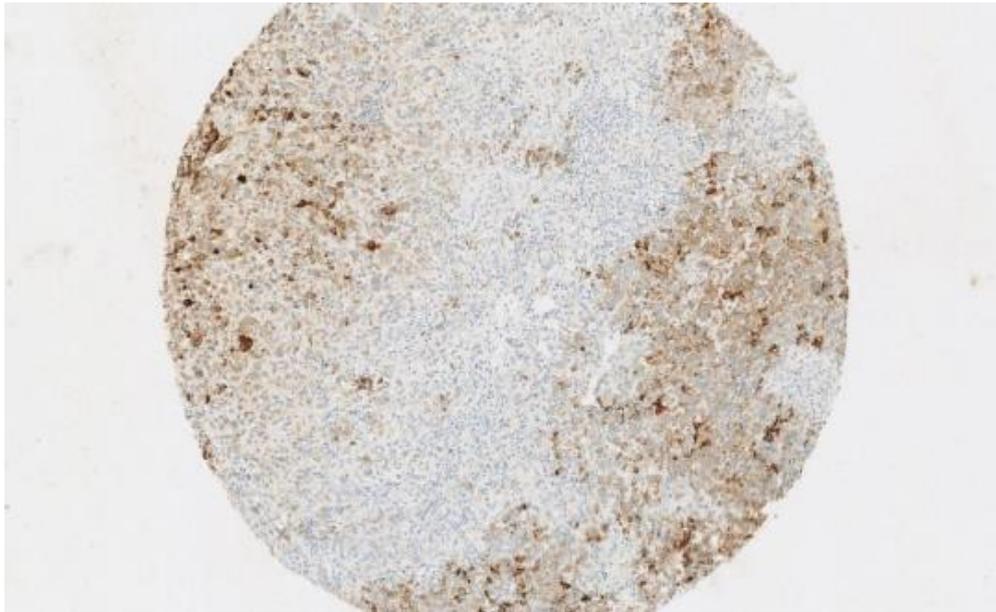


Figure 40 : IHC de RANKL. Spot d'un TMA issu de biopsie à Zoom x68. La coloration marron correspond à un marquage positif pour l'anticorps RANKL, (Kubicek, 2018).

Une analyse préclinique et sur pièces anatomopathologiques a été réalisée, mais aucune différence d'expression significative n'a pu être mise en évidence, l'analyse de RANKL s'est donc révélée peu concluante (Figure 41).

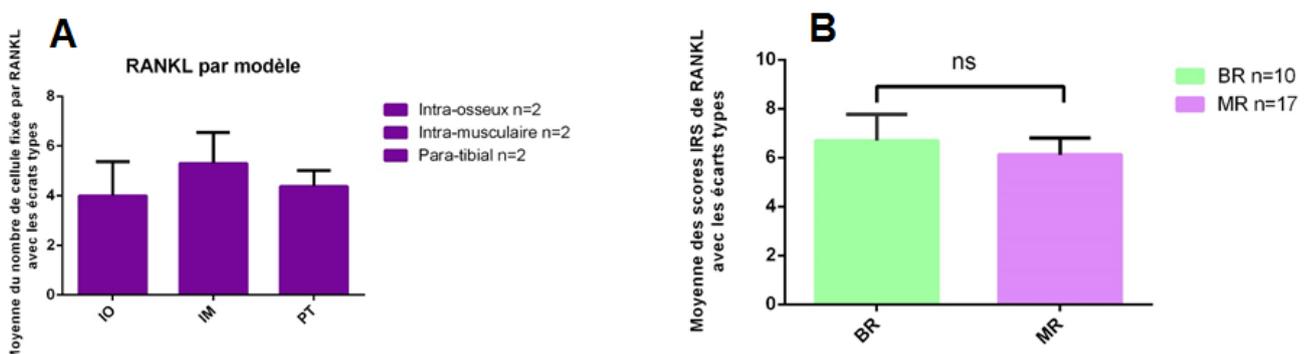


Figure 41 : Evaluation de l'expression de RANKL. A : IHC de RANKL sur modèle murin. Pas de différence significative entre les 3 modèles avec respectivement une moyenne de 4 cellules marquées dans le modèle intra-osseux, 5,3 dans le modèle intra-musculaire et 4,4 dans le modèle intra-osseux. B : Score d'immunomarquage Immuno-reactive score (IRS) de RANKL sur cohorte rétrospective (27 patients). BR : Bon Répondeurs, MR : Mauvais Répondeurs, ns : non significatif, (Kubicek, 2018).

Selon notre hypothèse de départ et les données de la littérature, nous pouvions estimer qu'en tant que facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie, le taux d'expression de RANKL serait plus élevé dans les modèles chimio-résistants. Ce résultat peut être expliqué par le faible effectif analysé (2 souris par modèle) mais également par la complexité de réalisation et d'évaluation de cette IHC (Kubicek 2018).

Modèles complémentaires

Lors de l'étude de l'axe RANK-RANKL, un modèle d'injection intra-musculaire a été développé par Kubicek en 2018. Ce modèle ne se comporte pas comme le modèle paratibial avec avivement du périoste, et semble lui aussi présenter des particularités de bonne réponse à la Doxorubicine, sur le même modèle que l'injection en site intra-osseux (Figure 42).

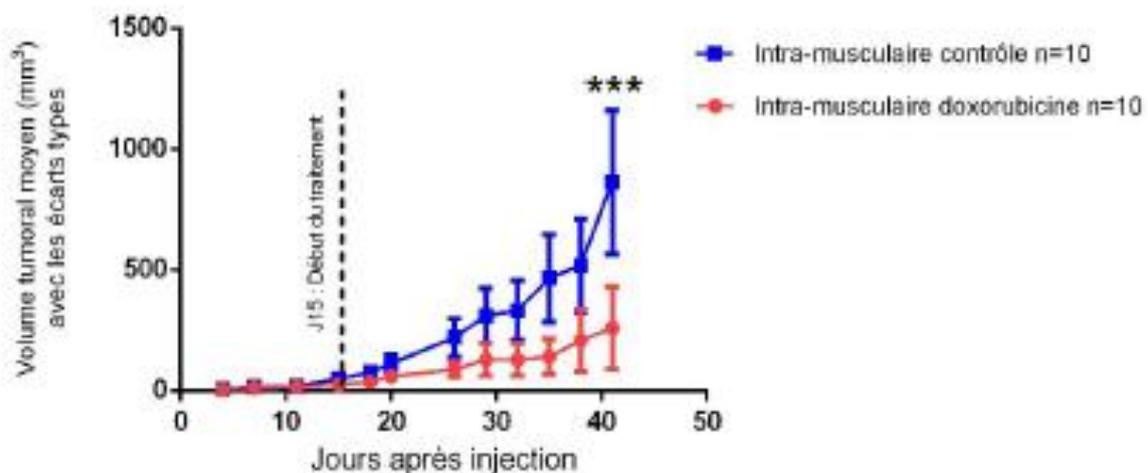


Figure 42 : Cinétique d'évolution des volumes tumoraux moyens dans le modèle d'injection en site intra-musculaire en fonction du traitement par Doxorubicine, selon le modèle syngénique MOS-J murin C57BL/6. *** < 0,001 ; (Kubicek, 2018).

Ce type de modèle d'injection au sein du tissu musculaire, devrait à l'avenir être étudié dans nos analyses d'IHC, afin d'évaluer ces spécificités à distance du tissu osseux.

Analyse de l'environnement vasculaire

Nous ne retrouvons pas dans notre étude de différence significative d'expression de CD146 entre les différents environnements étudiés, la Doxorubicine ne semblait pas non plus modifier significativement l'expression de marqueur.

Sur ce point, les travaux de P. Kubicek ont montré des résultats divergents sur des analyses exploratoires de petits effectifs, avec significativement d'avantage d'éléments CD146+ dans le modèle induit en site para-tibial « mauvais répondeur » (Figure 43).

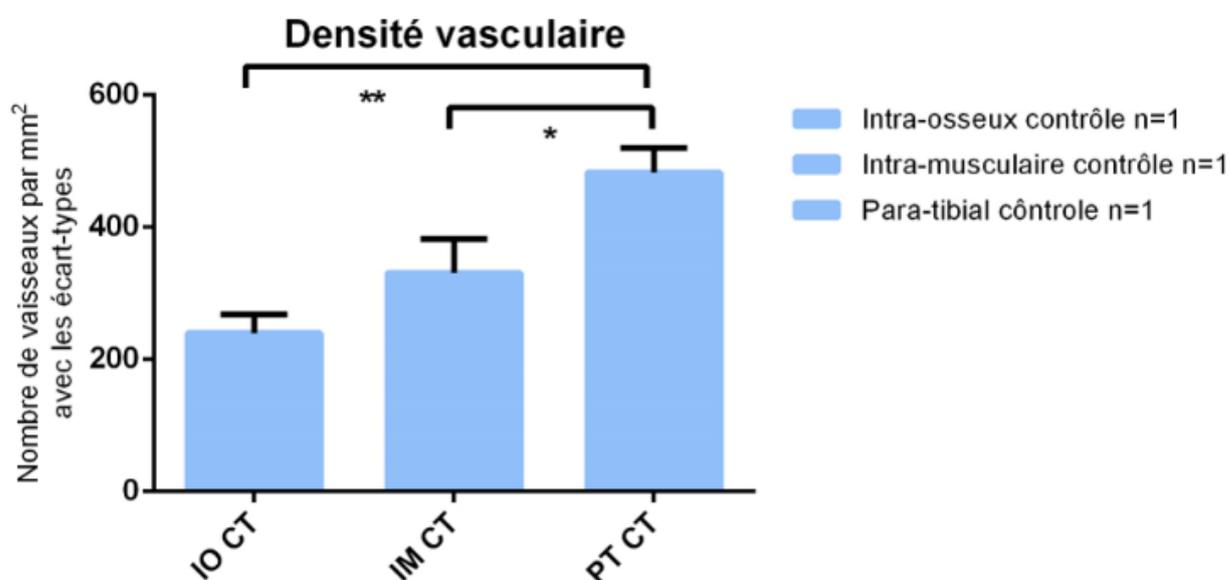


Figure 43 : Analyse en IHC de l'angiogenèse selon le modèle d'injection en condition contrôle : nombre d'éléments positifs pour un marquage avec l'anticorps anti-CD146 par unité de surface. IO : intra-osseux ; IM : intra-musculaire ; PT : paratibial ; CT : Contrôle ; * [0,05 ; 0,01], (Kubicek, 2018).

L'analyse de l'angiogenèse montrait dans ce travail une densité vasculaire plus importante dans le modèle PT que dans les 2 autres modèles. Ce résultat constitue une hypothèse selon laquelle le microenvironnement vasculaire pourrait influencer sur l'effet de la chimiothérapie sur la cinétique de croissance tumorale dans le modèle para-tibial.

L'exploration vasculaire apparaissait donc dans ce contexte une voie d'intérêt à explorer. Une méthodologie plus robuste en termes de nombre d'anticorps d'intérêt, et de zones à étudier sera nécessaire pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Article original : Signature du microenvironnement tumoral vasculaire en tant que marqueur de la réponse thérapeutique à la Doxorubicine dans un modèle préclinique d'ostéosarcome

SIGNATURE OF THE VASCULAR TUMOR MICROENVIRONMENT AS A MARKER OF THERAPEUTIC RESPONSE TO DOXORUBICIN IN A PRECLINICAL MODEL OF OSTEOSARCOMA

Présentation de l'article

Introduction :

Cette publication se place dans la continuité du travail publié en 2017 où nous avons identifié le rôle du microenvironnement dans la réponse histologique à l'ostéosarcome (Crenn et al., 2017).

Après avoir évalué dans un premier temps le rôle potentiel de la triade RANK-RANKL-OPG sur les phénomènes de réponse au traitement dans notre modèle d'étude pré-clinique, nous avons cherché à comprendre et à caractériser l'environnement et le réseau vasculaire de l'ostéosarcome dans ce modèle.

Cette voie nous semblait une des pistes de choix dans l'explication de potentiels facteurs de résistance à la chimiothérapie, d'une part grâce à des résultats préliminaires de l'étude de P. Kubicek lors de son Master, mais aussi par des avancées récentes dans la description de la vascularisation osseuse. Les spécificités des vaisseaux H et L identifiés par l'équipe d'Adams (Kusumbe et al., 2014) et leurs rôles combinés dans l'ostéogenèse et l'angiogenèse ont renforcé notre hypothèse.

Une analyse préliminaire centrée sur la micro-vascularisation de l'ostéosarcome nous a donc paru un axe original d'intérêt dans l'étude de son environnement. Les vaisseaux H étant des lieux d'échange et de transit particulièrement actifs, ils correspondent au profil d'éléments qui pourraient être utilisés ou recrutés par les cellules d'ostéosarcome.

En plus du choix de l'approche en IHC centrée sur les marqueurs décrits dans des travaux de référence (Sivaraj and Adams, 2016), nous avons souhaité appréhender au mieux l'hétérogénéité très forte de l'ostéosarcome, avec une méthodologie d'analyse régionale dédiée.

Principes et objectifs :

Nous avons donc cherché à analyser le réseau vasculaire de l'ostéosarcome par IHC dans notre modèle murin d'ostéosarcome MOS-J. Nous avons ainsi cherché à évaluer les spécificités d'expression de marqueurs endothéliaux ou péricytaire, en fonction de l'environnement tissulaire. A cette fin, des coupes histologiques multiples et étagées ont ainsi été réalisées à partir des tumeurs issues de modèles induits par la lignée MOS-J, ainsi qu'une analyse des différentes zones d'intérêt, pouvant présenter des spécificités environnementales.

L'impact de la Doxorubicine sur ces marquages a été étudié et comparé à la condition contrôle. Enfin, des co-marquages d'intérêt ont été réalisés et quantifiés chez les souris traitées en fonction du modèle d'injection intra-osseux (bon répondeur), et para-tibial (mauvais répondeur).

Choix méthodologiques :

Nous avons ainsi sélectionné trois marqueurs d'intérêt : CD31, Endomucine et α -SMA dans le cadre de nos analyses en IHC. Celles-ci ont été réalisées sur les pattes de souris issues d'expériences précédentes. Une mise au point méthodologique des différents marquages a pu être menée au sein du laboratoire par Jérôme Amiaud, afin qu'ils puissent être validés et transposés sur du tissu décalcifié de façon reproductible.

L'analyse différentielle de l'expression au sein de la tumeur de CD31, Endomucine et α -SMA a été comparée entre la portion tumorale centrale, le front d'invasion et le contact osseux direct. Nous avons analysé l'effet de la Doxorubicine sur l'expression de ces marqueurs vasculaires.

Des analyses par multiplexing en Immunofluorescence ont été réalisées afin d'identifier les co-marquages qui nous semblaient pertinents, notamment les éléments co-marqués par CD31+/Endomucine+, par analogie aux vaisseaux H, ou les éléments CD31+/ α -SMA+. Une analyse qualitative complémentaire en imagerie confocale à la plate-forme MicroPicell a été réalisée avec l'aide de Stéphanie Blandin, Steven Nedellec, et Philippe Hulin (SFR François

Bonamy, Nantes). Enfin nous avons tenté d'identifier d'éventuelles différences de positivité de ces co-marquages chez les souris traitées par Doxorubicine en fonction du site d'injection paratibial ou intra-osseux, afin d'étudier si nous observions des modifications selon la chimiosensibilité du modèle.

Publication

Soumission le 29/01/21, American Journal of Cancer Research

Signature of the vascular tumor microenvironment as a marker of the therapeutic response to doxorubicin in a preclinical model of osteosarcoma

Vincent Crenn^{1,2,3}, Jérôme Amiaud^{1,2}, Anne Gomez-Brouchet⁴, Vincent Potiron^{5,6}, François Gouin⁷, Philippe Rosset⁸, Louis-Romée Le Nail⁸, Luciano Vidal^{1,9}, Helios Bertin^{1,2,10}, Régis Brion^{1,2}, Guillaume Tran³, Franck Verrecchia^{1,2}, Isabelle Corre^{1,2}, and Françoise Redini^{1,2}

Affiliations

¹ *Nantes University, INSERM UMR 1238, Nantes, France*

² *Faculty of Medicine, University of Nantes, Nantes, France*

³ *Department of Orthopedics, University Hospital Center Hôtel Dieu, Nantes, France;*

⁴ *Department of Anatomical Pathology, University Hospital Center of Purpan, Toulouse, France*

⁵ *CRCINA, INSERM, University of Angers, University of Nantes, Nantes, France*

⁶ *Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, France*

⁷ *Department of Surgery, Léon-Bérard Center, Lyon, France*

⁸ *Department of Orthopedics, Trousseau University Hospital Center, Tours, France*

⁹ *Ecole Centrale Nantes, Rapid Manufacturing Platform, GEM UMR 6183 CNRS Laboratory, Nantes, France*

¹⁰ *Department of Maxillofacial Surgery, University Hospital Center Hôtel Dieu, Nantes, France*

Running title: Vascular signature in osteosarcoma

Acknowledgments:

We wish to thank the MicroPicell platform (Stéphanie Blandin, Steven Nedellec, and Philippe Hulin). This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale, FRM grant number DEA20150633177 awarded to Vincent Crenn. Experimental Therapeutic unit (Guylène Hamery, UTE Phan, IRS-UN, 8 quai Moncoussu, BP70721, 44007 Nantes Cedex 1).

Address correspondence to:

Vincent Crenn, MD, Laboratoire Phy-OS, Sarcomes osseux et remodelage des tissus calcifiés, Inserm UMR1238 Inserm/Univ, Nantes

E-mail: vincent.crenn@chu-nantes.fr

Declaration of conflicts of interest: No

Abstract: Predicting a response of osteosarcoma patients to chemotherapy, such as doxorubicin or high-dose methotrexate cocktail, remains a challenge in the clinic. Moreover, the prognostic value of currently used necrosis analysis is debatable. New markers of the therapeutic response or the prognostic response are urgently needed. The microenvironment plays a key role in the vascularization of highly heterogeneous tumors. Using the syngeneic MOS-J mouse model of osteosarcoma, We focused our study on the immunohistochemistry of tumor vascularization in order to identify new vessel markers, and to search for potential markers of the therapeutic response. Endomucin+, CD31+, and α -SMA+-positive elements were quantified in control (n=6) and doxorubicin-treated (n=6) mice in three different intra-tumor locations. We also used co-labeling to assess CD31+/Endomucin+ and CD31+/ α -SMA+ co-expression. We identified a central tumor zone with a low vascularization profile for all of these markers. We identified two distinct types of vessels: CD31+/Endomucin+ vessels with a sprouting, neo-angiogenic, interlaced appearance, and CD31+/ α -SMA+ vessel with a well-defined, mature structure. Doxorubicin appeared to reduce CD31+ expression in the tumor invasion front. In the doxorubicin-sensitive model, there were four times more CD31+/ α -SMA+ elements than in the poorly responsive model. Therefore, we propose a methodology based on immunohistochemistry and multiplexed immunofluorescence to use endomucin as a promising new vascular marker in the osteosarcoma model. Moreover, our results suggest that CD31+/ α -SMA+ vessels could be considered to be indicators of vasculature normalization and they may be used as specific markers of a good therapeutic response.

Keywords: Osteosarcoma, microenvironment, vascularization, chemotherapy, CD31, endomucin, α -SMA, immunohistochemistry, immunofluorescence, multiplexing

Introduction

Osteosarcomas (OS), which are derived from mesenchymal bone cells, represent the most common type of malignant primary bone tumor. The annual incidence of osteosarcoma in the general population is 5 cases per million (1). This tumor type has several histological subtypes (2) (osteoblast, chondroblast, telangiectasia, etc.), as well as a high degree of intratumor histological heterogeneity (3,4). The prognostic factors for long-term survival described in the literature comprise the location and the size of the tumor, the presence of metastases, the response to chemotherapy determined by the Huvos and Rosen score, as well as on the quality of the tumor resection (5–7). Polychemotherapy, before and after carcinologic surgery, is the treatment of choice and associates different drug cocktails depending on the patient's age (high-dose methotrexate, doxorubicin, ifosfamide, cisplatin, etc.) (8). Despite these protocols, OS survival rates have not improved for approximately 40 years, with a 5-year survival of approximately 75% for localized forms and 25% for metastatic disease (9). Moreover, 25% of the patients who respond well to chemotherapy as estimated by the Huvos/Rosen score relapse (10).

Using a preclinical model of OS, we previously demonstrated the tumor environment can play a role in the response to chemotherapy (11). In the syngeneic MOS-J mouse model, we observed a better anti-tumor response to doxorubicin chemotherapy when the tumor was located at an intraosseous site, whereas the tumors appeared to be refractory to the drug when they developed in paratibial areas in close contact with the periosteum and soft tissues. This result was linked to a clinical hypothesis: patients have a good or poor response to chemotherapy depending on the tumor localization in soft or bone tissue extensions. As doxorubicin is a key treatment of OS for patients over the age of 18, understanding and identifying good response predictors seems crucial. This difference in the therapeutic response according to the environmental context is a key factor in the mechanisms of resistance in clinical oncology. Several aspects of the microenvironment have been reported: the role of immunity and inflammation, supporting tissue, and vascularization. The bone microenvironment is indeed highly specialized, with a complex and dynamic environment involving different components: bone cells (osteoclasts, osteoblasts, osteocytes),

stromal cells (MSCs, fibroblasts), immune cells (macrophages, lymphocytes), mineralized extracellular matrix (ECM), and vascular cells (endothelial cells and pericytes) (12).

The tumor vasculature is largely determined by angiogenesis. This process is a hallmark of cancer, and the angiogenic switch is one of the main underlying factors of tumor growth (13). Compared to the normal vasculature, the tumor vascular network is rather immature and dysfunctional. Therefore, it impacts the microenvironment, resulting in hypoxia, acidosis, and glucose starvation, as well as decreasing immune cell infiltration and activity, all of which enable cancer progression, metastasis, and drug resistance. Poor perfusion and an immature tumor vasculature prevent drugs from reaching tumor cells at a lethal concentration (14). The distribution of chemotherapy drugs in tumor tissues depends on the plasma pharmacokinetics, but the abnormal architecture and functionality of the tumor vessels do not allow optimal distribution of chemotherapeutic agents (15). These considerations lead to a double-edged sword in therapies when addressing the tumor vasculature: on one hand, blocking neo-vascularization with anti-angiogenic agents to limit tumor expansion, and, on the other hand, preserving functional vessels to deliver drugs in direct contact with the tumor (16).

The vasculature of normal bone during growth has recently been described by Adams's team (17–19), with the characterization of endomucin+ CD31+ type-H vessels in the metaphysis in contact with osteoprogenitors, and type L vessels in the diaphysis. Regarding OS, a detailed characterization of the tumor vascular compartment is lacking and it remains largely unexplored. Drug distribution to the tumor can be considered to be an important factor in poor responses to chemotherapy (15). There is, therefore a need to focus on OS vascularization. In this context, we analyzed the vascular network of the OS environment in the syngeneic MOS-J orthotopic mouse model of OS, with and without treatment with the chemotherapeutic drug doxorubicin. We examined different areas (invasion front, direct bone contact, and tumor center) in order to refine the analysis of the vascularization architecture according to the geography and to take into account the high degree of heterogeneity of the tumor. We studied expression of the vascular markers CD31, endomucin, and α -SMA by IHC staining. We then studied the distribution of CD31+/Endomucin+ and CD31+/ α -SMA+ elements by immunofluorescence multiplexing. We also

hypothesized that the tumor vascular signature could be modified by exposure to doxorubicin and that it can also be an indicator of the response to chemotherapy, discriminating good versus poor responders.

Materials and Methods

Cell culture:

The murine MOS-J osteosarcoma cell line was developed from a spontaneous OS in the C57BL/6J mouse strain. All of the experiments were performed under sterile conditions using a vertical laminar flow hood (PSM Securipius, Astec, France). The cells were grown in 25, 75, or 175 cm² flasks (Falcon™, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, BioWhittaker, Verviers, Belgium) culture medium supplemented with 5% FCS (Fetal Calf Serum, HyClone™, Perbio, Vigneux, France). Plates were seeded at a density of 10⁴ cells/cm² and were then incubated in a saturated-humidity atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. For subculturing, the cells were detached at confluence with a solution of trypsin-EDTA [BioWhittaker, Trypsin: 0.5 g/L; EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid): 0.5 g/L]. The trypsin was neutralized by adding FCS (10% in the culture medium) and the cells were then centrifuged at 1,600 rpm for 5 minutes. Cell counts were performed using a Malassez chamber. When cell amplification was required for in vivo experiments, the MOS-J cells were detached when they were 70-80% confluent in order to achieve optimal comparable growth rates from one procedure to the next.

Murine Model:

The animal experiments were carried out at the Experimental Therapeutics Unit (Nantes Medical School; accreditation number D-44045) in accordance with protocols approved by the Regional Committee for Ethics in Animal Experimentation (ECAE n° 6) and the Department of Agriculture, under the

direction of the investigators authorized to perform the experiments. Four-week-old male C57BL/6J mice bred by Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) were used. For each experiment, one week of adaptation of the animals to the environment was necessary before starting the procedure. MOS-J tumor cells were injected into various sites according to the template. All of the tumor cell injections were performed under general anesthesia (isoflurane 1.5% with air at 1 L/min) after disinfection with Betadine. All of the injections were performed within one hour of having harvested the cells. Preliminary experiments were performed to determine the optimal cell number to achieve reproducible kinetics and optimal growth.

Paratibial and intraosseous injections of MOS-J tumor cells were performed as described previously (11). Briefly, for paratibial injection: $3 \cdot 10^6$ MOS-J cells were injected percutaneously into the middle diaphyseal tibia after periosteal denudation. Intraosseous injections were performed after a sub-centimetric inferio-lateral incision of the tibial tuberosity in order to expose the bone: the cortical bone was pierced with a needle by a rotational movement and then $3 \cdot 10^6$ MOS-J cells were injected. Doxorubicin treatment was initiated when the average tumor volume in one group exceeded 100 mm^3 as describe in the literature (11,20,21). The intravenous injections were all performed biweekly in $50 \mu\text{l}$ of PBS with a solution of doxorubicin 4 mg/kg . The control group received injections of $50 \mu\text{l}$ PBS.

Histological characterization:

Murine osteosarcoma models and sectioning

Three samples (from a group of six mice with median tumor volume) for each of the four groups were included in the study. The specimens were fixed in 4% formaldehyde for 24 hours, dissected, fixed another day at 4°C and decalcified in 4.13% EDTA, 0.2% paraformaldehyde, in 1X PBS buffer (pH 7.4) for 10 to 15 days at 50°C in a KOS microwave tissue processor (Milestone, MI, USA). The decalcified samples were then dehydrated by immersion in graded ethanol baths, cleared with 2-butanol, and embedded in paraffin. Ten serial $5\text{-}\mu\text{m}$ thick sections were cut from each sample at four levels separated by $250 \mu\text{m}$ in order to account for the tumor heterogeneity. The three first sections (sections 4-6) were

immunostained for α -SMA, endomucin, and CD31 markers, while section 3 was triple-immunostained for CD31 and both endomucin and α -SMA markers.

Chromogenic immunohistochemistry

The sections were deparaffinized and subjected to 20 h of antigen retrieval in Tris-EDTA buffer (1 mM Tris, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) at 60 °C. The endogenous peroxidase activity was then blocked by incubating the sections with 3% H₂O₂, and non-specific binding was blocked with 2% normal donkey serum and 1% BSA in 1X Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20, pH 7.4. Sections 4 to 6 of each of the four levels were then immunostained for CD31 (section 4), endomucin (section 5), and α -SMA (section 6), respectively. Briefly, after blocking, the sections were incubated for one hour at room temperature with rabbit anti-CD31 antibody (1:50; Abcam, ab28364), rat anti-endomucin antibody (1:50; Abcam, ab106100), and mouse anti- α -SMA antibody (1:3,000; R&D Systems, MAB1420). Immune complexes were visualized by the conventional ABC method using biotinylated donkey anti-rat (Jackson ImmunoResearch, 712-065-153), or donkey anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, 715-065-151), or donkey anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch, 711-065-152) secondary antibodies for 45 min followed by incubation with HRP (horseradish peroxidase)-streptavidin (Agilent, P0397) for another 45 min at room temperature. After staining with DAB liquid QUANTO substrate (MM France, F/TA-125-QHDX), the sections were counterstained with Gill-2 hematoxylin, dehydrated, cleared, and mounted with PERTEX® mounting medium (MM France, F/00811) and covered with a coverslip.

Triple-color immunofluorescence histochemistry

As for the chromogenic immunohistochemistry procedure, the sections were deparaffinized, subjected to 20 h of antigen retrieval in Tris-EDTA buffer (1 mM Tris, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) at 60 °C, and blocked with 2% normal donkey serum and 1% BSA in 1X Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20, pH 7.4, to reduce non-specific binding. Sections 3 were immunostained with both rabbit anti-CD31 (1:40), rat

anti-endomucin (1:50), and mouse anti- α -SMA (1:1,000) antibodies for an hour at room temperature. After three washes in 1X TBS-Tween 0.05%, pH 7.4, the following secondary antibodies were applied for another hour: Alexa Fluor® 488-conjugated donkey anti-rabbit (1:200; Jackson ImmunoResearch 711-545-152), biotinylated donkey anti-rat (1:200; Jackson ImmunoResearch 712-065-153), and Alexa Fluor® 647-conjugated donkey anti-mouse (1:200; Jackson ImmunoResearch 715-605-150). Finally, the sections were incubated with Cy3-conjugated streptavidin (1:400; Jackson ImmunoResearch 016-160-084) for one hour, and the nuclei were counterstained with DAPI (1:1,000; Thermo Fisher Scientific, D1306) and mounted with ProLong™ Gold Antifade reagent (Thermo Fisher Scientific, P36930) and covered with a coverslip.

Imaging and histomorphometry

Confocal images were obtained by using a Nikon AI N-SIM confocal microscope and subsequently treated by smoothing and noise reduction of each channel, followed by a Z-projection treatment using ImageJ software (22).

All of the histomorphometric analyses were conducted on scans of the immunostained sections. Acquisitions of sections 4-7 were made with a NanoZoomer Slide Scanner (Hamamatsu, Japan), and the images were then saved using NDP viewer software (Hamamatsu, version 2.2.6) at 5x magnification and exported at 10x using tiff format and analyzed with ImageJ software. Each of the chromogenically immunostained sections was individually analyzed on three specific regions of interest (ROI): one was defined by a representative 0.5-mm thick ROI for which the tumor tissue was along the bone; the other was a full representative picture of the core of the tumor; the last one was defined by a representative 0.5-mm thick ROI that contained the tumor invasion front. All of the analyses were carried out on each of the four levels of all of the samples. Briefly, the images were subjected to color deconvolution using the 'H-DAB' vector (23), thresholded, and non-specific noise was reduced. The results are presented as the mean value for each compartment of the number of positive elements per square millimeter.

For the triple-immunostained sections (section 3), the analysis was achieved using two levels that were considered, according to the results of those that had been obtained with the chromogenically immunostained sections, to be enough to yield consistent values. Quantification of the CD31+/ α -SMA+ (mature vessels) and the CD31+/Endomucin+ (sinusoidal vessels) elements was carried out using a virtual microscope (NDP viewer) at a selected magnification of 20x on a representative field of 0.366 mm². Double-positive vessels were counted in the same manner as described above in the different compartments by selecting the two fluorochrome channels corresponding to the two markers of interest. The results are presented as the mean value of each level of each sample of double-positive elements per square millimeter.

Statistical Analysis:

The data were collected and analyzed using GraphPad Prism 7 software. Analysis of the results of the in vivo experiments between more than two distinct populations was performed by one-way (only one condition tested) or two-way (two conditions tested) tests by applying the correction of the Šidák test for multiple comparisons. When two distinct groups were compared, we used the *t*-test with the Holm-Šidák correction method for multiple comparisons. The standard deviations are shown as numbers. The alpha risk for all these tests was set at 5%, with a significance of $p < 0.05$.

Results

Effect of doxorubicin on the vascular signature in the OS mouse model

Validation of the effects of doxorubicin on primary tumor growth

We determined the effect of doxorubicin on tumor growth in the OS MOS-J mouse model, irrespective of the site of tumor initiation. Administration of doxorubicin started on Day 12 after tumor cell

injection (Figure 1). As shown in Figure 1, no significant difference was observed for up to 26 days between the doxorubicin-treated and non-treated groups, although tumor volumes significantly decreased in the treated groups compared to the non-treated groups at 26 and 28 days (mean of the difference at 26 days: 196.2 mm³, 95% CI [70.82 to 321.5], p < 0.001, at 28 days: 293.9 mm³, 95% CI [168.6 to 419.3], p < 0.001) (Student's multiple t-tests).

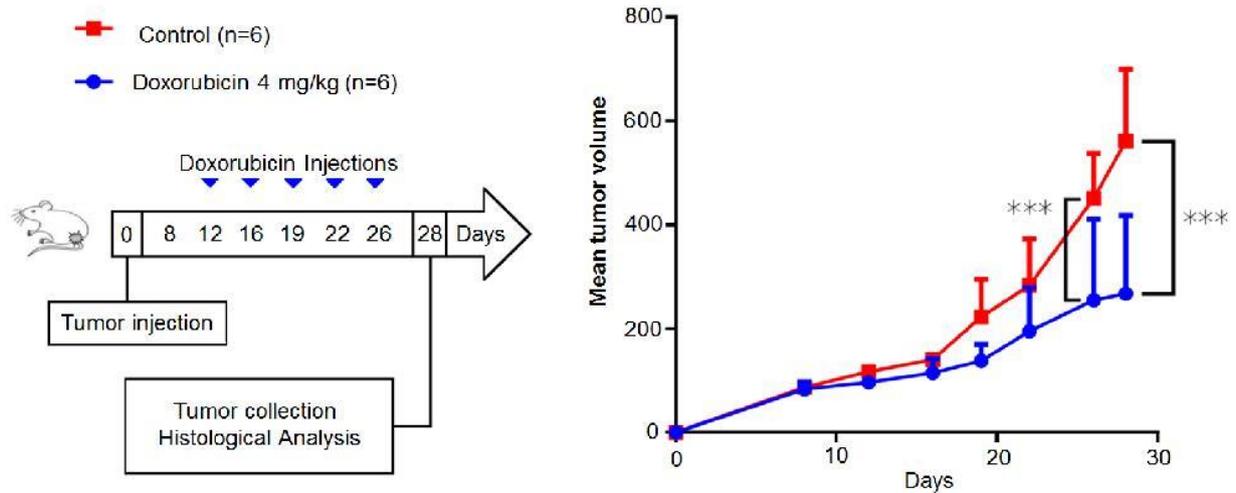


Figure 1. Effects of doxorubicin on MOS-J tumor growth. Injections of 4 mg/kg doxorubicin started at D12 and were repeated every 2 or 3 days. The tumor volumes were measured and expressed in mm³. The results are expressed as means \pm the SD. n=6 in each group. Student's multiple t-tests. Threshold of significance: p ***: \leq 0.001.

Vascular markers in OS tumors in non-treated mice

We analyzed the vascular markers in the non-treated OS tumors. The selected markers were CD31, an endothelial marker; endomucin, which is expressed more specifically in high endothelial venules and in H-type vessels in bone; and α -SMA, which is a mural cell (pericyte and vascular smooth muscle cell) marker (17,18,24). We decided to analyze CD31-positive (CD31+) and endomucin-positive (Endomucin+) elements, as they represent key endothelial structures of bone vasculature (17, 18). α -SMA

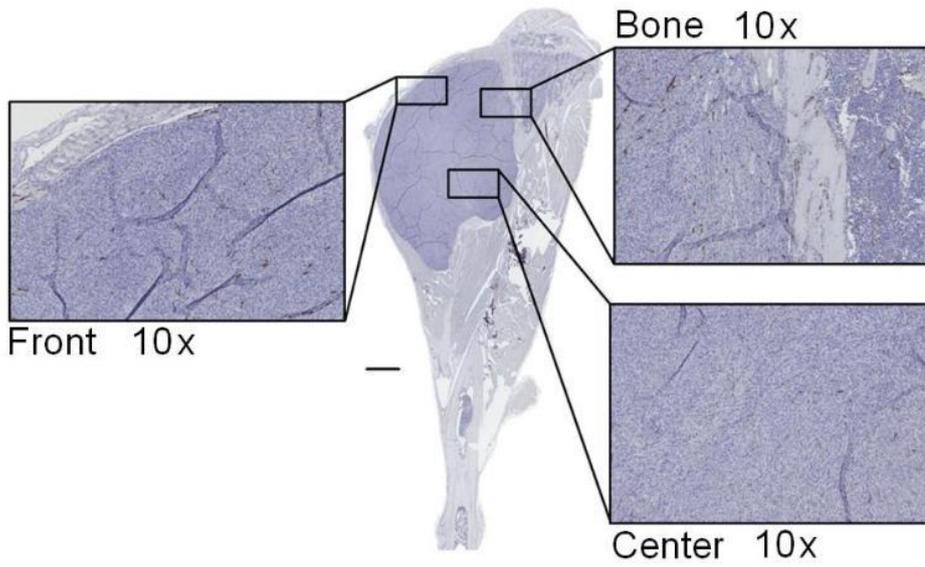
positive (α -SMA+) staining was also chosen as it is linked to L-type vessels, which have been described in detail in the vascularization of bone (17,19,25). α -SMA+ is a well-known marker of vascular maturity, with pericyte coverage of endothelial structures (25–27).

Our analysis aimed to integrate the cellular and the architectural features specific to bone tumors, and we, therefore, defined three geographic tumor areas in our study: the bone contact area with its periosteum, which is a niche for stem cells and vascularization (28–30) near the osteoblastic and osteoclastic activities; the invasion front, with potential leader cell phenotypes and highly proliferative capacities in direct contact with soft tissue (31,32); and the tumor center, which usually represents most of the necrotic area, with ischemic and metabolic features that are potential barriers for drug spread (11) (Figure 2A). Analysis of the vascular markers according to the different areas showed that endomucin+ elements/mm² were more abundant in the bone contact region compared to the lesion center (Figure 2B) (237.70 ± 77.58 vs. 130.20 ± 20.83 , respectively, $p = 0.017$). More CD31+ elements/mm² (136.50 ± 44.61 vs. 357.1 ± 180.97 , $p = 0.002$) and more α -SMA+ elements (90.32 ± 57.74 vs. 256.30 ± 92.31 , $p = 0.029$) were detected in the invasion front compared to the lesion center.

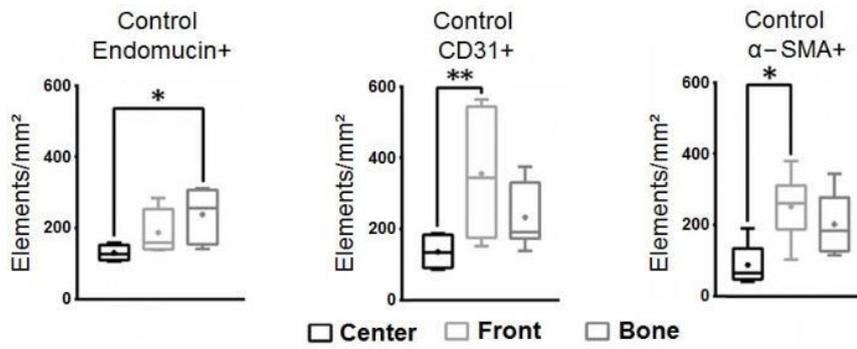
Expression of the vascular markers in OS tumors of doxorubicin-treated mice

In order to determine whether doxorubicin exposure could have an impact on the expression of vascular markers, we performed the same analysis on tumors from mice treated with doxorubicin. A significant decrease in CD31+ elements was observed in the invasion front (357.1 ± 73.88 elements/mm² in the control group vs. 125.2 ± 22.95 in the treated group, ($p = 0.031$)), but not in the center nor in the bones of either group. There was also no significant difference in the number of endomucin+ or α -SMA+ elements between the control and the treated groups (Figure 2C).

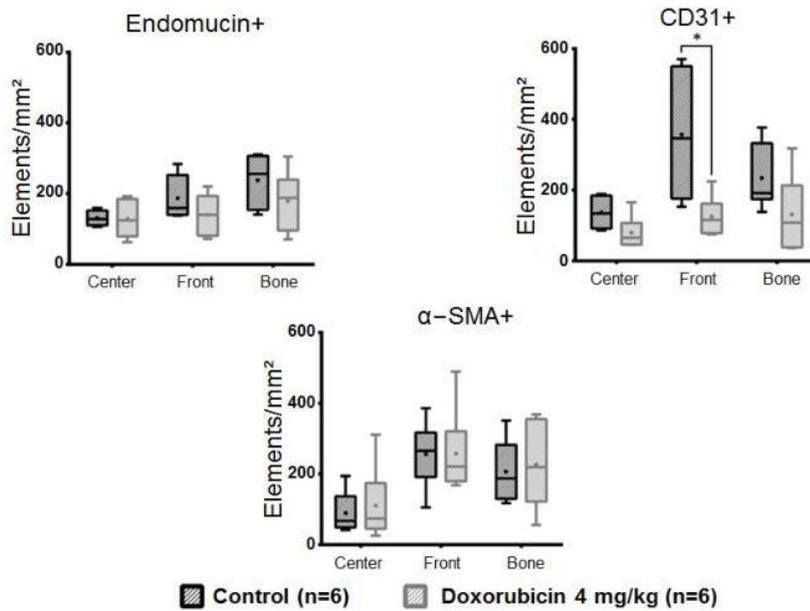
Altogether, these results suggest that doxorubicin treatment is associated with a lower number of CD31+ elements in the invasion front of the tumor.



A



B



C

Figure 2. Vascular signature in the OS model determined by IHC staining. A: Expression of endomucin in distinct tumor areas (Front: invasion front; Bone: bone contact; Center: lesion center) evaluated by IHC staining. Image of an entire mouse leg (10x magnification; control group), the scale bar = 1 mm; B: Histological analysis of endomucin, CD31, and α -SMA vascular markers in the control group. One-way ANOVA analysis, Thresholds of significance: *: [0.05; 0.01], **: [0.01; 0.001]; C: Effects of doxorubicin on the vascular signature in the selected tumor areas (Front: invasion front; Bone: bone contact; Center: lesion center). Box-plot with the minimal and the maximal values. The mean value is indicated by a dot. Two-way ANOVA analysis, Thresholds of significance: *: [0.05; 0.01], **: [0.01; 0.001].

Analysis of the vascular network in tumors of non-treated and doxorubicin-treated mice

In order to obtain a more comprehensive view of the vascular network, we performed a multiplexed analysis to determine the CD31+/Endomucin+ and the CD31+/ α -SMA+ elements, which are indicators of bone H-type vessels and mature vessels, respectively.

Confocal microscopy imaging (Figure 3) allowed for higher magnification and more precise visualization of the morphology of the CD31+/Endomucin+ and the CD31+/ α -SMA+ elements presented in Figure 4. Overall, the CD31+/ α -SMA+ elements were well-defined, with a CD31+ endothelial inner part, and an α -SMA+ external mural/pericyte wall. They exhibited a structured and straight architecture, with a sizeable diameter, and they resembled mature vessels. On the other hand, the CD31+/Endomucin+ elements were much more sinusoidal, with a more serpiginous and unorganized structure. They also had a smaller diameter and they resembled immature sinusoidal vessels.

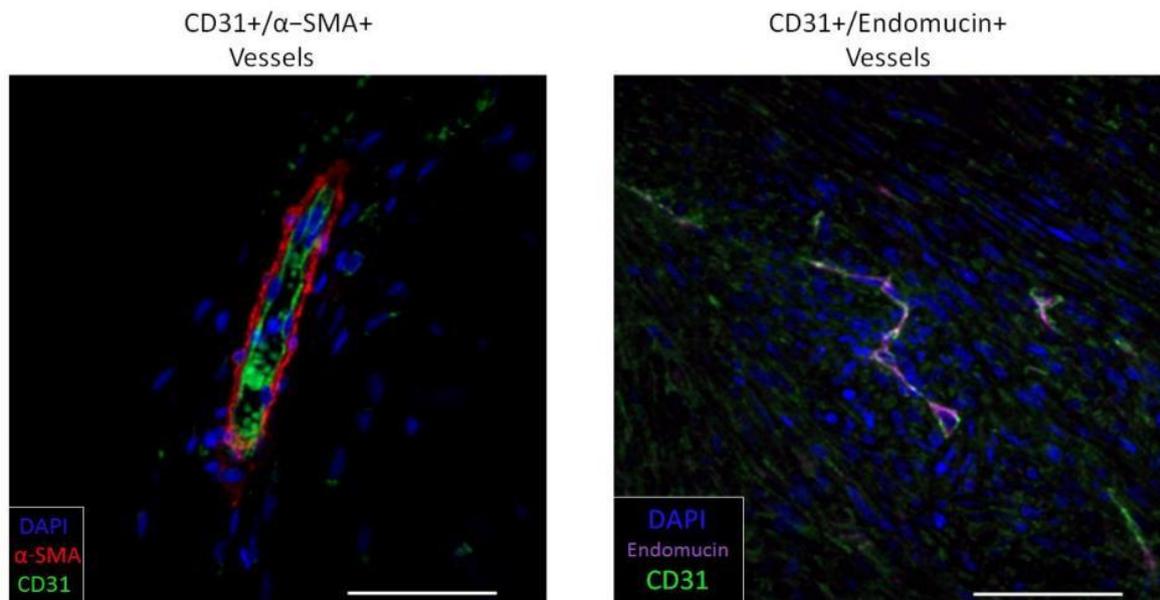


Figure 3: Confocal analysis of CD31+/α-SMA+ and CD31+/Endomucin+ co-staining in a control center lesion. A: CD31+/ α-SMA+ elements. **B:** CD31+/Endomucin+ elements. The images are Z-stack projections at 63x magnification, the scale bars = 20 μm. DAPI: nuclear staining.

In the control group, more CD31+/α-SMA+ vessels were observed in the invasion front compared to the lesion center (6.30 ± 2.16 elements/field vs. 2.08 ± 0.77 elements/field, respectively, $p = 0.034$) (Figure 4A). No significant differences were observed between the control and the doxorubicin-treated groups in the terms of the distribution of CD31+/Endomucin+ and the CD31+/α-SMA+ elements between the three different defined areas (Figure 4B).

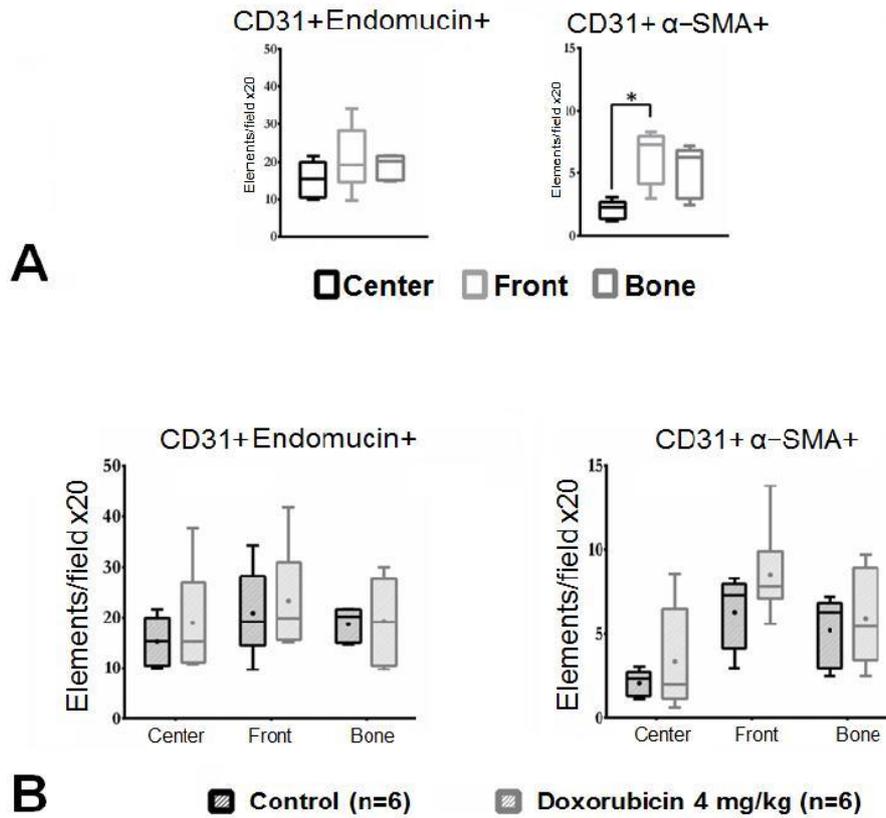


Figure 4: Vascular signature in the OS model determined by immunofluorescence double-staining of CD31+/Endomucin+ and CD31+/α-SMA+. Quantification of CD31+/Endomucin+ and CD31+/α-SMA elements/field in defined tumor areas (center, front, bone) A: in the control group. B: in the control and the doxorubicin-treated group. Quantification was defined as elements/field at 20x magnification (lesion center, invasion front, and bone contact). Box-plot with the minimal and the maximal values, the mean value is indicated by a dot. Threshold of significance: $p < 0.01$.

Impact of the initial site of the tumor development on the vascular signature in treated mice

We then investigated whether the site of initiation of the tumor, namely paratibial vs. intraosseous, could impact the vascular signature of doxorubicin-exposed mice. To do so, we dichotomized the animal groups depending on their site of tumor injection. Analysis of the CD31+/α-SMA+ staining revealed that more CD31+/α-SMA+ elements were present in the treated tumors in the intraosseous model compared to the paratibial model (5.52 ± 3.23 elements/field vs. 1.27 ± 0.59 , respectively, $p = 0.044$, unpaired one-sided *t*-test) (Figure 5A and B).

Figure 5: A: Vessel co-staining by immunofluorescence multiplexed for CD31+/ α -SMA+ (20x magnification), the scale bar = 100 μ m. Images of control and doxorubicin-treated tumors for the paratibial and the intraosseous models. B: Histological analysis of doxorubicin-treated mouse vessels visualized by multiplexed CD31+/ α -SMA+ immunofluorescence co-staining for the paratibial and intraosseous models. Quantification of elements/field at 20x magnification in the tumor center. Box-plot with the minimal and the maximal values, the mean value is indicated by a dot. Thresholds of significance: *: [0.05; 0.01]. Unpaired *t*-test one-sided. C: Increase in the average osteosarcoma volume in mice treated with doxorubicin (4 mg/kg), depending on the tumor initiation site (PT: Paratibial; IO: Intraosseous). The treatment was introduced at D12. Thresholds of significance: *: [0.05; 0.01], **: [0.01; 0.001], ***: ≤ 0.001 . Student's multiple *t*-tests.

In regard to the tumor response to doxorubicin, significant differences were observed at Day 22, 26, and 28 depending on the tumor injection site (Figure 5C). In the intraosseous model, a better response to chemotherapy was observed compared to the paratibial model, with a mean volume difference of 222.83 mm³ at Day 28 (156.00 mm³ \pm 10.39 vs. 378.83 mm³ \pm 139.56, *t*-test; *p* < 0.001, Student's multiple *t*-tests). This analysis suggests that there were more CD31+/ α -SMA+ mature vessels in the center of the tumors that responded well to doxorubicin in the intraosseous group, thus highlighting a vascular profile associated with a better response to chemotherapy.

Discussion

One of the most critical limitations in OS treatment is the high rate of relapse following a poor response to chemotherapy (8). Predicting how each patient will respond to a specific chemotherapy regimen is a real challenge, and identifying factors predictive of a good response to better adjust chemotherapy protocols and improve OS survival rates remains an intensive field of research. Using a syngeneic mouse model of OS, we previously showed that the response to doxorubicin varies according to the site of tumor initiation (11). The complexity of the bone tumor microenvironment could explain these differences. Although still poorly explored in OS, the vascular component is important as, aside from being a key factor for drug distribution (14,33), it may also vary greatly depending on tumor angiogenesis and the nature of the tissue (17,19,34). Furthermore, general and local treatments are thought to interact with the tumor and its environment, leading to a remodeling of the vascular system and eventually a normalization of the distribution and maturity of the vessels, thus improving drug distribution by a virtuous cycle (14,35).

This study aimed to characterize the vascular environment in OS bone tumors and the effects of chemotherapy. Previously described in normal bone, we explored for the first time the expression of endomucin as a new vascular marker in bone tumor OS. Endomucin is an important endothelial marker in bone as it is highly co-expressed with CD31 in H-type vessels, which have been identified in various bone tissue locations such as the metaphysis near the growth plate and the endosteum. In normal growing bone, these vessels are responsible for mediating growth of the bone vasculature, maintaining perivascular osteoprogenitors, and coupling angiogenesis to osteogenesis (17,36). In the present study, we found that endomucin is also expressed in the syngeneic MOS-J model of OS, with fewer elements in the center of the lesion than in the area in contact with the bone. This is in agreement with the previous identification of abundant endomucin-positive elements in contact with active areas of bone remodeling (17–19).

A more detailed exploration of the vascular environment according to tumor territories was achieved by combining the endothelial markers endomucin and CD31 with the mural/pericyte marker α -SMA through a

novel approach involving fluorescent multiplex immunohistochemistry. CD31/ α -SMA-positive elements were significantly more abundant in the invasion front compared to the center of the tumor, in agreement with simple IHC staining showing an increase in CD31+ and α -SMA+ elements in this area. The confocal analysis highlighted the microvessel architecture and network organization. The CD31+/ α -SMA+ elements were generally well defined, with a CD31+ endothelial inner part and an α -SMA+ external pericyte wall. These elements had a structured and straight architecture with a sizeable diameter and they are defined as mature vessels in the literature (37). Pericytes support the structure and help stabilize blood vessels in addition to stimulating basement membrane production, thereby improving vasculature stability and permeability, which contribute to better tumor perfusion and hence the delivery of nutrients and O₂ as well as drugs and chemotherapy (38). Importantly, these vessels are more abundant in the invasion front of tumors in mice, which is an area with a high degree of tumor cell proliferation and a high requirement for O₂ and nutrients. In contrast, the CD31+/Endomucin+ vessels in MOS-J tumor mice were of a small caliber, sinusoidal, and not continuous. These features are typical of angiogenic tumor microvessels, which are tortuous, leaky, and not surrounded by pericytes, and hence exhibit poor perfusion. We suspect that they have poor overall perfusion that resists blood flow and drug delivery in tumors. These functional characteristics of the tumor vasculature contribute to an elevated tumor interstitial fluid pressure that opposes diffusion and convection, which is the main form of transvascular transport of therapeutic agents in tumors (37). These non-functional vessels may also underlie doxorubicin resistance mechanisms, as a low degree of pericyte coverage may compromise vessel structure and functionality (39). These anarchic vessels differ from the bulky and functional CD31+/ α -SMA+ vessels that can allow the diffusion of doxorubicin. Such characterization of vascular elements according to CD31, endomucin, and α -SMA co-staining have not been previously described in OS. Our methodology allowed us to clearly identify these two types of elements in different areas of the tumors, namely CD31+/Endomucin+ sprouting vessels and mature functional CD31+/ α -SMA+ vessels.

Importantly, our results show that doxorubicin decreased the number of CD31+ elements present in the invasive front, without affecting the α -SMA- or endomucin-positive elements or the double-CD31/ α -SMA-positive elements. It could illustrate a vascular pruning effect of doxorubicin, eliminating the most immature and unfunctional vessels first (CD31+, endomucin- and α -SMA-negative) (14). Altogether, these

results show that doxorubicin did not affect the repartition of CD31/ α -SMA and CD31/Endomucin elements in the tumor areas. Thus, doxorubicin treatment does not appear to drastically alter the vascular signature in MOS-J OS tumors.

Despite our small cohort, encouraging results were obtained by an initial dichotomization of the animals between good responders to doxorubicin (intraosseous site of initiation) versus poor responders (paratibial site of injection). Indeed, we found a significant difference in the CD31+/ α SMA+ mature vessels in the center part of the lesion, as they were four times more abundant in the good responding model compared to the poor responders (11). This is in keeping with good tumor perfusion and drug delivery to the tumors as a result of mature vessels. These results open important perspectives for exploration of the vascular signature as a predictor of responses, which is a major current limitation for patients and clinicians.

Despite our small sample number, our study suggests that the mature vessels defined as CD31+/ α -SMA+ elements, when they are present in the center of the lesion, may be considered to be markers of a good therapeutic response to doxorubicin. This hypothesis needs to be explored further by analysis of a larger cohort and at the stage of tumor initiation using a dynamic approach. Analysis of human bone biopsies should also be considered for this specific marker in order to determine its potential as a predictor of a good response.

Our study is one of the first to specifically study the vascularization of OS by a multiplexed IF approach using a mouse preclinical model. Our methodology appears to be suitable for analyzing CD31+/ α -SMA+ mature vessels with a pericyte coverage, as well as more immature CD31+/ α -SMA+ sprouts of vascularization. Furthermore, this study opens new perspectives to more extensively explore the vascular microenvironment in OS.

References

1. Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 2009; 152: 3-13.
2. Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma Anatomic and Histologic Variants. *AJCP* 2006; 125: 555-81.
3. Botter SM, Neri D, Fuchs B. Recent advances in osteosarcoma. *Curr Opin Pharmacol* 2014; 16: 15-23.
4. Gibbs CP, Levings PP, Ghivizzani SC. Evidence for the osteosarcoma stem cell. *Curr Orthop Pract* 2011; 22: 322-6.
5. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, et al. 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. *JCO* 2002; 20: 776-90.
6. Davis AM, Bell RS, Goodwin PJ. Prognostic factors in osteosarcoma: a critical review. *J Clin Oncol* 1994; 12: 423-31.
7. Friebele JC, Peck J, Pan X, Abdel-Rasoul M, Mayerson JL. Osteosarcoma: A Meta-Analysis and Review of the Literature. *Am J Orthop* 2015; 44: 547-53.

8. Gaspar N, Occean B-V, Pacquement H, Bompas E, Bouvier C, Brisse HJ, et al. Results of methotrexate-etoposide-ifosfamide based regimen (M-EI) in osteosarcoma patients included in the French OS2006/sarcome-09 study. *European Journal of Cancer* 2018; 88: 57-66.
9. Results of methotrexate-etoposide-ifosfamide based regimen (M-EI) in osteosarcoma patients included in the French OS2006/sarcome-09 study. *European Journal of Cancer* 2018; 88: 57-66.
10. O'Kane GM, Cadoo KA, Walsh EM, Emerson R, Dervan P, O'Keane C, et al. Perioperative chemotherapy in the treatment of osteosarcoma: a 26-year single institution review. *Clinical Sarcoma Research* 2015; 5: 17.
11. Crenn V, Biteau K, Amiaud J, Dumars C, Guiho R, Vidal L, et al. Bone microenvironment has an influence on the histological response of osteosarcoma to chemotherapy: retrospective analysis and preclinical modeling. *Am J Cancer Res* 2017; 7: 2333-49.
12. Corre I, Verrecchia F, Crenn V, Redini F, Trichet V. The Osteosarcoma Microenvironment: A Complex But Targetable Ecosystem. *Cells* 2020; 9: 976.

13. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

14. Potiron V, Clément-Colmou K, Jouglar E, Pietri M, Chiavassa S, Delpon G, et al. Tumor vasculature remodeling by radiation therapy increases doxorubicin distribution and efficacy. *Cancer Letters* 2019; 457: 1-9.

15. Dewhirst MW, Secomb TW. Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue. *Nat Rev Cancer* 2017; 17: 738-50.

16. Clere N, Renault S, Corre I. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 747.

17. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* 2014; 507: 323-8.

18. Watson EC, Adams RH. Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; 8: a031559.

19. Sivaraj KK, Adams RH. Blood vessel formation and function in bone. *Development* 2016;

143: 2706-15.

20. Sommer K, Peters SO, Robins IH, Raap M, Wiedemann GJ, Remmert S, Sieg P, Bittner C, Feyerabend T. A preclinical model for experimental chemotherapy of human head and neck cancer. *Int J Oncol* 2001;18: 1145-9.
21. Ottewill PD, Mönkkönen H, Jones M, Lefley DV, Coleman RE, Holen I. Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1167-78.
22. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012 ;9: 671-5.
23. Landini G, Martinelli G, Piccinini F. Colour Deconvolution - stain unmixing in histological imaging. *Bioinformatics* 2020: btaa847.
24. Kanda H, Tanaka T, Matsumoto M, Umemoto E, Ebisuno Y, Kinoshita M, et al. Endomucin, a sialomucin expressed in high endothelial venules, supports L-selectin-mediated rolling. *Int Immunol.* 2004; 16: 1265-74.

25. Alarcon-Martinez L, Yilmaz-Ozcan S, Yemisci M, Schallek J, Kiliç K, Can A, Di Polo A, Dalkara T. Capillary pericytes express α -smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *Elife* 2018; 7: e34861.
26. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 2005; 7: 452-64.
27. Chang L, Scott MA, Meyers CA, James AW. Pericytes in Sarcomas and Other Mesenchymal Tumors. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1147: 109-24.
28. M C. [The periosteum: the « umbilical cord » of bone. Quantification of the blood supply of cortical bone of periosteal origin]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 1995; 96: 262-7.
29. Mahajan A. Periosteum: a highly underrated tool in dentistry. *Int J Dent* 2012; 2012: 717816.
30. Moore SR, Heu C, Yu NYC, Whan RM, Knothe UR, Milz S, et al. Translating Periosteum's Regenerative Power: Insights From Quantitative Analysis of Tissue Genesis With a Periosteum Substitute Implant. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5: 1739-49.

31. Yong KMA, Li Z, Merajver SD, Fu J. Tracking the tumor invasion front using long-term fluidic tumoroid culture. *Sci Rep* 2017; 7: 1-7.
32. Aw Yong KM, Ulintz PJ, Caceres S, Cheng X, Bao L, Wu Z, Jiagge EM, Merajver SD. Heterogeneity at the invasion front of triple negative breast cancer cells. *Sci Rep* 2020; 10: 5781.
33. Primeau AJ, Rendon A, Hedley D, Lilge L, Tannock IF. The Distribution of the Anticancer Drug Doxorubicin in Relation to Blood Vessels in Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8782-8.
34. Kusumbe AP. Vascular niches for disseminated tumour cells in bone. *J Bone Oncol* 2016; 5: 112-6.
35. Clément-Colmou K, Potiron V, Pietri M, Guillonneau M, Jouglar E, Chiavassa S, et al. Influence of Radiotherapy Fractionation Schedule on the Tumor Vascular Microenvironment in Prostate and Lung Cancer Models. *Cancers (Basel)* 2020; 12.
36. Xie H, Cui Z, Wang L, Xia Z, Hu Y, Xian L, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces CD31^{hi}Emcn^{hi} vessel subtype in coupling osteogenesis. *Nat Med* 2014; 20: 1270-

8.

37. Bhattacharya A, Seshadri M, Oven SD, Tóth K, Vaughan MM, Rustum YM. Tumor Vascular Maturation and Improved Drug Delivery Induced by MethylSelenocysteine Leads to Therapeutic Synergy with Anticancer Drugs. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3926-32.

38. Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* févr 2002; 2: 83-90.

39. Ribeiro AL, Okamoto OK. Combined effects of pericytes in the tumor microenvironment. *Stem Cells Int* 2015; 2015: 868475.

Discussion

Cette première approche de l'environnement vasculaire dans ce travail est originale dans le cadre de l'ostéosarcome.

Notre approche pilote s'est focalisée sur 3 marquages préférentiels : le CD31, l' α -SMA, et l'endomucine, choisis dans la mesure où ils offrent un panorama assez complet des composants vasculaires : ils ciblent l'endothélium (CD31) mais également l'enveloppe péricytaire par l' α -SMA; le marquage de l'endomucine a aussi été étudié pour sa présence dans les vaisseaux H et L, et pour son caractère original encore non exploré dans la vascularisation de l'ostéosarcome. Nous avons voulu illustrer et identifier les différences d'expression du réseau vasculaire de l'ostéosarcome à deux différents niveaux :

- au niveau d'une même tumeur, en utilisant des niveaux de coupes espacées de plusieurs centaines de microns.
- au niveau de différentes régions, aux environnements et activités variables. Ce dernier point nous semblait important pour tendre à une analyse la plus précise possible, tenant compte de l'hétérogénéité intra-tumorale.

Au sein de la tumeur nous avons ainsi identifié plus d'éléments positifs pour le marquage à l'endomucine au contact de l'os, en accord avec les données de la littérature (Figure 44) (Peng et al., 2020). Nous ne retrouvons en revanche pas de différence significative en terme de co-marquage CD31+/Endomucine+ en immunofluorescence entre l'interface os/tumeur et les autres zones d'intérêt.

L'effet de la Doxorubicine analysé sur la répartition d'éléments vasculaires a mis en évidence une modulation de marquage du CD31+, témoin de l'impact de la réponse thérapeutique sur la vascularisation tumorale, avec une diminution du nombre d'éléments positifs pour le CD31 chez les souris traitées.

L'analyse de l'environnement vasculaire a ainsi permis d'identifier deux types de co-marquages, pour deux types de vaisseaux, de morphologie, mais aussi de taille différente. Les vaisseaux positifs pour CD31 et α -SMA (CD31+/ α -SMA+), d'allure matures, fonctionnels, et de grand diamètre sont présents en faible quantité comparativement aux vaisseaux co-marqués par l'endomucine et le CD31.

Ces derniers sont de petite taille, serpentineux et désorganisés, et sont observés en densité importante. Ces vaisseaux pourraient correspondre à des médio-capillaires qui n'expriment pas habituellement α -SMA, ils pourraient aussi être associés à des mécanismes de néo-angiogenèse tumorale. D'autres analyses plus complètes, utilisant par exemple d'autres marqueurs sont nécessaires sur ce point (NG2, desmine...). Des techniques d'immunofluorescence sur tissus congelés permettraient également une analyse tridimensionnelle plus complète du réseau vasculaire et de ses intrications architecturales, avec une épaisseur de coupe supérieure.

Nos résultats montrent que les vaisseaux CD31+/ α -SMA+ sont d'avantage présents dans les tumeurs traitées par Doxorubicine dans notre modèle intra-osseux de bonne réponse à la chimiothérapie que dans le modèle para-tibial mauvais répondeur. Nous ne retrouvons pas de différence dans les groupes contrôles avec ce co-marquage. Cette répartition pourrait être témoin d'un phénomène de normalisation vasculaire, avec une augmentation de la couverture pericytaire en lien avec la bonne réponse à la chimiothérapie.

Pour le co-marquage CD31/Endomucine nous ne retrouvons pas de différence d'expression dans nos sous-groupes.

Critiques et limites

Malgré des résultats intéressants concernant l'exploration de l'environnement vasculaire de l'ostéosarcome, notre étude souffre de plusieurs limites.

Limite de l'effectif

Le faible effectif issu de blocs paraffinés d'une expérience précédente est un compromis. Nous avons effectivement privilégié une approche sur une cohorte limitée dans le cadre de ces travaux préliminaires, ce qui nous a permis d'identifier des tendances, mais aussi de valider la méthodologie en IHC de notre analyse. Ces échantillons issus de travaux précédents ont autorisé une exploration rapide de ces marquages.

Nous avons ainsi sélectionné 12 échantillons, issus de tumeurs de taille médiane, correspondant à des sous-groupes exposés à la Doxorubicine comparativement à des animaux contrôles non traités. Une seconde dichotomie existe au sein de cet effectif entre les modèles de « bons répondeurs » (intra-osseux) et de « mauvais répondeurs » (para-tibial). Ce point doit aussi être noté, car nous avons dans notre analyse initiale du réseau vasculaire, mélangé nos modèles (intra-osseux et para-tibial), afin d'obtenir une photographie sans à priori de la micro-vascularisation osseuse tumorale. Ceci peut cependant biaiser nos résultats globaux du fait de spécificités vasculaires propres à chaque modèle.

Nos analyses quantitatives en l'état sont donc sujettes à des fluctuations d'échantillonnage, mais aussi à des biais. Nous avons tenté de les limiter en intra-échantillon par la multiplication des niveaux de coupe espacés de plusieurs centaines de microns.

Des analyses sur un effectif plus élevé seraient souhaitables. On pourrait également proposer d'ajouter à cette étude le modèle intramusculaire développé par P. Kubicek, qui lui aussi répond très bien à la chimiothérapie ; il faudra cependant veiller dans ce cas à développer des protocoles de préparation des échantillons de coupe similaire, notamment en décalcification (Kubicek, 2018).

Choix des marqueurs

Notre choix de marqueur est restrictif et peut limiter notre analyse ; nous avons également étudié le marquage CD146, dont les résultats étaient quasi-transposables à ceux du CD31. Nous avons choisi de ne pas présenter ces résultats dans notre article, afin de ne pas alourdir notre analyse par des données comparables. Nous avons ainsi préféré nous focaliser sur le marqueur CD31 très utilisé dans la littérature, et notamment dans les travaux d'Adams *et al.* (Kusumbe et al., 2014; Sivaraj and Adams, 2016).

Il est souhaitable que des marqueurs complémentaires soient aussi inclus dans la suite de l'analyse afin de compléter et affiner cette cartographie de l'environnement vasculaire, son hétérogénéité et sa maturité dans l'ostéosarcome, comme le NG2 qui est un marqueur péricytaire, ou la desmine (présente sur les cellules musculaires lisses) qui peut être utilisée chez l'homme.

Stade d'analyse des marqueurs

L'analyse des tumeurs à un stade évolué nous a permis de valider les différences de cinétique tumorale et ainsi les différences de réponse à la chimiothérapie. Cependant cette analyse tardive de la tumeur à un volume de plusieurs centaines de mm³, efface probablement des spécificités tissulaires initiales du microenvironnement. Le processus de tumorigenèse, à un stade d'invasion avancé évolue dans des tissus moins nettement limités, très remaniés.

Une analyse à un stade plus précoce du développement tumoral, lors de l'initiation de la tumeur, encore bien limitée, permettrait sans doute de mieux identifier et comprendre les mécanismes vasculaires spécifiques en jeu et les interactions aux environnements de nos modèles. L'analyse d'une tumeur encore localisée strictement dans la cavité osseuse, ou dans la loge musculaire au contact du périoste pourrait permettre une analyse plus contrastée de nos marquages.

Analyse quantitative

Une des autres difficultés à laquelle nous avons été confrontés est la quantification en IHC, mais également pour le multiplexing en immunofluorescence. En effet, les techniques d'immunofluorescence posent le problème du décompte d'éléments. L'IHC permet de facilement mettre au point des algorithmes d'analyse de « macros », avec un comptage automatisé, nous avons utilisé ImageJ dans cette situation (Schneider et al., 2012). Des options de seuillage sont utilisées afin de définir le niveau d'intensité de marquage d'intérêt, ce qui implique néanmoins une certaine subjectivité. Concernant les analyses en multiplexing, nous n'avions pas d'outil automatisé mis au point, ainsi nous avons utilisé un comptage manuel d'éléments par champs, comparable à un comptage de mitoses à un grossissement donné. Cette méthode peut être critiquée, car une certaine part de subjectivité entre en jeu. Le développement d'un outil de comptage fiable est un point important afin d'obtenir des investigations quantitatives plus rigoureuses pour des analyses statistiques.

Perspectives :

Malgré ces limites, notre travail ouvre des perspectives de travaux complémentaires sur l'environnement vasculaire de l'ostéosarcome. Cet axe est encore peu exploré spécifiquement dans l'ostéosarcome, alors qu'il paraît être une des clés des mécanismes de distribution et de résistance aux traitements. Des outils pronostics semblent possibles dans ce contexte, ainsi que de potentielles cibles thérapeutiques.

Des axes complémentaires sont déjà prévus dans le cadre du Master 2 de Guillaume Tran en 2021-2022.

Modèle préclinique

De façon à confronter ou conforter nos résultats, il est nécessaire de réitérer nos analyses en modifiant certains points, afin de garantir une meilleure compréhension de la micro-vascularisation.

Une cohorte plus conséquente, dédiée à cette étude est nécessaire, en condition contrôle et sous traitement par Doxorubicine, en utilisant toujours le modèle syngénique MOS-J qui est facile d'utilisation, économique et reproductible (Joliat et al., 2002). A ce titre, le modèle intramusculaire, qui est un très bon répondeur à la chimiothérapie pourrait être un ajout intéressant aux modèles intra-osseux et para-tibial, de façon à disposer d'un panel de trois modèles aux réponses thérapeutiques croissantes (Kubicek, 2018).

Si nous souhaitons étudier l'impact prédictif d'éléments vasculaires, tels que les vaisseaux CD31+/ α -SMA+ sur la réponse à la chimiothérapie, il est important d'estimer plus précocement leur positivité. A ce titre une analyse plus précoce à plus faible volume tumoral permettrait d'évaluer en condition contrôle la présence d'éléments vasculaires spécifiques en fonction du site d'initiation tumoral. Une analyse dynamique de ces marquages est à prévoir, avec des analyses fractionnées en fonction du temps, de façon à prendre en compte d'éventuelles évolutions du microenvironnement vasculaire.

La fiabilité du comptage des éléments positifs pour les différents marquages doit également être améliorée, notamment par la mise au point d'une méthodologie de quantification reproductible.

Analyse sur biopsies humaines

Si les résultats précliniques se confirment, une analyse complémentaire sur échantillons humains est nécessaire. La recherche de la présence d'éléments positifs pour le marquage de l'endomucine, ou des co-marquages CD31+/ α -SMA+, CD31+/Endomucine+ est envisageable.

L'examen d'une éventuelle corrélation entre la présence de ces marqueurs et la survie devra être réalisée. Le lien avec l'apparition de métastases, ou la réponse histologique à la chimiothérapie devra également être étudié. Des travaux de mise au point des marquages utilisés dans notre étude sont d'ailleurs en cours sur des biopsies de tumeurs d'ostéosarcome au laboratoire PhyOs par une approche de marquage multiplexing Tyramide Signal Amplification.

Une analyse sur biopsie (TMAs) serait à privilégier du point de vue méthodologique dans un premier temps. Du fait des méthodes de fixation spécifiques et agressives des pièces d'exérèse tumorales opératoires, des difficultés sont à prévoir pour les analyses en IHC. Cependant il faudrait idéalement évaluer le réseau vasculaire et ses spécificités sur la biopsie, puis sur la pièce de résection tumorale avec des analyses différenciées en fonction des zones tissulaires sur les colonies cellulaires viables restantes.

Ces travaux permettraient de dégager de potentiels marqueurs pronostics qui pourraient s'ajouter à la batterie de test d'IHC décrite par Brouchet *et al.* (Gomez-Brouchet et al., 2017), et ainsi nous guider vers des thérapies personnalisées potentielles.

Conclusion

L'absence de progrès majeur dans le traitement de l'ostéosarcome depuis de nombreuses années encourage à étendre l'horizon de recherche thérapeutique. L'exploration du microenvironnement tumoral dans ce contexte est devenue une nécessité. Il englobe l'ensemble des interactions entre la tumeur et son hôte, et ce, par de très nombreux aspects. Son analyse pourrait offrir les clés de la compréhension des mécanismes de résistance au traitement, mais également de la tumorigenèse ou du processus métastatique. Ainsi les interactions avec l'os mais aussi la vascularisation sont cruciales pour la progression de l'ostéosarcome, et c'est dans ce contexte que nous avons mené ce travail.

L'approche préclinique a permis de confirmer le rôle majeur de l'environnement tissulaire sur la réponse à la chimiothérapie de l'ostéosarcome. De cette preuve de concept, nous tirons peu de certitudes, mais des outils pour des explorations à venir. En effet notre modèle de bon ou mauvais répondeur par initiation en site intra-osseux et para-tibial, pourrait nous permettre de comprendre et d'illustrer les mécanismes de réponse à la chimiothérapie mais aussi d'identifier des facteurs prédictifs à cette réponse.

Sur ces bases, nous avons pu explorer l'impact de RANKL, mais surtout l'importance du réseau vasculaire de l'ostéosarcome. En effet la micro-vascularisation a été peu étudiée dans l'ostéosarcome jusqu'à présent. Les analyses en co-marquage de CD31+/ α -SMA+, l'analyse de la présence d'éléments positifs au marquage pour l'endomucine, ou la méthodologie de recueil par zones tumorales sont à ce titre originales. Forts de nos expériences, des travaux complémentaires vont être réalisés afin de savoir si la forte expression d'éléments CD31+/ α -SMA+ est un véritable facteur pronostic en lien avec une chimiosensibilité augmentée à la Doxorubicine, ou si elle est une conséquence indirecte d'une bonne réponse à la chimiothérapie et un témoin de la normalisation vasculaire. La présence d'éléments positifs pour CD31+/Endomucine+ analogues

aux vaisseaux H, pose également question, et doit être étudiée davantage pour son impact sur la réponse à la chimiothérapie.

La caractérisation des mécanismes de résistance, mais aussi de diffusion du traitement, est un enjeu majeur dans la compréhension du comportement de cette tumeur redoutable.

La finalité de ces modèles et de ces analyses reste bien sûr de nous orienter vers de nouvelles options cliniques. Les pistes évoquées semblent intéressantes, une analyse sur biopsie d'ostéosarcome humain devrait donc être menée. Des études sur TMA de l'expression de marqueurs vasculaires choisis, notamment en co-marquage, pourraient permettre d'affiner nos outils pronostics, et peut-être de modifier nos attitudes thérapeutiques chez des patients considérés à haut risque. Sur biopsie, les co-marquages CD31/Endomucine, ou CD31/ α -SMA pourraient devenir en fonction de leur ratio, des éléments complémentaires d'aide à la décision thérapeutique.

Les travaux à venir devraient permettre de poursuivre l'exploration de l'environnement vasculaire de l'ostéosarcome et permettre d'apporter de nouveaux outils pour comprendre et prédire l'évolution de l'ostéosarcome.

Références :

- Albisinni, U., Galletti, S., Manfrini, M., Pignatti, G., Biagini, R., Picci, P., Bacci, G., and Capanna, R. (1988). [Angiographic evaluation of the response of osteosarcoma to neoadjuvant chemotherapy]. *Radiol Med* 75, 381–385.
- Alfranca, A., Martinez-Cruzado, L., Tornin, J., Abarrategi, A., Amaral, T., de Alava, E., Menendez, P., Garcia-Castro, J., and Rodriguez, R. (2015). Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 3097–3113.
- Allison, D.C., Carney, S.C., Ahlmann, E.R., Hendifar, A., Chawla, S., Fedenko, A., Angeles, C., and Menendez, L.R. (2012). A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era. *Sarcoma* 2012, 704872.
- An, R., Schmid, R., Klausning, A., Robering, J.W., Weber, M., Bäuerle, T., Detsch, R., Boccaccini, A.R., Horch, R.E., Boos, A.M., et al. (2018). Proangiogenic effects of tumor cells on endothelial progenitor cells vary with tumor type in an in vitro and in vivo rat model. *FASEB J* 32, 5587–5601.
- Asano, N., Takeshima, H., Yamashita, S., Takamatsu, H., Hattori, N., Kubo, T., Yoshida, A., Kobayashi, E., Nakayama, R., Matsumoto, M., et al. (2019). Epigenetic reprogramming underlies efficacy of DNA demethylation therapy in osteosarcomas. *Scientific Reports* 9, 20360.
- Asmane, I., Watkin, E., Alberti, L., Duc, A., Marec-Berard, P., Ray-Coquard, I., Cassier, P., Decouvelaere, A.-V., Ranchère, D., Kurtz, J.-E., et al. (2012). Insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) exclusive nuclear staining: a predictive biomarker for IGF-1R monoclonal antibody (Ab) therapy in sarcomas. *Eur J Cancer* 48, 3027–3035.
- Avnet, S., Longhi, A., Salerno, M., Halleen, J.M., Perut, F., Granchi, D., Ferrari, S., Bertoni, F., Giunti, A., and Baldini, N. (2008). Increased osteoclast activity is associated with aggressiveness of osteosarcoma. *Int J Oncol* 33, 1231–1238.
- Avnet, S., Lemma, S., Cortini, M., Pellegrini, P., Perut, F., Zini, N., Kusuzaki, K., Chano, T., Grisendi, G., Dominici, M., et al. (2016). Altered pH gradient at the plasma membrane of osteosarcoma cells is a key mechanism of drug resistance. *Oncotarget* 7, 63408–63423.

- de Azevedo, J.W.V., Fernandes, T.A.A. de M., Fernandes, J.V., de Azevedo, J.C.V., Lanza, D.C.F., Bezerra, C.M., Andrade, V.S., de Araújo, J.M.G., and Fernandes, J.V. (2020). Biology and pathogenesis of human osteosarcoma (Review). *Oncology Letters* *19*, 1099–1116.
- Baglio, S.R., Lagerweij, T., Pérez-Lanzón, M., Ho, X.D., Léveillé, N., Melo, S.A., Cleton-Jansen, A.-M., Jordanova, E.S., Roncuzzi, L., Greco, M., et al. (2017). Blocking Tumor-Educated MSC Paracrine Activity Halts Osteosarcoma Progression. *Clin Cancer Res* *23*, 3721–3733.
- Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* *125*, 5591–5596.
- Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D.M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* *15*, 102–111.
- Bao, Z., Cheng, Z., and Chai, D. (2018). The expressions of CD133, ALDH1, and vasculogenic mimicry in osteosarcoma and their clinical significance. *Int J Clin Exp Pathol* *11*, 3656–3663.
- Becker, R.G., Galia, C.R., Morini, S., and Viana, C.R. (2013). Immunohistochemical expression of vegf and her-2 proteins in osteosarcoma biopsies. *Acta Ortop Bras* *21*, 233–238.
- Beltrami, G., Ristori, G., Scoccianti, G., Tamburini, A., and Capanna, R. (2016). Hereditary Multiple Exostoses: a review of clinical appearance and metabolic pattern. *Clin Cases Miner Bone Metab* *13*, 110–118.
- Benezech, S., Chabaud, S., Chambon, F., Dijoud, F., Chotel, F., and Marec-Berard, P. (2016). Prognostic Value of Vascular Invasion in Pediatric Osteosarcomas. *Pathol Oncol Res* *22*, 847–852.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* *3*, 401–410.
- Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Reviews Cancer* *8*, 592–603.
- Bertin, H., Guilho, R., Brion, R., Amiaud, J., Battaglia, S., Moreau, A., Brouchet-Gomez, A., Longis, J., Piot, B., Heymann, D., et al. (2019). Jaw osteosarcoma models in mice: first description. *J Transl Med* *17*, 56.

Bertin, H., Gomez-Brouchet, A., and Rédini, F. (2020). Osteosarcoma of the jaws: An overview of the pathophysiological mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol* 156, 103126.

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. *JCO* 20, 776–790.

Billaud, M. (2012). L'hétérogénéité intratumorale - Un obstacle darwinien à la médecine personnalisée ? (1). *Med Sci (Paris)* 28, 1116–1119.

Blay, J.-Y., Soibinet, P., Penel, N., Bompas, E., Duffaud, F., Stoeckle, E., Mir, O., Adam, J., Chevreau, C., Bonvalot, S., et al. (2017). Improved survival using specialized multidisciplinary board in sarcoma patients. *Ann Oncol* 28, 2852–2859.

Bonuccelli, G., Avnet, S., Grisendi, G., Salerno, M., Granchi, D., Dominici, M., Kusuzaki, K., and Baldini, N. (2014). Role of mesenchymal stem cells in osteosarcoma and metabolic reprogramming of tumor cells. *Oncotarget* 5, 7575–7588.

Botter, S.M., Neri, D., and Fuchs, B. (2014). Recent advances in osteosarcoma. *Curr Opin Pharmacol* 16, 15–23.

Bousquet, M., Noirot, C., Accadbled, F., Sales de Gauzy, J., Castex, M.P., Brousset, P., and Gomez-Brouchet, A. (2016). Whole-exome sequencing in osteosarcoma reveals important heterogeneity of genetic alterations. *Ann Oncol* 27, 738–744.

Boutayeb, S., Zakkouri, F.Z., Aitelhaj, M., Mesmoudi, M., Boutayeb, A., Boutayeb, W., Mrabti, H., and Errihani, H. (2012). Bilan des inhibiteurs de protéine tyrosine kinase dans le traitement des cancers. *Pathologie Biologie* 60, 229–233.

Brard, C., Piperno-Neumann, S., Delaye, J., Brugières, L., Hampson, L.V., Teuff, G.L., Deley, M.-C.L., and Gaspar, N. (2019). Sarcome-13/OS2016 trial protocol: a multicentre, randomised, open-label, phase II trial of mifamurtide combined with postoperative chemotherapy for patients with newly diagnosed high-risk osteosarcoma. *BMJ Open* 9, e025877.

Brookes, M., and Revell, W.J. (2012). *Blood Supply of Bone: Scientific Aspects* (Springer Science & Business Media).

- Brown, H.K., Schiavone, K., Gouin, F., Heymann, M.-F., and Heymann, D. (2018). Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments. *Calcif Tissue Int* 102, 174–195.
- Bruland, Ø.S., Bauer, H., Alvegaard, T., and Smeland, S. (2010). Treatment of Osteosarcoma. The Scandinavian Sarcoma Group Experience. In *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*, N. Jaffe, O.S. Bruland, and S. Bielack, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 309–318.
- Butler, J.M., Kobayashi, H., and Rafii, S. (2010). Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nat Rev Cancer* 10, 138–146.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.
- Carulli, C., Innocenti, M., and Brandi, M.L. (2013). Bone Vascularization in Normal and Disease Conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4.
- Casali, P.G., Bielack, S., Abecassis, N., Aro, H.T., Bauer, S., Biagini, R., Bonvalot, S., Boukovinas, I., Bovee, J.V.M.G., Brennan, B., et al. (2018). Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 29, iv79-iv95.
- Cates, J.M.M. (2016). Pathologic fracture a poor prognostic factor in osteosarcoma: Misleading conclusions from meta-analyses? *Eur J Surg Oncol* 42, 883–888.
- Cathomas, R., Rothermundt, C., Bode, B., Fuchs, B., von Moos, R., and Schwitter, M. (2015). RANK ligand blockade with denosumab in combination with sorafenib in chemorefractory osteosarcoma: a possible step forward? *Oncology* 88, 257–260.
- Chan, C.K.F., Gulati, G.S., Sinha, R., Tompkins, J.V., Lopez, M., Carter, A.C., Ransom, R.C., Reinisch, A., Wearda, T., Murphy, M., et al. (2018). Identification of the Human Skeletal Stem Cell. *Cell* 175, 43–56.e21.
- Chen, D., Zhang, Y.-J., Zhu, K., and Wang, W.-C. (2013). A systematic review of vascular endothelial growth factor expression as a biomarker of prognosis in patients with osteosarcoma. *Tumour Biol* 34, 1895–1899.
- Chen, X., Bahrami, A., Pappo, A., Easton, J., Dalton, J., Hedlund, E., Ellison, D., Shurtleff, S., Wu, G., Wei, L., et al. (2014). Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Rep* 7, 104–112.

- Chen, Y., Di Grappa, M.A., Molyneux, S.D., McKee, T.D., Waterhouse, P., Penninger, J.M., and Khokha, R. (2015). RANKL blockade prevents and treats aggressive osteosarcomas. *Sci Transl Med* 7, 317ra197.
- Cheng, Y.Q., Wang, S.B., Liu, J.H., Jin, L., Liu, Y., Li, C.Y., Su, Y.R., Liu, Y.R., Sang, X., Wan, Q., et al. (2020). Modifying the tumour microenvironment and reverting tumour cells: New strategies for treating malignant tumours. *Cell Proliferation* 53, e12865.
- Choi, L.E., Healey, J.H., Kuk, D., and Brennan, M.F. (2014). Analysis of outcomes in extraskeletal osteosarcoma: a review of fifty-three cases. *J Bone Joint Surg Am* 96, e2.
- Chou, A.J., Kleinerman, E.S., Krailo, M.D., Chen, Z., Betcher, D.L., Healey, J.H., Conrad, E.U., Nieder, M.L., Weiner, M.A., Wells, R.J., et al. (2009). Addition of Muramyl Tripeptide to Chemotherapy for Patients with Newly Diagnosed Metastatic Osteosarcoma: a Report from the Children's Oncology Group. *Cancer* 115, 5339–5348.
- Chu, C., Wei, S., Wang, Y., Wang, Y., Man, Y., and Qu, Y. (2019). Extracellular vesicle and mesenchymal stem cells in bone regeneration: recent progress and perspectives. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 107, 243–250.
- Chuang, V.P., Benjamin, R., Jaffe, N., Wallace, S., Ayala, A.G., Murray, J., Charnsangavej, C., and Soo, C.S. (1982). Radiographic and angiographic changes in osteosarcoma after intraarterial chemotherapy. *AJR Am J Roentgenol* 139, 1065–1069.
- Clement-Colmou, K. (2018). Impact du fractionnement de la radiothérapie sur le microenvironnement vasculaire tumoral (Nantes).
- Corre, I., Verrecchia, F., Crenn, V., Redini, F., and Trichet, V. (2020). The Osteosarcoma Microenvironment: A Complex but Targetable Ecosystem. *Cells* 9.
- Cowin, S.C., and Cardoso, L. (2015). Blood and Interstitial flow in the hierarchical pore space architecture of bone tissue. *J Biomech* 48, 842–854.
- Crenn, V., Biteau, K., Amiaud, J., Dumars, C., Guiho, R., Vidal, L., Nail, L.-R.L., Heymann, D., Moreau, A., Gouin, F., et al. (2017). Bone microenvironment has an influence on the histological response of osteosarcoma to chemotherapy: retrospective analysis and preclinical modeling. *Am J Cancer Res* 7, 2333–2349.

- Davis, A.M., Bell, R.S., and Goodwin, P.J. (1994). Prognostic factors in osteosarcoma: a critical review. *J. Clin. Oncol.* *12*, 423–431.
- Diessner, B.J., and Spector, L.G. (2017). Birthweight and site of osteosarcoma development. *Pediatric Blood & Cancer* *64*, e26443.
- Dumars, C., Ngyuen, J.-M., Gaultier, A., Lanel, R., Corradini, N., Gouin, F., Heymann, D., and Heymann, M.-F. (2016). Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget* *7*, 78343–78354.
- Ebb, D., Meyers, P., Grier, H., Bernstein, M., Gorlick, R., Lipshultz, S.E., Krailo, M., Devidas, M., Barkauskas, D.A., Siegal, G.P., et al. (2012). Phase II trial of trastuzumab in combination with cytotoxic chemotherapy for treatment of metastatic osteosarcoma with human epidermal growth factor receptor 2 overexpression: a report from the children’s oncology group. *J Clin Oncol* *30*, 2545–2551.
- Edwards, J.R., Williams, K., Kindblom, L.G., Meis-Kindblom, J.M., Hogendoorn, P.C.W., Hughes, D., Forsyth, R.G., Jackson, D., and Athanasou, N.A. (2008). Lymphatics and bone. *Hum. Pathol.* *39*, 49–55.
- Endicott, A.A., Morimoto, L.M., Kline, C.N., Wiemels, J.L., Metayer, C., and Walsh, K.M. (2017). Perinatal factors associated with clinical presentation of osteosarcoma in children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer* *64*.
- Ewing (1928). *Neoplastic Diseases: A Treatise on Tumours*. By James Ewing, A.M., M.D., Sc.D., Professor of Pathology at Cornell University Medical College, N.Y.; Pathologist to the Memorial Hospital. Third edition. Royal 8vo. Pp. 1127, with 546 illustrations. 1928. Philadelphia and London: W. B. Saunders Co. Ltd. 63s. net. *BJS (British Journal of Surgery)* *16*, 174–175.
- Fletcher, C., Unni, K., and Mertens (2005). *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*.
- Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine* *285*, 1182–1186.
- Friebele, J.C., Peck, J., Pan, X., Abdel-Rasoul, M., and Mayerson, J.L. (2015). Osteosarcoma: A Meta-Analysis and Review of the Literature. *Am J. Orthop.* *44*, 547–553.

Fritzsching, B., Fellenberg, J., Moskovszky, L., Sapi, Z., Krenacs, T., Machado, I., Poeschl, J., Lehner, B., Szendroi, M., Bosch, A.L., et al. (2015). CD8+/FOXP3+-ratio in osteosarcoma microenvironment separates survivors from non-survivors: a multicenter validated retrospective study. *Oncoimmunology* 4.

Fujiwara, T., Kunisada, T., Takeda, K., Hasei, J., Nakata, E., Nakahara, R., Yoshida, A., and Ozaki, T. (2018). Intraoperative O-arm-navigated resection in musculoskeletal tumors. *Orthop Sci* 23, 1045–1050.

Gaebler, M., Silvestri, A., Haybaeck, J., Reichardt, P., Lowery, C.D., Stancato, L.F., Zybarth, G., and Regenbrecht, C.R.A. (2017). Three-Dimensional Patient-Derived In Vitro Sarcoma Models: Promising Tools for Improving Clinical Tumor Management. *Front Oncol* 7, 203.

Gianferante, D., Mirabello, L., and Savage, S. (2017). Germline and somatic genetics of osteosarcoma — connecting aetiology, biology and therapy. *Nature Reviews Endocrinology* 13.

Gibbs, C.P., Levings, P.P., and Ghivizzani, S.C. (2011). Evidence for the osteosarcoma stem cell. *Curr Orthop Pract* 22, 322–326.

Glasser, D.B., Lane, J.M., Huvos, A.G., Marcove, R.C., and Rosen, G. (1992). Survival, prognosis, and therapeutic response in osteogenic sarcoma. The Memorial Hospital experience. *Cancer* 69, 698–708.

Gomez-Brouchet, A., Illac, C., Gilhodes, J., Bouvier, C., Aubert, S., Guinebretiere, J.-M., Marie, B., Larousserie, F., Entz-Werle, N., de Pinieux, G., et al. (2017). CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies from the French OS2006 phase 3 trial. *Oncoimmunology* 6.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953–964.

Gouin, F., Paul, L., Odri, G.A., and Cartiaux, O. (2014). Computer-Assisted Planning and Patient-Specific Instruments for Bone Tumor Resection within the Pelvis: A Series of 11 Patients. *Sarcoma* 2014, 842709.

Güven, G., Hilty, M., and Ince, C. (2019). Microcirculation: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Application. *Blood Purification* 49, 1–8.

Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 21, 309–322.

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.

Herbeau, D., Fovet-Poingt, O., Cattelain, C., and Barberis, D. (1969). [Bessel-Hagen disease]. *Lille Med* 14, 1049–1055.

Hicks, M.J., Roth, J.R., Kozinetz, C.A., and Wang, L.L. (2007). Clinicopathologic features of osteosarcoma in patients with Rothmund-Thomson syndrome. *J Clin Oncol* 25, 370–375.

Hong, W., Yuan, H., Gu, Y., Liu, M., Ji, Y., Huang, Z., Yang, J., and Ma, L. (2020). Immune-related prognosis biomarkers associated with osteosarcoma microenvironment. *Cancer Cell International* 20, 83.

Hosaka, S., Horiuchi, K., Yoda, M., Nakayama, R., Tohmonda, T., Susa, M., Nakamura, M., Chiba, K., Toyama, Y., and Morioka, H. (2012). A novel multi-kinase inhibitor pazopanib suppresses growth of synovial sarcoma cells through inhibition of the PI3K-AKT pathway. *J Orthop Res* 30, 1493–1498.

Hu, J., Zhang, C., Zhu, K., Zhang, L., Cai, T., Zhan, T., and Luo, X. (2019). Treatment-Related Prognostic Factors in Managing Osteosarcoma around the Knee with Limb Salvage Surgery: A Lesson from a Long-Term Follow-Up Study. *Biomed Res Int* 2019, 3215824.

Humbert, P., Brennan, M.Á., Davison, N., Rosset, P., Trichet, V., Blanchard, F., and Layrolle, P. (2019). Immune Modulation by Transplanted Calcium Phosphate Biomaterials and Human Mesenchymal Stromal Cells in Bone Regeneration. *Front Immunol* 10, 663.

Hung, G.-Y., Yen, H.-J., Yen, C.-C., Chen, W.-M., Chen, P.C.-H., Wu, H.-T.H., Chiou, H.-J., Chang, W.-H., and Hsu, H.-E. (2015). Experience of pediatric osteosarcoma of the extremity at a single institution in Taiwan: prognostic factors and impact on survival. *Ann Surg Oncol* 22, 1080–1087.

Huvos, A.G. (1987). *Bone tumors: Diagnosis, treatment and prognosis*. Second edition.

- Italiano, A., Mir, O., Mathoulin-Pelissier, S., Penel, N., Piperno-Neumann, S., Bompas, E., Chevreau, C., Duffaud, F., Entz-Werlé, N., Saada, E., et al. (2020). Cabozantinib in patients with advanced Ewing sarcoma or osteosarcoma (CABONE): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol* *21*, 446–455.
- Jacques, C., Renema, N., Lezot, F., Ory, B., Walkley, C.R., Grigoriadis, A.E., and Heymann, D. (2018). Small animal models for the study of bone sarcoma pathogenesis: characteristics, therapeutic interests and limitations. *J Bone Oncol* *12*, 7–13.
- Jacques, C., Tesfaye, R., Lavaud, M., Georges, S., Baud'huin, M., Lamoureux, F., and Ory, B. (2020). Implication of the p53-Related miR-34c, -125b, and -203 in the Osteoblastic Differentiation and the Malignant Transformation of Bone Sarcomas. *Cells* *9*.
- Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* *307*, 58–62.
- Jeys, L.M., Thorne, C.J., Parry, M., Gaston, C.L.L., Sumathi, V.P., and Grimer, J.R. (2017). A Novel System for the Surgical Staging of Primary High-grade Osteosarcoma: The Birmingham Classification. *Clin Orthop Relat Res* *475*, 842–850.
- Jiao, Q., Bi, L., Ren, Y., Song, S., Wang, Q., and Wang, Y.-S. (2018). Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol Cancer* *17*, 36.
- Jin, M.-Z., and Jin, W.-L. (2020). The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther* *5*, 166.
- Joliat, M.J., Umeda, S., Lyons, B.L., Lynes, M.A., and Shultz, L.D. (2002). Establishment and characterization of a new osteogenic cell line (MOS-J) from a spontaneous C57BL/6J mouse osteosarcoma. *In Vivo* *16*, 223–228.
- Junankar, S., Shay, G., Jurczyk, J., Ali, N., Down, J., Pocock, N., Parker, A., Nguyen, A., Sun, S., Kashemirov, B., et al. (2015). Real-time intravital imaging establishes tumor-associated macrophages as the extraskelatal target of bisphosphonate action in cancer. *Cancer Discov* *5*, 35–42.
- Kansara, M., Teng, M.W., Smyth, M.J., and Thomas, D.M. (2014). Translational biology of osteosarcoma. *Nat Rev Cancer* *14*, 722–735.

- Kaya, M., Wada, T., Akatsuka, T., Kawaguchi, S., Nagoya, S., Shindoh, M., Higashino, F., Mezawa, F., Okada, F., and Ishii, S. (2000). Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 6, 572–577.
- Khalife, J., Sanchez, J.F., and Pichiorri, F. (2020). Extracellular Vesicles in Hematological Malignancies: From Biomarkers to Therapeutic Tools. *Diagnostics (Basel)* 10.
- Khosravi, N., Caetano, M.S., Cumpian, A.M., Unver, N., De la Garza Ramos, C., Noble, O., Daliri, S., Hernandez, B.J., Gutierrez, B.A., Evans, S.E., et al. (2018). IL22 Promotes Kras-Mutant Lung Cancer by Induction of a Protumor Immune Response and Protection of Stemness Properties. *Cancer Immunol Res* 6, 788–797.
- Kim, M.S., Lee, S.-Y., Cho, W.H., Song, W.S., Koh, J.-S., Lee, J.A., Yoo, J.Y., and Jeon, D.-G. (2008). Tumor necrosis rate adjusted by tumor volume change is a better predictor of survival of localized osteosarcoma patients. *Ann. Surg. Oncol.* 15, 906–914.
- Klangjorhor, J., Phanphaisarn, A., Teeyakasem, P., Chaiyawat, P., Phinyo, P., Settakorn, J., Theera-Umpon, N., and Pruksakorn, D. (2020). In vitro drug sensitivity (IDS) of patient-derived primary osteosarcoma cells as an early predictor of the clinical outcomes of osteosarcoma patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 85, 1165–1176.
- Klein, M.J., and Siegal, G.P. (2006). Osteosarcoma Anatomic and Histologic Variants. *AJCP* 125, 555–581.
- Kovac, M., Blattmann, C., Ribi, S., Smida, J., Mueller, N.S., Engert, F., Castro-Giner, F., Weischenfeldt, J., Kovacova, M., Krieg, A., et al. (2015). Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nature Communications* 6, 8940.
- Kristenson, S., Mann, R., Leafblad, K., Cook, B., and Chang, J. (2019). Radiation-induced osteosarcoma following treatment of Ewing’s sarcoma. *Radiol Case Rep* 15, 89–94.
- Kubicek, P. (2018). Etude du microenvironnement de l’ostéosarcome. Evaluation de l’axe RANK RANKL comme outil prédictif de la réponse à la chimiothérapie.
- Kusumbe, A.P., Ramasamy, S.K., and Adams, R.H. (2014). Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* 507, 323–328.

Lafage-Proust, M.H., and Roche, B. (2018). The Vasculature and Bone. In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 983–991.

Lafage-Proust, M.-H., Roche, B., Langer, M., Cleret, D., Vanden Bossche, A., Olivier, T., and Vico, L. (2015). Assessment of bone vascularization and its role in bone remodeling. *Bonekey Rep* 4.

Lampli, J., Fan, M., Rosenthal, H.G., Patni, M., Rinehart, E., Vergara, G., Ablah, E., Wooley, P.H., Lucas, G., and Yang, S.-Y. (2012). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor correlates with the advance of clinical osteosarcoma. *Int Orthop* 36, 2307–2313.

Lamora, A., Talbot, J., Mullard, M., Brounais-Le Royer, B., Redini, F., and Verrecchia, F. (2016). TGF- β Signaling in Bone Remodeling and Osteosarcoma Progression. *J Clin Med* 5.

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., Baud'huin, M., Rodriguez Calleja, L., Jacques, C., Berreur, M., Rédini, F., Lecanda, F., Bradner, J.E., Heymann, D., and Ory, B. (2014). Selective inhibition of BET bromodomain epigenetic signalling interferes with the bone-associated tumour vicious cycle. *Nat Commun* 5, 3511.

Le, D., V, B., Cw, R., Kn, G., Et, L., S, C., M, A., Mb, L., D, R., V, K., et al. (2019). Randomized Double-Blind Phase II Study of Regorafenib in Patients With Metastatic Osteosarcoma.

Le Nail, L.-R., Brennan, M., Rosset, P., Deschaseaux, F., Piloquet, P., Pichon, O., Le Caignec, C., Crenn, V., Layrolle, P., Héroult, O., et al. (2018). Comparison of Tumor- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Patients with High-Grade Osteosarcoma. *Int J Mol Sci* 19.

Lim, J., Poulin, N.M., and Nielsen, T.O. (2015). New Strategies in Sarcoma: Linking Genomic and Immunotherapy Approaches to Molecular Subtype. *Clin Cancer Res* 21, 4753–4759.

Longhi, A., Pasini, A., Cicognani, A., Baronio, F., Pellacani, A., Baldini, N., and Bacci, G. (2005). Height as a risk factor for osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 27, 314–318.

- Longhi, A., Paioli, A., Palmerini, E., Cesari, M., Abate, M.E., Setola, E., Spinnato, P., Donati, D., Hompland, I., and Boye, K. (2019). Pazopanib in relapsed osteosarcoma patients: report on 15 cases. *Acta Oncol* 58, 124–128.
- Luetke, A., Meyers, P.A., Lewis, I., and Juergens, H. (2014). Osteosarcoma treatment – Where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treatment Reviews* 40, 523–532.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.
- Marçola, M., and Rodrigues, C.E. (2015). Endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis: another brick in the wall. *Stem Cells Int* 2015, 832649.
- Marenzana, M., and Arnett, T.R. (2013). The Key Role of the Blood Supply to Bone. *Bone Res* 1, 203–215.
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., and Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol* 21, 9–17.
- Meyers, P.A. (2009). Muramyl tripeptide (mifamurtide) for the treatment of osteosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 9, 1035–1049.
- Min, D., Lin, F., Shen, Z., Zheng, S., Tan, L., Yu, W., and Yao, Y. (2013). Analysis of prognostic factors in 333 Chinese patients with high-grade osteosarcoma treated by multidisciplinary combined therapy. *Asia Pac J Clin Oncol* 9, 71–79.
- Mintz, M., Sowers, R., Brown, K., Hilmer, S., Mazza, B., Huvos, A., Meyers, P., LaFleur, B., McDonough, W., Henry, M., et al. (2005). An Expression Signature Classifies Chemotherapy-Resistant Pediatric Osteosarcoma. *Cancer Research* 65, 1748–1754.
- Mirabello, L., Troisi, R.J., and Savage, S.A. (2009a). International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages, and elderly persons. *Int J Cancer* 125, 229–234.

- Mirabello, L., Troisi, R.J., and Savage, S.A. (2009b). Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer* *115*, 1531–1543.
- Moll, A.C., Imhof, S.M., Bouter, L.M., and Tan, K.E. (1997). Second primary tumors in patients with retinoblastoma. A review of the literature. *Ophthalmic Genet* *18*, 27–34.
- Moriceau, G., Ory, B., Mitrofan, L., Riganti, C., Blanchard, F., Brion, R., Charrier, C., Battaglia, S., Pilet, P., Denis, M.G., et al. (2010). 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.
- Morrow, J.J., and Khanna, C. (2015). Osteosarcoma Genetics and Epigenetics: Emerging Biology and Candidate Therapies. *Crit Rev Oncog* *20*, 173–197.
- Mutsaers, A.J., and Walkley, C.R. (2014). Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone* *62*, 56–63.
- Nagelkerke, A., Bussink, J., Rowan, A.E., and Span, P.N. (2015). The mechanical microenvironment in cancer: How physics affects tumours. *Semin Cancer Biol* *35*, 62–70.
- Nataraj, V., Batra, A., Rastogi, S., Khan, S.A., Sharma, M.C., Vishnubhatla, S., and Bakhshi, S. (2015). Developing a prognostic model for patients with localized osteosarcoma treated with uniform chemotherapy protocol without high dose methotrexate: A single-center experience of 237 patients. *J Surg Oncol* *112*, 662–668.
- Navid, F., Santana, V.M., Neel, M., McCarville, M.B., Shulkin, B.L., Wu, J., Billups, C.A., Mao, S., Daryani, V.M., Stewart, C.F., et al. (2017). A phase II trial evaluating the feasibility of adding bevacizumab to standard osteosarcoma therapy. *Int J Cancer* *141*, 1469–1477.
- Nilsson, B., Nilsson, O., and Ahlman, H. (2009). Treatment of gastrointestinal stromal tumours: imatinib, sunitinib -- and then? *Expert Opin Investig Drugs* *18*, 457–468.
- Odri, G., Kim, P.-P., Lamoureux, F., Charrier, C., Battaglia, S., Amiaud, J., Heymann, D., Gouin, F., and Redini, F. (2014). Zoledronic acid inhibits pulmonary metastasis dissemination in a preclinical model of Ewing's sarcoma via inhibition of cell migration. *BMC Cancer* *14*, 169.

- Ohba, T., Cates, J.M.M., Cole, H.A., Slosky, D.A., Haro, H., Ando, T., Schwartz, H.S., and Schoenecker, J.G. (2014). Autocrine VEGF/VEGFR1 signaling in a subpopulation of cells associates with aggressive osteosarcoma. *Mol Cancer Res* 12, 1100–1111.
- O’Kane, G.M., Cadoo, K.A., Walsh, E.M., Emerson, R., Dervan, P., O’Keane, C., Hurson, B., O’Toole, G., Dudeney, S., Kavanagh, E., et al. (2015). Perioperative chemotherapy in the treatment of osteosarcoma: a 26-year single institution review. *Clinical Sarcoma Research* 5, 17.
- Ory, B., Heymann, M.-F., Kamijo, A., Gouin, F., Heymann, D., and Redini, F. (2005). Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* 104, 2522–2529.
- Ottaviani, G., and Jaffe, N. (2009). The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* 152, 3–13.
- Ould-Slimane, M., Thong, P., Perez, A., Roussignol, X., and Dujardin, F.-H. (2016). The role of Intraoperative 3D navigation for pelvic bone tumor resection. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* 102, 807–811.
- Oury, J., and Oury, F. (2018). L’os, un organe pas si inerte.... *Med Sci (Paris)* 34, 54–62.
- Paget, S. (1889). THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet* 133, 571–573.
- Park, K.-S., Bandeira, E., Shelke, G.V., Lässer, C., and Lötval, J. (2019). Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Research & Therapy* 10, 288.
- Peng, Y., Wu, S., Li, Y., and Crane, J.L. (2020). Type H blood vessels in bone modeling and remodeling. *Theranostics* 10, 426–436.
- Perut, F., Roncuzzi, L., and Baldini, N. (2019). The Emerging Roles of Extracellular Vesicles in Osteosarcoma. *Front Oncol* 9.
- Picci, P., Bacci, G., Campanacci, M., Gasparini, M., Pilotti, S., Cerasoli, S., Bertoni, F., Guerra, A., Capanna, R., Albisinni, U., et al. (1985). Histologic evaluation of necrosis in osteosarcoma induced by chemotherapy regional mapping of viable and nonviable tumor. *Cancer* 56, 1515–1521.

Petrovito, L., Leo, A., Gori, V., Lulli, M., Parri, M., Becherucci, V., Piccini, L., Bambi, F., Taddei, M.L., and Chiarugi, P. (2018). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote invasiveness and transendothelial migration of osteosarcoma cells via a mesenchymal to amoeboid transition. *Mol Oncol* *12*, 659–676.

Piperno-Neumann, S., Le Deley, M.-C., Rédini, F., Pacquement, H., Marec-Bérard, P., Petit, P., Brisse, H., Lervat, C., Gentet, J.-C., Entz-Werlé, N., et al. (2016). Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *17*, 1070–1080.

Porter, D.E., Holden, S.T., Steel, C.M., Cohen, B.B., Wallace, M.R., and Reid, R. (1992). A significant proportion of patients with osteosarcoma may belong to Li-Fraumeni cancer families. *J Bone Joint Surg Br* *74*, 883–886.

Puisieux, Caux, and Block (2013). Rôle du microenvironnement dans la tumorigenèse et la progression tumorale.

Punzo, F., Tortora, C., Argenziano, M., Pinto, D.D., Pota, E., Martino, M.D., Paola, A.D., and Rossi, F. (2020). Can Denosumab be used in combination with Doxorubicin in Osteosarcoma? *Oncotarget* *11*, 2763–2773.

Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* *141*, 39–51.

Ramasamy, S.K., Kusumbe, A.P., Wang, L., and Adams, R.H. (2014). Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature* *507*, 376–380.

Raymond, A.K., and Jaffe, N. (2010). Conditions that Mimic Osteosarcoma. In *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*, N. Jaffe, O.S. Bruland, and S. Bielack, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 85–121.

Raza, A., Franklin, M.J., and Dudek, A.Z. (2010). Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *American Journal of Hematology* *85*, 593–598.

Ren, K., Yao, N., Wang, G., Tian, L., Ma, J., Shi, X., Zhang, L., Zhang, J., Zhou, X., Zhou, G., et al. (2014). Vasculogenic mimicry: a new prognostic sign of human osteosarcoma. *Human Pathology* *45*, 2120–2129.

- Rosen, G., Marcove, R.C., Caparros, B., Nirenberg, A., Kosloff, C., and Huvos, A.G. (1979). Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer* 43, 2163–2177.
- 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.
- Sadykova, L.R., Ntekim, A.I., Muyangwa-Semenova, M., Rutland, C.S., Jeyapalan, J.N., Blatt, N., and Rizvanov, A.A. (2020). Epidemiology and Risk Factors of Osteosarcoma. *Cancer Investigation* 38, 259–269.
- Salah, S., Ahmad, R., Sultan, I., Yaser, S., and Shehadeh, A. (2014). Osteosarcoma with metastasis at initial diagnosis: Current outcomes and prognostic factors in the context of a comprehensive cancer center. *Molecular and Clinical Oncology* 2, 811–816.
- Savidou, O.D., Bolia, I.K., Chloros, G.D., Papanastasiou, J., Koutsouradis, P., and Papagelopoulos, P.J. (2017). Denosumab: Current Use in the Treatment of Primary Bone Tumors. *Orthopedics* 40, 204–210.
- Schiavone, K.K., Garnier, D., Heymann, M.F., and Heymann, D. (2019). The heterogeneity of osteosarcoma: the role played by cancer stem cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Schnadig, I.D., and Blanke, C.D. (2006). Gastrointestinal stromal tumors: imatinib and beyond. *Curr Treat Options Oncol* 7, 427–437.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671–675.
- Schuetze, S.M., Zhao, L., Chugh, R., Thomas, D.G., Lucas, D.R., Metko, G., Zalupski, M.M., and Baker, L.H. (2012). Results of a phase II study of sirolimus and cyclophosphamide in patients with advanced sarcoma. *Eur J Cancer* 48, 1347–1353.
- Sharma, H., and Jane, M.J. (2005). Sarcomatous degeneration in Paget’s disease of bone. *Current Orthopaedics* 19, 68–77.

Sivaraj, K.K., and Adams, R.H. (2016). Blood vessel formation and function in bone. *Development* 143, 2706–2715.

Smeland, S., Bielack, S.S., Whelan, J., Bernstein, M., Hogendoorn, P., Krailo, M.D., Gorlick, R., Janeway, K.A., Ingleby, F.C., Anninga, J., et al. (2019). Survival and prognosis with osteosarcoma: outcomes in more than 2000 patients in the EURAMOS-1 (European and American Osteosarcoma Study) cohort. *Eur J Cancer* 109, 36–50.

Su, N., Yang, J., Xie, Y., Du, X., Chen, H., Zhou, H., and Chen, L. (2019). Bone function, dysfunction and its role in diseases including critical illness. *Int J Biol Sci* 15, 776–787.

Subbiah, V., Wagner, M.J., McGuire, M.F., Sarwari, N.M., Devarajan, E., Lewis, V.O., Westin, S., Kato, S., Brown, R.E., and Anderson, P. (2015). Personalized comprehensive molecular profiling of high risk osteosarcoma: Implications and limitations for precision medicine. *Oncotarget* 6, 40642–40654.

Sun, L., Li, Y., Zhang, J., Li, H., Li, B., and Ye, Z. (2015). Prognostic value of pathologic fracture in patients with high grade localized osteosarcoma: a systemic review and meta-analysis of cohort studies. *J Orthop Res* 33, 131–139.

Takano, S. (2012). Glioblastoma angiogenesis: VEGF resistance solutions and new strategies based on molecular mechanisms of tumor vessel formation. *Brain Tumor Pathol* 29, 73–86.

Themes, U.F.O. (2016). Malignant Bone Tumors I: Osteosarcomas and Chondrosarcomas.

Tian, Z., Niu, X., and Yao, W. (2020). Receptor Tyrosine Kinases in Osteosarcoma Treatment: Which Is the Key Target? *Front. Oncol.* 10.

Todoric, J., and Karin, M. (2019). The Fire within: Cell-Autonomous Mechanisms in Inflammation-Driven Cancer. *Cancer Cell* 35, 714–720.

Toledo, S.R.C., Oliveira, I.D., Okamoto, O.K., Zago, M.A., de Seixas Alves, M.T., Filho, R.J.G., Macedo, C.R.P.D., and Petrilli, A.S. (2010). Bone deposition, bone resorption, and osteosarcoma. *J Orthop Res* 28, 1142–1148.

Tsuda, Y., Tsoi, K., Stevenson, J.D., Parry, M.C., Fujiwara, T., Sumathi, V., and Jeys, L.M. (2020). Is Microscopic Vascular Invasion in Tumor Specimens Associated with Worse Prognosis in Patients with High-grade Localized Osteosarcoma? *Clin Orthop Relat Res* 478, 1190–1198.

- Uluçkan, Ö., Segaliny, A., Botter, S., Santiago, J.M., and Mutsaers, A.J. (2015). Preclinical mouse models of osteosarcoma. *BoneKEy Reports* 4, 670.
- Vallabhaneni, K.C., Penfornis, P., Dhule, S., Guillonneau, F., Adams, K.V., Mo, Y.Y., Xu, R., Liu, Y., Watabe, K., Vemuri, M.C., et al. (2015). Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem/stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites. *Oncotarget* 6, 4953–4967.
- Vanderbeck, A.N., and Maillard, I. (2019). Notch in the niche: new insights into the role of Notch signaling in the bone marrow. *1 104*, 2117–2119.
- Virk, M.S., and Lieberman, J.R. (2007). Tumor metastasis to bone. *Arthritis Res Ther* 9, S5.
- Wadhwa, N. (2014). Osteosarcoma: Diagnostic dilemmas in histopathology and prognostic factors. *Indian J Orthop* 48, 247–254.
- Wang, L., Ciani, C., Doty, S.B., and Fritton, S.P. (2004). Delineating bone's interstitial fluid pathway in vivo. *Bone* 34, 499–509.
- Widhe, B., and Widhe, T. (2000). Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 82, 667–674.
- Wilding, C.P., Elms, M.L., Judson, I., Tan, A.-C., Jones, R.L., and Huang, P.H. (2019). The landscape of tyrosine kinase inhibitors in sarcomas: looking beyond pazopanib. *Expert Rev Anticancer Ther* 19, 971–991.
- Wittrant, Y., Théoleyre, S., Chipoy, C., Padrines, M., Blanchard, F., Heymann, D., and Rédini, F. (2004). RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 1704, 49–57.
- Xie, L., Ji, T., and Guo, W. (2017). Anti-angiogenesis target therapy for advanced osteosarcoma (Review). *Oncology Reports* 38, 625–636.
- Xin, S., and Wei, G. (2020). Prognostic factors in osteosarcoma: A study level meta-analysis and systematic review of current practice. *J Bone Oncol* 21, 100281.
- Yaghmai, I. (1977). Angiographic features of osteosarcoma. *American Journal of Roentgenology* 129, 1073–1081.

Yarmish, G., Klein, M.J., Landa, J., Lefkowitz, R.A., and Hwang, S. (2010). Imaging Characteristics of Primary Osteosarcoma: Nonconventional Subtypes. *RadioGraphics* 30, 1653–1672.

Yedururi, S., Chawla, S., Amini, B., Wei, W., Salem, U.I., Morani, A.C., Wang, W.-L., Gorlick, R., Lewis, V.O., and Daw, N.C. (2018). Tumor thrombus in the large veins draining primary pelvic osteosarcoma on cross sectional imaging. *Eur J Radiol* 105, 49–55.

Zhang, C., Morimoto, L.M., de Smith, A.J., Hansen, H.M., Gonzalez-Maya, J., Endicott, A.A., Smirnov, I.V., Metayer, C., Wei, Q., Eward, W.C., et al. (2018). Genetic determinants of childhood and adult height associated with osteosarcoma risk. *Cancer* 124, 3742–3752.

Zheng, Y., Wang, G., Chen, R., Hua, Y., and Cai, Z. (2018). Mesenchymal stem cells in the osteosarcoma microenvironment: their biological properties, influence on tumor growth, and therapeutic implications. *Stem Cell Res Ther* 9, 22.



Review

The Osteosarcoma Microenvironment: A Complex but Targetable Ecosystem

Isabelle Corre ^{1,2,*}, Franck Verrecchia ¹, Vincent Crenn ^{1,3}, Françoise Redini ¹ and Valérie Trichet ^{1,2,*}

¹ INSERM, Nantes University, UMR1238 Phy-Os “Bone Sarcomas and Remodeling of Calcified Tissues”, F-44035 Nantes, France

² CNRS GDR3697 MicroNit, F-37044 Tours, France

³ Department of Orthopedic, Nantes Hospital, CHU Hotel-Dieu, F-44035 Nantes, France

* Correspondence: isabelle.corre@univ-nantes.fr (I.C.); valerie.trichet@univ-nantes.fr (V.T.)

Received: 20 March 2020; Accepted: 11 April 2020; Published: 15 April 2020



Abstract: Osteosarcomas are the most frequent primary bone sarcomas, affecting mainly children, adolescents, and young adults, and with a second peak of incidence in elderly individuals. The current therapeutic management, a combined regimen of poly-chemotherapy and surgery, still remains largely insufficient, as patient survival has not improved in recent decades. Osteosarcomas are very heterogeneous tumors, both at the intra- and inter-tumor level, with no identified driver mutation. Consequently, efforts to improve treatments using targeted therapies have faced this lack of specific osteosarcoma targets. Nevertheless, these tumors are inextricably linked to their local microenvironment, composed of bone, stromal, vascular and immune cells and the osteosarcoma microenvironment is now considered to be essential and supportive for growth and dissemination. This review describes the different actors of the osteosarcoma microenvironment and gives an overview of the past, current, and future strategies of therapy targeting this complex ecosystem, with a focus on the role of extracellular vesicles and on the emergence of multi-kinase inhibitors.

Keywords: Osteosarcoma; microenvironment; bone; stromal cells; vascular cells; targeted therapies; extracellular vesicles; multi-kinase inhibitors

1. Introduction

Osteosarcomas (OSs) are the most common primary malignant bone sarcomas, with a bimodal age distribution. The highest incidence is in children and adolescents (median of age of 18), with a second smaller peak of incidence in elderly individuals over 60 years. Worldwide, the incidence of OS is around one to three cases annually per million individuals [1]. These tumors develop mainly in the long bones (femur, tibia, humerus), close to the growth plate in the bone metaphysis, and less frequently in the skull, jaw, and pelvis. OSs are characterized by the presence of transformed osteoblastic cells producing osteoid matrix. Nevertheless, the precise identity of the cell at the origin of the tumor remains unknown. Evidence supports the idea of an origin of OS in mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) and/or in more committed osteoblastic precursors [2,3]. Since the introduction of chemotherapies to treat OS the late 70s, patients diagnosed with OS receive a neo-adjuvant treatment followed by a post-surgery adjuvant therapy with a cocktail of chemotherapies, i.e., high-dose methotrexate (12 g/m²), etoposide, and ifosfamide for children and young adults (<25 years) in the French OS2006/sarcome-09 study [4], or other protocols combining doxorubicin, cisplatin, and ifosfamide with or without high-dose methotrexate [5–7]. With these therapeutic regimens, the 5 year survival has reached 78% for children and young adults with localized disease, but still remains at only 20% in patients with metastasis at diagnosis or in relapse [1,4]. Moreover, in the last 40 years, survival has not notably

improved for patients without metastases and has not improved at all for metastatic patients [8]. Therefore, improving therapy for OS remains a constant and major goal for many worldwide research and clinical groups.

A major characteristic of OSs tumors is their heterogeneity, both at the intra-tumoral level and also between individuals. Therefore, the common genomic initiating biological processes driving osteosarcomagenesis are still not identified. The complexity of the somatic genome of OS is a major cause of intra-tumoral heterogeneity, characterized by chromosomal aneuploidy, alteration of genes by mutation and/or variation of copy number, genomic instability featured by massive rearrangement through chromotripsis, and the presence of patterns of localized hypermutated regions, named kataegis [9]. A small set of genes has been found to be recurrently mutated in OS (*TP53*, *RB*, *MDM2*, *ATRX*, and *DLG2*) [10]. Recently, a subset of OSs was described with genomic alterations in genes of the DNA repair pathways, reminiscent of *BRCA1/2*-deficient tumors [11]. Several inherited syndromes such as Li–Fraumeni, Rothmund–Thomson, Werner, Bloom, and retinoblastoma familial cancers have also been associated with a predisposition to developing OS [9]. Nevertheless, in the vast majority of cases (95%), OSs appear as sporadic events. Overall, poorly defined oncogenic events associated with high cellular heterogeneity of tumor cells make the development of molecular targeted therapies devoted exclusively to tumor cells difficult.

Bone sarcomas, and in particular OSs, grow in the bone microenvironment, a very specialized, complex, and highly dynamic environment composed of bone cells (osteoclasts, osteoblasts, osteocytes), stromal cells (MSCs, fibroblasts), vascular cells (endothelial cells and pericytes), immune cells (macrophages, lymphocytes), and a mineralized extracellular matrix (ECM). In physiological conditions, a coordinated and fine-tuned orchestrated activity of bone, vascular, and stromal cells ensures bone homeostasis through intense paracrine and cellular communications. According to Paget's theory [12], tumor cells find in this microenvironment a fertile soil to seed and manage to hijack bone physiological pathways to their advantage in order to survive and grow. Cross-talk between OS and the bone microenvironment involves numerous environmental signals, induced by multiple cytokines, chemokines, and soluble growth factors [13], but also conveyed by extracellular vesicles (EVs), considered today to be effective vectors of communication between cells [14].

In OS, the difficulty of designing and validating new therapies rests on two levels of complexity: first, a high heterogeneity in tumor cells with no evident targetable event, and second, an active and reacting microenvironment composed of active cells, interconnected and intensively communicating through paracrine secretion of soluble factors and EVs. In this review, we describe the different actors of the OS microenvironment in the context of their complex interaction with tumor cells. We also discuss the past, current, and future therapeutic strategies, regarding the complex ecosystem of OS, with a focus on the emergence of multi-kinase inhibitors (MKI) that target tumor cells and the cells of their microenvironment, and on the role of EVs as essential conveyors of information in bone sarcoma biology.

2. OS-Induced Bone Remodeling

2.1. Osteoclasts and Osteolysis

OS development is associated with para-tumor osteolysis, causing frequent painful bone fragility at the time of the detection of OS in patients. OS aggressiveness has been associated with osteolysis markers in a few clinical cases [15]. Notably, the binding of the soluble molecule Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL), alias TNFSF11, to its receptor (RANK), mainly regulates osteolysis through paracrine regulation. RANKL is produced by osteoblasts and osteocytes in the bone environment [16], while RANK is expressed on the cell surface of osteoclast precursors [17]. In OSs, osteoclast activity leads to a vicious cycle between OS cell proliferation and bone degradation, leading to the release of pro-tumor factors such as insulin-like growth factor 1 (IGF1) or transforming growth factor- β (TGF- β) from the bone matrix [13,18]. However, clinical trials using monoclonal

antibody therapy to block the IGF receptor tyrosine kinase in patients with OS showed limited and unpredictable response rates, leading to the cessation of this therapy [19].

The link of osteolysis in the vicious cycle observed in OS has been demonstrated in preclinical studies, using either chemical inhibitors (mainly zoledronic acid, ZOL) [20,21] or RANKL receptor competitors (including osteoprotegerin (OPG) [22], RANK-Fc [23]), or RANKL silencing [24]. Thus, osteolysis inhibition became an attractive therapeutic target in combination with chemotherapeutics to treat OS. However, initiated on the basis of promising preclinical studies, OS2006, a Phase III clinical trial combining ZOL with chemotherapy and surgery gave very disappointing results, with no improvement but slightly worse therapeutic results [25]. Despite the fact that ZOL has also been described in vitro to have a direct effect on OS cells, its efficacy against OS primary growth and pulmonary metastasis remains controversial [26].

Direct implication of osteoclast activity in OS development and progression in patients is still difficult to decipher. Indeed, a loss of osteoclasts was associated with increased metastasis in a preclinical model of OS [27], while co-injection of pre-osteoclasts with human OS cells had no effect on OS local growth and lung metastases in nude mice [28]. Denosumab, an antibody directed against RANKL, efficiently inhibits osteoclast activity and is currently used to treat bone loss in bone metastasis, multiple myeloma, or giant cell tumors. However, no clinical results have been reported to date for denosumab in OS patients, except in combination with the MKI sorafenib for one patient [29,30]. Even following a more specific targeting of RANKL, denosumab does not have differentiated action towards different cell types. Indeed, the RANKL/RANK pathway is involved not only in osteoclasts, but also in many other cells of the tumor environment, including osteoblasts, stromal cells, immune cells (T and B lymphocytes, dendritic cells), and endothelial cells.

Local coupling between bone resorption and formation is essential to preserve bone density and should occur in basic multicellular units, including osteoclasts and osteoblasts, which are covered by bone lining cells forming a canopy, as originally described by Lassen et al. [31]. Under the canopy, RANKL secreted by osteoblasts induces osteoclast differentiation, as described in a well-demonstrated paradigm. Interestingly, a new paradigm model of intercellular communication of osteoclasts towards osteoblasts may be relevant (Figure 1), as it was recently reported that mature osteoclasts were able to produce EVs bearing RANK, allowing interaction with RANKL on osteoblasts [32]. RANK-bearing EVs were initially identified in mouse primary osteoclasts and precursors derived from bone marrow [33]. Recently, Ikebuchi et al. effectively demonstrated that RANK-bearing EVs issued from mouse mature osteoclasts were able to interact with RANKL-expressing osteoblasts, and therefore to induce osteoblastic differentiation coupled with bone formation involving RUNX2 signaling [32]. RANKL-reverse signaling in osteoblasts was demonstrated using RANK-masking on EVs and by creating a mutant mouse model *Rankl*^{P29A}, where RANKL intracellular signaling domain was suppressed. Consequently, RANK–RANKL interaction appears to be bi-directional, dual, and complementary in the coupling of bone resorption and formation: RANK transduction on osteoclasts and precursors activates osteolysis, while RANKL transduction on osteoblasts and precursors activates osteogenesis.

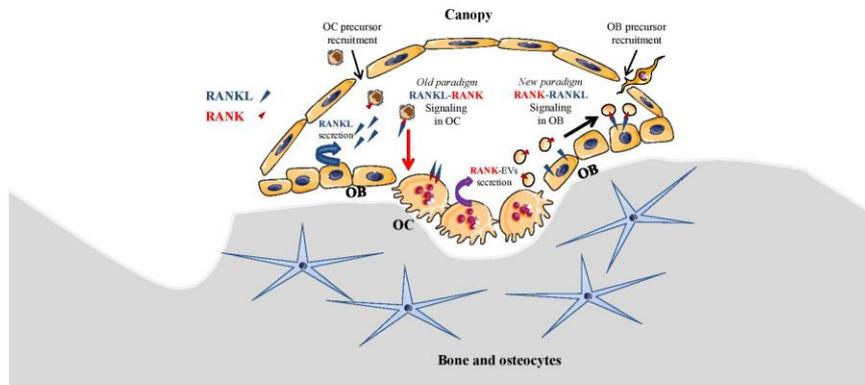


Figure 1. RANK–RANKL interactions under the canopy of bone remodeling compartments: old and new paradigms. The canopy is generated by bone lining cells and insulates a basic multicellular unit with osteoclasts (OC) and osteoblasts (OB). OC and OB precursors are recruited under the canopy, from respectively bone marrow- and blood stream-supplied hematopoietic stem cells and bone marrow-issued mesenchymal stromal cells. In the old and well-demonstrated paradigm, RANKL secreted by OB induces OC differentiation through RANK intracellular signaling (RANKL–RANK), while a new paradigm proposes a reverse signaling through RANKL intracellular signaling (RANK–RANKL) mediated by RANK-bearing extracellular vesicles EVs from OC [32]. RANK: receptor activator of nuclear factor kappa-B; RANKL: RANK ligand.

In the context of OS, bone remodeling is linked to a vicious cycle between osteoclasts and tumor cells [22], which is established through the release of growth factors from the degraded bone matrix. Nevertheless, this vicious cycle may be additionally enhanced by EVs secreted by osteoclasts and OS cells [34]. Indeed, EVs secreted by OS cells were able to enhance osteolysis, while RANK-EVs secreted by osteoclasts may activate RANKL expressed on OS cells [35], suggesting a possible RANK–RANKL reverse signaling in OS, as previously described in normal bone physiology [32]. In one retrospective clinical study involving 40 patients, RANKL expression was observed in 75% of OS biopsy samples and its high expression level was correlated to a poor patient outcome [36]. Branstetter et al. [37] detected RANKL in 68% of human OSs, but only 37% OS samples showed more than 10% of tumor cells expressing RANKL. The same year, it was reported that the proliferation of RANKL-expressing OS cell lines was increased through transduction signaling involving AKT and ERK activation when cells were exposed to OPG [38]. One could hypothesize that RANKL expressed on the surface of OS cells could have been activated by OPG, as this protein is the decoy and soluble form of RANK that binds RANKL (Figure 2). Nevertheless, this pro-proliferative effect of OPG was believed to be independent of RANKL because soluble RANK did not induce similar effects. Thus, it was proposed that OPG's pro-proliferative effect was mediated by an unknown receptor. In regard to the innovative identification of the RANKL reverse signaling as described above (Figures 1 and 2) [32], RANKL activation in OS cells should be revisited, as RANK-EVs released by osteoclasts may have an unexpected role in OS through a possible RANK–RANKL reverse signaling in OS cells.

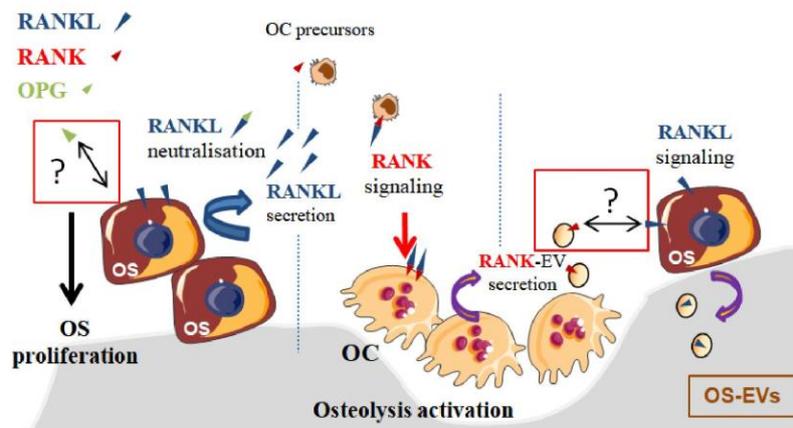


Figure 2. Proposed model of OPG/RANK–RANKL interactions in osteosarcoma (OS). RANK transduction induces the differentiation of osteoclasts (OC), leading to osteolysis, which in turn activates tumor cell proliferation, described as the vicious cycle. OPG is a decoy form of RANK, binding and neutralizing RANKL. Additionally, OPG increases proliferation of RANKL-expressing OS cells following its binding to an unknown receptor [38], possibly RANKL. The reverse signaling of RANKL, described recently in osteoblasts [32], could be also induced in OS cells. To the same extend, OS cells expressing RANKL could be activated by RANK-extracellular vesicles (EVs) produced by OC. RANK: receptor activator of nuclear factor kappa-B; RANKL: RANK ligand; OPG: osteoprotegerin.

2.2. Osteoblasts and Bone Formation

Primary bone tumors have potent local influences on bone and the clinical consequences of these influences can be devastating. OS is characterized by the formation of osteoid matrix surrounding anaplastic tumor cells [39,40], and it can stimulate the formation of various bone structures, such as Codman’s triangles or bone spines, designed as the sunburst periosteal reaction. The sunburst pattern of bone is due to new layers of collagen fibers stretching out perpendicularly to the bone. This process is mainly due to a deregulation of bone remodeling and in part to the activity of non-tumor osteoblasts, as observed in mouse OS models.

Osteoblastic progenitors are MSCs mainly present in the bone marrow, and more specifically multipotent skeletal stem cells (MSSCs), which are a subset of MSCs that were recently identified [41]. Under the control of different specific transcription factors, MSCs are able to differentiate into osteoblasts, chondroblasts, myoblasts, and adipocytes, while MSSCs differentiate into osteoblasts and chondroblasts, but not into myoblasts and adipocytes. However, there is not yet evidence indicating that either MSCs or MSSCs are the most important cells in the pathogenesis of OS. Current knowledge on osteoblastogenesis is based on MSC rather than MSSC differentiation. Briefly, RUNX2 and Osterix or SOX9 transcription factor expression leads to MSC differentiation, respectively towards the osteoblastic and chondroblastic lineages [42]. The differentiation of MSCs into mature osteoblasts involves a complex series of proliferation and differentiation steps (Figure 3). Briefly, RUNX2 (also known as CBF1) is a transcriptional factor that binds a consensus site, called OSE2, present along the proximal promoters of many genes including those of the $\alpha 1$ chain of type I collagen (*COL1A1*), bone sialoprotein (*BSP*), osteocalcin (*OCN*), and osteopontin (*OPN*) [43,44]. RUNX2 is crucial for the early steps of MSC differentiation into pre-osteoblasts and to maintain osteoblastic function, while Osterix (also known as SP7) is involved in osteoblastic differentiation mainly downstream of RUNX2 by allowing the differentiation of pre-osteoblasts into functional mature osteoblasts [45]. Upstream of those transcriptional factors, a signal transduction cascade has to be activated by cytokines or growth factors

such as TGF- β s, fibroblast growth factors (FGFs), or wingless-type MMTV integration site family members (WNTs). Most of these cytokines or growth factors are implicated in OS development.

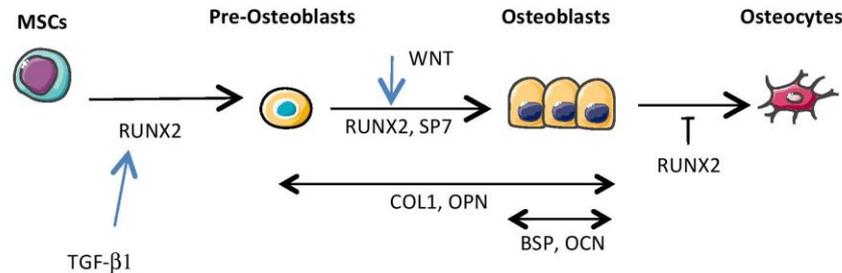


Figure 3. Osteoblastic differentiation from mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) to osteocytes. Transcription factor RUNX2 promotes MSC commitment toward the osteoblastic lineage at the early stages while repressing maturation in osteocytes. SP7 allows the differentiation of pre-osteoblasts into functional mature osteoblasts. RUNX2 induces expression of genes coding for expression of collagen type 1 (COL1), osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP) and osteocalcin (OCN) proteins. Transforming growth factor- β (TGF- β 1) and WNT stimulate early stages of osteoblastic differentiation.

The TGF- β family comprises at least 30 members in humans [46]. The role of TGF- β s during bone remodeling is complex. Regarding the mesenchymal osteoblastic lineage, TGF- β 1 favors bone formation by stimulating the proliferation and migration of MSCs during the early stages of osteoblastogenesis [47,48]. In contrast, during the late stages of osteoblastogenesis, TGF- β 1 inhibits the differentiation of MSCs into osteoblasts and the mineralization of mature osteoblasts in culture [49]. Interestingly, TGF- β 1 is mainly implicated in OS development during either primary tumor growth or metastatic progression [50]. Blocking TGF- β activity in OS cells by SMAD7 overexpression has decreased primary tumor growth by affecting the relationships between tumor cells and non-tumor cells [51].

FGFs are also key regulators of skeletal development [52]. For example, FGF2 is important for the proliferation and maturation of pre-osteoblasts, while FGF18 is essential for mature formation of osteoblasts. Therefore, FGF receptors are receptor tyrosine kinases that may represent a therapeutic target in OS patients [53]. Indeed, Weekes et al. reported an important decrease of lung metastases upon using the inhibitor AZD4547 to block FGF receptor signaling following OS induction in mice [54].

WNTs are a family of 19 secreted glycoproteins. The binding of a WNT ligand (i.e., WNT1, WNT3a) to a frizzled (FZD) receptor, and its co-receptor LRP5/6 activates the canonical WNT pathway [55]. Activation of the WNT signaling cascade leads to the promotion of bone formation and suppression of bone resorption, leading to a balance in bone remodeling [56]. Interestingly, a monoclonal antibody against the WNT signaling inhibitor dickkopf-1 inhibited OS metastasis in a preclinical model of OS [57].

Evidence is thus emerging for a role of osteoblasts in tumor growth in bone. Osteoblasts directly regulate bone matrix synthesis by their own secretome and indirectly regulate bone resorption through the release of RANKL, which binds RANK on osteoclast precursors as previously presented (Figure 1). Additionally, RANK is expressed on MSCs and is downregulated during osteoblastogenesis. Intriguingly, Branstetter et al. did not detect RANK expression on tumor cells into OS samples [37]. Nevertheless, one might address the importance of RANK signaling in OS cells, which derived from cells committed in differentiation pathway between MSCs or pre-osteoblasts towards mature osteoblasts [58]. In this context, Navet et al. investigated the role of RANK overexpression in OS cell lines and during OS development in immune-deficient mice [59]. Activation of the RANKL–RANK pathway in these OS cell lines did not change cell proliferation or migration, nor tumor growth

in vivo. Such results suggest that RANK activation in OS cells is not involved in tumor growth. However, RANK-overexpressing OS cells induced a significant increase of lung metastases that was prevented with an antibody directed against RANKL. In another study [23], whole body deletion of RANKL proteins prevented OS development and lung metastases in genetically predisposed mice while, in contrast, Rank deletion in osteoblasts did not change OS burden, nor lung metastasis. RANKL–RANK pathway activation does not seem to be directly implicated in OS development, but can be indirectly involved in OS progression. Implication of a potential RANKL reverse signaling in OS cells has not been tested in these studies, but it would be interesting now to take into account the implication of RANKL transduction on osteoblasts [32] (Figure 1). Antibodies against RANKL and the whole-body deletion of RANKL could disrupt the coupling between bone resorption and formation and modify the progression of OS by inhibiting the transduction of RANKL on osteoblasts and on OS cells expressing RANKL (Figure 2).

3. MSCs in OS Microenvironment

3.1. MSCs as Sensors and Modulators of OS Microenvironment

In OS, interactions between the tumor parenchyma and the non-tumor stroma are required during tumor development and metastatic progression [60]. MSCs are sensors of their microenvironment as they express multiple growth factors and chemokine signaling receptors. They also modulate their microenvironment as they secrete components of ECM and a large variety of mitogenic growth factors, cytokines, chemokines, and metalloproteinases (MMPs) [61]. Consequently, MSCs have autocrine and paracrine trophic properties, as their secreted growth factors stimulate cell division and differentiation of MSCs, osteoblasts, and endothelial cells [62]. Furthermore, MSCs also secrete chemokines (C-C motif) ligand 5 (CCL5), stromal derived factor 1 SDF-1 or (C-X-C motif) chemokine 12 CXCL12, interleukin 6 (IL-6), and growth factor vascular endothelial growth factor (VEGF), known, among others, to promote OS growth, metastasis spread, and angiogenesis (reviewed in Reference [63]).

In a previous study, we co-injected OS-associated stromal cells, also named OS-derived cells (OSDCs), with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-HOS OS cells, derived from a human OS, in nude mice [64]. We found several new observations at the histological level. First, the primary OS induced by MNNG-HOS cell injection near the tibia of nude mice appeared as an undifferentiated pleiomorphic sarcoma inducing bone spines (Figure 4a), while some osteoid matrix could be observed in intra-vascular tumor emboli (Figure 4b). Subsequently, following the co-injection of MNNG-HOS cells with OSDCs in nude mice, it was surprising to observe an abundant osteoid matrix (Figure 4c), usually not observed in the MNNG-HOS mouse model, but detected as a hallmark of OS tumor in patients. The second change involved a huge infiltration of peripheral blood mononuclear cells in vessel walls surrounding OS metastases in the lungs (Figure 4d). However, we do not know how MSCs influence OS cells and how MSC-educated OS cells may in turn influence their surrounding cells, leading to more osteoid matrix and higher immune infiltration. In this context, Pietrovito et al. described how MSCs in contact with OS cells gained a cancer-associated fibroblast phenotype and, in turn, how OS-activated MSCs promoted OS cell motility, invasiveness, and transendothelial migration [60]. OS-activated MSCs increased the secretion of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 (alias CCL2), growth-regulated oncogene (GRO)- α (also known as CXCL1), and IL-6 and -8.

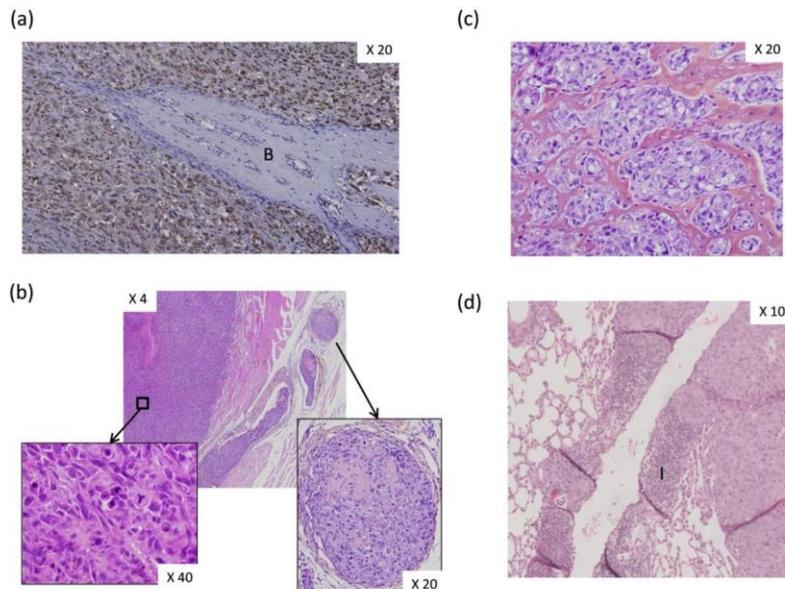


Figure 4. Histological analysis of experimentally induced osteosarcoma (OS) in athymic mice. Human OS-inducing cells (MNNG-HOS cells, CRL-1547, from American Type Culture Collection) were injected either alone (a,b) or co-injected with OS-derived stromal cells (OSDCs) (c,d) at tibial sites of athymic mice. Tumor samples were fixed in 10% buffered formaldehyde, embedded in paraffin wax, sectioned, and stained. Magnifications are indicated. (a) Human OS cells (brown nuclei) were distinguished from mouse cells (blue nuclei) by in situ hybridization using the human-specific repetitive Alu sequence [65]. Bone (B) spine lined by mouse cells was observed. (b) MNNG-HOS-induced tumor section was stained with hematoxylin–eosin–safran solution (HES). Tumor developed in muscle and appeared as an undifferentiated pleomorphic sarcoma (magnification in left panel), while osteoid matrix was observed only in intra-vascular tumor emboli (magnification in right panel). (c) Following co-injection with OSDC [64], MNNG-HOS-induced tumor was visible with abundant osteoid matrix surrounding anaplastic tumor cells. Tumor section was stained with HES. (d) Image of lung metastasis developed from co-injection of MNNG-HOS and OSDCs at paratibial site. Remarkable and non-usual immune cell infiltration (I) was observed in the vessel wall.

MSCs and MSC-derived osteoblasts secrete components of ECM and MMPs. Tumor infiltration of immune cells is tightly dependent on ECM plasticity and proteolysis [66]. As demonstrated by Nicolas-Boluda et al. using imaging technology, T cells may cross the blood vessels but remain trapped in the stroma surrounding tumor nodules [67]. Consequently, T cells do not secrete MMPs allowing matrix lysis, and they then cannot progress alone between dense and tight fibers. Dynamic immune cell infiltration has not yet been imaged in OS and was not yet related to fiber density and MMPs in surrounding ECM; however, induced proteolysis could be a key to achieving success of any immune-cell therapy in OS.

3.2. MSCs as Donors and Acceptors of Extracellular Vesicle Cargo in OS Microenvironment

The secretome of MSCs contains bioactive EVs, which may explain some well-known but unraveled therapeutic roles of MSCs, including their role in bone regeneration [62]. MSC-secreted EVs were shown to bear tumor supportive microRNAs and proteins, but also metabolites such as lactate and

glutamate [68]. A previous study showed metabolic cooperation between OSDCs and OS cells through lactate efflux by MSCs and its uptake by OS cells [69]. This metabolic cooperation can be amplified by lactate released in EVs secreted by OSDCs. Moreover, MSC-secreted EVs were shown to increase OS cell survival and migration, especially under stress induced by serum starvation [70] (Figure 5).

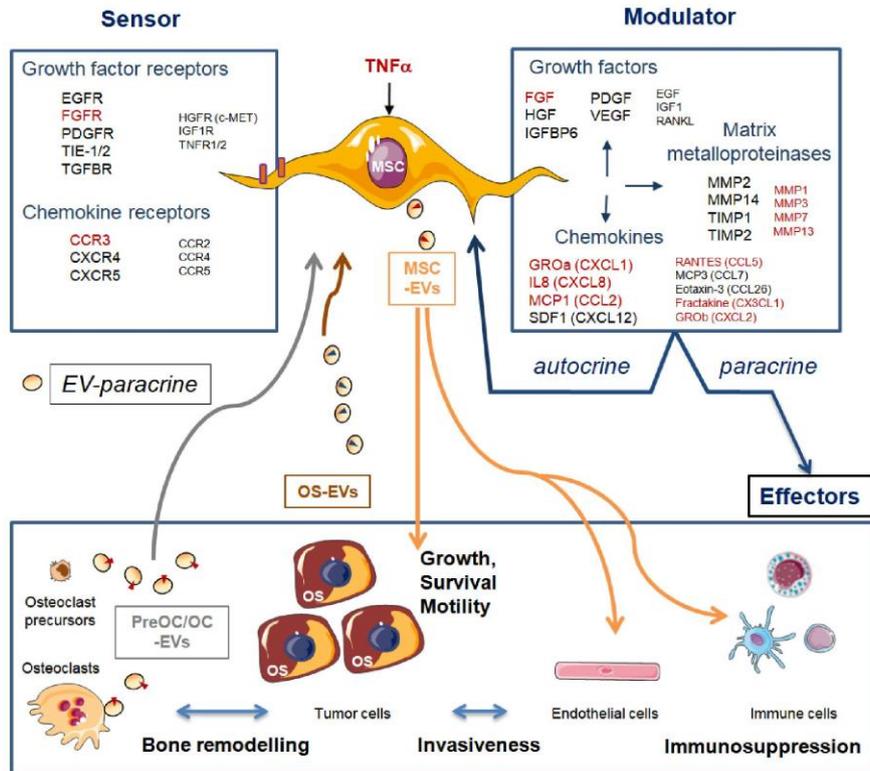


Figure 5. Sensing and modulating roles of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). MSCs constitutively express many mitogenic growth factors, chemokines, and matrix metalloproteinases at various levels. High/intermediate and low levels are represented by large or small font size, respectively. MSCs respond to tumor necrosis factor alpha ($TNF\alpha$) by increasing expression (indicated in red) of some growth factor receptors (GFR), growth factors (GF), chemokine receptors (CR), chemokines, interleukins (IL), and matrix metalloproteinases (MMP) [61]. MSCs have autocrine and paracrine trophic properties, as all of these growth factors are able to act on several effectors of the tumor ecosystem (tumor, bone cells, endothelial cells, and immune cells). MSCs can also secrete extracellular vesicles (EVs) that convey diverse contents (see text for details), and they can receive information through EVs from bone pre-osteoclasts (pre-OC) and osteoclasts (OC) and tumor cells. EGFR: epithelial GFR; VEGFR: vascular endothelial GFR; TIE-1: angiopoietin receptor; TGFBFR: transforming growth factor beta receptor; MMP: tissue inhibitors of MMP; CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand; CCL: chemokine (C-C motif) ligand; GRO α/β : growth-regulated oncogene alpha/beta (also known as CXCL1/2); MCP1/3: monocyte chemoattractant protein (also known as CCL2/7); SDF1: stromal cell-derived factor (also known as CXCL12); RANTES: Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted (alias CCL5).

Gebraad et al. isolated EVs from lipopolysaccharide-activated monocytes and RANKL-activated osteoclasts, both EVs bearing RANK, and observed EV effects on gene expression and protein secretion

of MSCs [71]. EVs secreted by activated monocytes, but not those secreted by osteoclasts, promoted the expression of MMP genes such as MMP3 and MMP1, and secretion of the chemokine CXCL5. The same group showed that OS-secreted EVs on MSCs promoted expression of *MMP1*, *VEGF-A*, and intercellular adhesion molecule (*ICAM1*) genes, which in turn may stimulate not only bone remodeling, but also tumor angiogenesis and metastasis [72].

EVs secreted by OS induced hypomethylation on long interspersed elements (LINE-1) of MSCs [72]. Hypomethylation on LINE-1 retro-transposons correlates with chromosomal instability and may drive oncogenic effects [73]. Genomic instability in MSCs links back to the fact that MSCs have been proposed as cells of origin for high-grade OS [74], which is characterized by complex genetic rearrangements [64]. Large genomic studies have demonstrated that high-grade OS presents one of the highest levels of chromosomal instability associated with hyper-mutations. However, the molecular mechanisms initiating and underlying such huge chromosomal rearrangements are still unknown in the pathogenesis of OS [75,76].

Endo-Munoz et al. observed that some metastatic OS cell lines, including the KHOS cell line (CRL-1544 from American Type Culture Collection), produce high level of the protease urokinase plasminogen activator (uPA) and of its receptor (uPAR), leading to an autocrine loop of activation [77]. They showed that uPAR activation drives ERK phosphorylation and stimulates in vitro migration and in vivo propagation of OS cells. Moreover they demonstrated that KHOS cells produce EVs bearing uPA, which may be biologically active. Additionally, they identified a paracrine uPA axis involving stromal cells in mouse bone marrow explants cultured for 6 days in the presence of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF or CSF-1). These mouse stromal cells were not characterized by surface marker analysis, but likely contained a large fraction of monocytes and/or hematopoietic stem cells. The implication of MSCs in this uPA paracrine activation of OS cells was not shown, whereas uPA is a well-known activator of MSCs mobilization and transendothelial migration during tissue repair [78]. Above all, they identified uPA inhibition as a promising therapeutic strategy to prevent metastatic spread in OS patients. In a mouse model of OS, OS-secreted EVs bearing TGF- β induced a pro-tumorigenic and pro-metastatic phenotype of MSCs through increased IL-6 secretion and activation of STAT3 signaling pathways in OS cells [79]. This study showed how MSCs that have been conditioned or educated by OS-EVs may favor a tumor's progression in its microenvironment.

MSC-secreted EVs may be also involved in revascularization following treatment-induced hypoxia. Indeed, EVs released by hypoxia-treated MSCs have increased angiogenesis through activation of the protein kinase A in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [80]. EVs from MSCs have been described as able to act on endothelial cells to deliver angiogenic signals [81], especially in hypoxic and ischemic conditions [82,83]. In the bone context, pro-angiogenic effects of MSC-derived EVs have been shown in an osteonecrosis model [84,85]. Angiogenic properties of MSC-EVs have not been explored yet in OS. EVs are able to transfer growth factors, cytokines, and nutrients, as presented in this review, but can also transfer also nucleic acids. DNA can be expelled from cells by EV release during drug-induced senescence in order to maintain cellular homeostasis [86], whereas microRNAs contained in EVs can contribute to cell communication in bone sarcomas [87].

Finally, the well-known immunosuppressive effects of MSCs can be mediated by their EVs, as suggested by recent results of a clinical trial involving patients with chronic kidney disease [88] and in preclinical model of osteoarthritis [89]. MSC-secreted EVs bearing TGF- β -induced gene product-h3 (TGF β I/BIGH3) could ameliorate osteoarthritis, however they can worsen tumor development by suppressing the activity of immune cells.

4. Vascular Microenvironment in OS Biology

4.1. Physiologic Angiogenesis during Bone Development

During both normal development and regenerative processes, blood vessels are major actors in bone biology, providing all necessary nutrients and oxygen to the highly dynamic bone tissue [90].

Beside their role as an efficient transport network for molecules and hematopoietic cells, blood vessels also support bone formation and homeostasis [91]. In long bones, the vasculature has a unique complex architecture, composed of a set of arteries penetrating the cortical zone and forming a heterogeneous network of capillaries, drained by a central vein [92]. New insights into the anatomical architecture and physiology of the vascular system in long bones have emerged with the description of trans-cortical microvessels originating in the bone marrow and forming connections between the endosteal and periosteal circulation [93]. Recently, a new bone-specific capillary subtype was identified in mouse juvenile tibia [94]. It is characterized by type-H endothelial cells that are rich in CD31^{high} Endomucin^{high} and are specifically localized close to the growth plate in the metaphysis and in the endosteal regions. During bone growth and modeling, these type-H cells have high proliferative capacities and are responsible for promoting the bone angiogenesis required for long bone growth. Furthermore, these type-H capillaries provide a favorable niche for Osterix⁺ osteoprogenitors, as they couple angiogenesis to osteogenesis through hypoxia-induced secreted Notch-ligand Noggin [94,95]. These populations of endothelial cells, the amount of which decreased with age in mice, have also been described in humans and have been proposed as an indicator of bone loss [96]. The roles of these bone-specific endothelial populations still needs to be elucidated in the context of bone tumor angiogenesis.

4.2. Neo-Vascularization in OS

Vascularization is an essential factor for tumor growth and dissemination, providing oxygen and nutrients, and supporting intravasation and extravasation of cancer cells. Elaboration of a tumor-dedicated vascular environment is one of the main hallmarks of cancer [97], and the formation of a tumor vascular network relies mainly on tumor piracy of physiological sprouting neo-angiogenesis mechanisms from existing vessels. Nevertheless, additional processes like vasculogenesis and vascular mimicry may also contribute to the expansion of a tumor vascular network [98].

Tumor angiogenesis is initiated by environmental stresses (hypoxia, acidosis) leading to disequilibrium of the pro-/anti-angiogenic balance, and consequently to the elevated expression of pro-angiogenic factors such as hypoxia-induced factor (HIF) and VEGF. OSs are highly vascularized bone tumors, lying in a hypoxic and acidic bone microenvironment. How neovascularization occurs in OS remains poorly understood. Nevertheless, OSs appear preferentially in the region of bone growth close to the metaphysis, where type-H endothelial cells promoting angiogenesis are located [94,95], suggesting a possible implication of these cells in OS neo-angiogenesis. In tumors, it is commonly admitted that neo-angiogenesis sprouting from pre-existing vessels is the most relevant process of angiogenesis, but the implication of endothelial progenitors cells (EPCs), able to differentiate into mature endothelial cells, has to be mentioned in tumor vascular growth, even if there is less of a consensus on these cells' involvement [99]. EPCs may be recruited from their initial location in the bone marrow to the tumor site, or EPCs may reside in the tumor microenvironment, where tumors and stromal cells can provide plasticity and differentiation paracrine signals to EPCs. In Ewing sarcoma bone tumor, bone marrow EPC-induced vasculogenesis has been identified as an essential step of neovascularization and is crucial for tumor growth, with 10% of neo-vessels containing bone-marrow-derived cells [100]. In OS, a role for EPCs in neovascularization was also recently highlighted in an *in vitro* rat model, where co-injection of encapsulated OS cells with EPCs enhanced tumor vascularization [101]. In that case, OS rat tumor cells promoted migration and angiogenic properties of EPCs, through their specific secretome of angiogenesis-related factors (VEGF, TGF- β 1, MCP-1, Activin A, and OPN).

Initially described in uveal melanoma, vascular mimicry, an alternative process to angiogenesis and vasculogenesis, is characterized by the *de novo* formation of perfusable, matrix-rich, vasculogenic-like micro-channels generated by transformation of aggressive tumor cells [102,103]. OS tumors appear to develop such an endothelial-free tumor-derived vasculogenic network, as vascular mimicry is found in 22.7% of osteoblastic-type OS samples and associated with unfavorable prognosis [104,105]. Human OS cell lines (U2OS [106], MG-63 [105]) and aggressive canine cell lines [107] are able to form vessel-like structures in three-dimensional cultures. Vascular mimicry mechanisms remain largely unknown,

often being assessed via inappropriate and biased in vitro assays [108]. Nevertheless, a subpopulation of OS tumor cells co-expressing high levels of both VEGF and its receptor VEGFR-1 has been described as an important factor of aggressiveness [109]. This autocrine VEGF/VEGFR-1 signaling, associated with increased tumor growth and tumor vascularity, may possibly confer to OS cells the capacity to develop vasculogenic properties, leading to vascular mimicry. In fact, silencing *VEGF* suppresses vasculogenic mimicry in OS in vitro [110].

For many years, pro-angiogenic factors like VEGFs and angiopoietins have been considered paracrine soluble factors secreted by tumor cells and measurable in patient serum. However, EVs now appear to be essential players of intercellular communication, especially in tumors and in particular in the dialogue promoting angiogenesis. Indeed, stimulation of angiogenesis by tumor-derived EV cargo has been highlighted in numerous tumors [111]. In the context of OS, two recent studies established the pro-angiogenic role of OS-EVs through their cargo containing angiocrines and angiogenesis-related miRNAs [112,113].

4.3. Vascular and Angiogenic Factors in OS Patients

Several analyses of cohorts of OS patients have revealed the importance of neo-vascularization markers in patient samples. Amplification of genes in the VEGF pathway, in particular *VEGF-A*, has been described in OS patients, and was confirmed at the protein level [114]. Expression of high VEGF is positively associated with tumor stages and with metastasis [115,116]. Accordingly, a significant increase in vascularity density appears to be a hallmark of primary OS tumor in metastatic vs. non-metastatic patients [117]. Indeed, several clinical studies correlated high expression of VEGF in biopsies with worse disease-free survival and lower overall survival either in untreated [115] or in pre-operative treated patients [118]. Along these lines, a systematic review issued from a meta-analysis including 559 patients from 12 retrospective studies suggested that VEGF expression could be considered an effective biomarker of prognosis on OS patients [119]. On the other hand, conclusions drawn from another meta-analysis [120] underlined the importance of considering heterogeneity and geographic origin of patients. Beside VEGF, the expression of its receptor VEGFR-2 is increased in OS as compared to normal bone tissues, and high VEGFR-2 expression is associated with poor prognosis [121]. Investigation of angiogenic circulating factors also revealed that serum concentration of VEGF in bone sarcoma (Ewing sarcoma, OS, chondrosarcoma) was higher than in healthy samples or benign tumors [122]. The prognostic value of circulating VEGF was addressed in one study [123], as patients with metastasis at diagnosis or within a year of diagnosis had significantly higher serum levels of VEGF than non-metastatic patients without early metastatic disease. Level of circulating VEGF was independent of the tumor size and serum concentrations of two angiogenic factors, FGF2 and placental growth factor (PGF) were not different in metastatic vs. non-metastatic stage patients. Therefore, considering tissue or circulating angiogenic factors as objective prognostic factors still needs to be evaluated in larger prospective studies.

4.4. Targeting the Vascular Microenvironment with Anti-Angiogenic Agents

Targeting neo-vascularization has been considered in OS, with several Phase I/II clinical trials conducted during the past decade, mainly in advanced-stage OS [124]. The most promising clinical trials have been those including anti-angiogenic agents targeting VEGFRs, such as sorafenib alone [125] or associated with everolimus, an inhibitor of mTOR2 [126]. These trials published by the Italian Sarcoma Group in recurrent OS showed clinical benefits with an increase in 4–6 months progression-free survival for 43–46% of patients. On the other side, associating the well-described anti-VEGF antibody bevacizumab with pre- and post-operative chemotherapies in OS patients with resectable and localized OS did not improve the percentage of good responders to neo-adjuvant therapy, nor did it improve the outcomes of patients. Nonetheless, the treatment could induce post-surgical wound healing troubles [127]. In one case of spinal OS, association of sorafenib with the antibody denosumab, targeting RANKL present in the osteoid matrix, led to an efficient metabolic tumor regression [29]. A recent

anti-angiogenic therapeutic strategy explored in preclinical studies is the targeting of VEGFR-2, a VEGF receptor expressed mainly on angiogenic vessels but also on OS tumor cells [121]. Results showed that the highly specific VEGFR-2 inhibitor, apatinib, was associated with direct anti-tumoral activity through VEGFR2/STAT3/BCL2 signaling [121,128]. Targeting VEGFR-2 with the monoclonal antibody ramucirumab was also shown to exert anti-angiogenic activity in vitro [129]. Surprisingly, injection of anti-mouse Vegfr-2 antibody in preclinical OS pediatric cancer models did not affect tumor growth, even when combined with cytotoxic chemotherapy using doxorubicin, suggesting that targeting both tumor and vascular microenvironment is mandatory in OS, even if it is difficult to achieve efficiently.

5. Cells of the Immune System in OS Microenvironment

The immune context of the OS microenvironment is mainly composed of tumor-associated macrophages (TAMs), with a significant number of dendritic, lymphoid, and myeloid cells [130]. Indeed, both myeloid and lymphoid cells have been detected in OS [130,131]. In contrast to the majority of epithelial tumors [132,133], studies have shown that TAMs were present in the immune infiltrate in a high proportion of biopsies and that an increased infiltration was associated with reduced metastasis and improved survival in high-grade OS [117,134,135]. The mechanism by which TAMs inhibit metastasis in OS remains unclear, but the observation by different teams that OSs were infiltrated with a heterogeneous population of pro-inflammatory M1 and anti-inflammatory M2 TAMs may suggest that in this precise case, the constitutive presence of M2 macrophages may have an anti-metastatic rather than a pro-metastatic effect [134]. Based on these data, OS patients were enrolled in a randomized clinical trial using the macrophage-activating agent mifamurtide in addition to a standard chemotherapy regimen, resulting in a significant improvement in 6 year overall survival [136,137]. Similar results were obtained in earlier studies in human and canine OS [138–140]. Mifamurtide has thus become the first new therapeutic drug used for the treatment of OS in the last 20 years [137]. More recently, the SARCOMA13 clinical trial (NCT03643133) proposed the use of the combination of mifamurtide with conventional chemotherapy in the treatment of French OS patients after surgery.

The observation that cytotoxic CD8 T lymphocytes are less abundant than myeloid cells in OS biopsies suggests that OSs are poorly immunogenic tumors, with a lack of tumor neo-antigens and scarce infiltrate of immune cytotoxic lymphocytes. This would define OSs as cold tumors, characteristic of pediatric tumors [141]. In recent studies, the presence of CD8 T lymphocytes was described in half of OS patient samples at diagnosis, and their presence was significantly associated with a lower rate of metastasis [135,142]. In addition, the ratio of intra-tumor CD8 T cells to regulatory immunosuppressive FOXP3 CD4 T cells in initial biopsies allowed discrimination of OS patients with prolonged survival from non-survivors [142]. As for most other tumors, OS infiltration by antigen presenting cells (APCs), including CD1a dendritic cells (DCs) and CD68 macrophages, has been correlated with poorer prognosis. Moreover, tumor programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression has been associated with a poorer 5 year event-free survival [143]. Programmed death 1 (PD-1) is expressed at the surface of activated CD8 T lymphocytes, B lymphocytes, and natural killer (NK) cells. The involvement of the PD-1/PD-L1 checkpoint in OS varies from one study to another. In a recent systematic meta-analysis of 14 studies with a total of 868 patients, OS patients had 14–75% higher PD-L1 expression in tumor tissues, which was significantly correlated with metastasis, mortality risk, and poorer overall survival [144,145]. However, PD-L1 staining was detected in few OS specimens in two independent studies [135,146], which suggested that the role of the PD1/PD-L1 checkpoint is not predominant in the pathogenesis of OS. Nevertheless, several clinical trials using targeting PD-1/PD-L1 have been proposed. Among them, only one using anti-PD-L1 avelumab (NCT03006848) is recruiting, while three trials using anti-PD-1, pembrolizumab (NCT02301039 and NCT03013127), or nivolumab (NCT02304458) are either not recruiting or suspended, likely due to risk of immune-related side effects such as skin reactions, pneumonitis, colitis, and hepatitis [147,148].

With the extraordinary clinical success of adoptive therapies based on the use of chimeric antigen receptor (CAR) engineered T cells in B-cell malignancies [149], attempts to develop such therapeutic strategies are emerging in solid tumors. In the context of OS, CAR-T-cell therapy still remains largely unexplored. The main challenge of this immune approach is the identification of an optimal target expressed restrictively on tumor cells, in order to avoid toxicity and to selectively eradicate cancer cells. Up to now, few potential targets have been identified in OS [150]—the Human epidermal growth factor 2 (HER2), the Insulin-like Growth factor receptor-1 (IGFR1), and the tyrosine orphan-like receptor 1 (ROR1). HER-2 CAR-T cells have been shown to drive tumor regression in an animal model [151]. Tested in a phase I/II clinical trial in HER-2 positive sarcoma patients, infusion of HER-2 CAR-T was shown to induce no toxicity, and the 6 week stability of these cells [152] paved the way for further trials. Preclinical studies highlighted that IGFR1 and ROR1 that are overexpressed in OS cells lines are also relevant targets. An adoptive transfer of IGFR1-CAR and ROR1-CAR T cells derived from a sarcoma patient significantly suppressed tumor growth in both localized and disseminated sarcoma xenograft models [153]. In OS, the main issues with CAR-T cells would be accessing their target through a stiff osteoid bone tumor matrix, allowing their survival in a local immunosuppressive microenvironment. Despite promising preclinical results, launching the use of CAR-T cell therapies in OS is still a matter of debate.

6. The Multi-Kinase Inhibitors (MKIs) as Promising Therapies in OS Treatment

Targeted therapies using MKIs proved their efficacy initially in renal cell cancer, hepatocellular carcinoma, and thyroid cancer [154]. These molecules exert an anti-cancer activity by simultaneously targeting several kinases. Initially developed as potent VEGFR signaling inhibitors, it is now admitted that their anti-tumor action depends on both the inhibition of angiogenic but also non-angiogenic pathways.

In the context of OS, several *in vitro* and preclinical results have highlighted the relevance of MKIs as potential therapeutic tools. Anlotinib, a VEGFR2 and MET kinase inhibitor, suppressed tumor growth and metastasis and increased chemosensitivity of OS cells [155]. Moreover, cabozantinib, an inhibitor of c-MET (also known as HGFR), VEGFR-2, c-KIT, and TIE-2, appears to block proliferation and migration of OS cells via autophagy. Additionally, it acts on the bone microenvironment by decreasing RANKL and increasing OPG production by osteoblasts [156], which results in a strong inhibition of RANK-positive OS cell proliferation [157]. Exploration of MKIs in clinical trials (Table 1) started initially with sorafenib [126], as described above. Subsequently, a therapeutic strategy using regorafenib, an MKI that targets angiogenic (VEGFR1-3, TIE-2), stromal (PDGFR- β , FGFR), and oncogenic kinases (KIT, RET, and RAF) has been tested. Notably, two clinical trials [158,159] were conducted in patients with recurrent, progressive, metastatic OS after failure of conventional chemotherapy and demonstrated a significant extension of progression-free survival. These studies highlighted the potential therapeutic value of MKIs in very aggressive and resistant OS. These very promising results paved the way for further exploration of this type of targeted therapy. In this context, pazopanib, a MKI inhibiting VEGFR1-3, PDGFR α/β , and c-KIT, showed objective responses in metastatic or relapsed patients [160,161]. Preclinical and *in vitro* data reinforced the relevance of MKI in OS. One phase II multi-centric clinical trial has just been published, exploring cabozantinib in advanced relapsed OS and Ewing sarcoma [162]. Encouraging responses were reported for both pathologies. In OS, 12% patients presented a 6 months objective response and 33% patients had no progression in 6 months. Additionally, a phase II clinical study in relapsed refractory OS (NCT04154189) starting in February 2020 involves lenvatinib, a MKI inhibiting VEGFR1-3, FGFR1-4, PDGFR α , KIT, and RET and used in thyroid cancer [163].

Table 1. Multi-kinases inhibitors (MKI) in Osteosarcoma (OS): Molecular and Cellular Targets and Clinical Trials.

MKI	Targets		Clinical Trials ClinicalTrials.gov
	Molecular	Cellular	
Sorafenib	RAF, KIT, FLT3, RET VEGFR1-3 PDGFR β	Tumor Endothelial Stromal	NCT 00889057 [125] NCT 01804374 [126]
Regorafenib	KIT, RET, RAF VEGFR1-3, Tie-2 PDGFR β FGFR	Tumor Endothelial Stromal	NCT 0238244 [159] NCT 02048371 [158]
Pazopanib	KIT, FMS VEGFR1-3 PDGFR $\alpha\beta$ FGFR	Tumor Endothelial Stromal	[160]
Cabozantinib	MET, KIT, RET VEGFR-2, Tie-2	Tumor Osteoblasts Endothelial	NCT02243605 [162]
Lenvatinib	KIT, RET VEGFR-1, 2, 3 PDGFR- α FGFR1-4	Tumor Endothelial Stromal	NCT04154189

7. Discussion

In the past decade, the supportive role of the bone microenvironment in the tumor progression and metastatic dissemination of OS has been intensively documented. This culminates in the characterization of a vicious cycle established between OS cells and osteoclasts, where tumors, by promoting osteoclastic activity, indirectly lead to the degradation of bone matrix and to the release of pro-tumor factors initially trapped in the bone matrix.

Intuitively, targeting the bone resorption in order to limit tumor growth thus appeared to be a promising therapeutic option. Therefore, the bisphosphonate ZOL was the first anti-resorptive agent to be explored as a combined treatment for OS. Unfortunately, its translation into the clinical setting was abandoned due to disappointing results obtained in the clinical trial OS2006, since it showed no benefit for OS patients [25]. Along the same line, blocking osteolysis by using denosumab, a humanized antibody directed against RANKL, is no longer considered a potential combined treatment for OS patients. Indeed, if RANK signaling transduces signal in different cell types, including osteoclasts, stromal cells, endothelial cells, and dendritic cells, it is not directly implicated in OS cell division and survival. Importantly, the description of the reverse RANK-RANKL signaling, involving membrane RANKL activation by RANK-bearing EVs, is a new and unexpected regulatory pathway of bone remodeling that has to be considered. Such bidirectional regulation occurring simultaneously in osteoblasts and osteoclasts within a bone multicellular unit has been previously described for Ephrin membrane ligands and their receptors [164]. Therefore, the reverse RANK-RANKL signaling should be explored in other cell types and pathological conditions including OS. Moreover, new anti-RANKL antibodies should be produced to inhibit osteoclasts without effect on osteoblasts.

EVs have now to be considered as key actors of cellular communication in the OS tumor microenvironment ecosystem. EVs originate from the tumor itself, but also from MSCs and osteoclasts. EVs appear to be essential for mediating signals for bone remodeling, angiogenesis, and also for immune responses. EVs modulate gene expression by transferring their cargo to cells and drive communication between cells through many combinations. As reported in this review, EVs are able to transfer growth factors, cytokines, and nutrients. In addition, they can also transfer nucleic acids. Notably, DNA can be expelled from cells by EV release during drug-induced senescence in order to maintain cellular homeostasis [86], whereas microRNAs contained in EVs can contribute to modulating cell communication in bone sarcomas [87]. Blocking EV-mediated signaling would be an

appealing strategy to counteract deleterious and pro-tumor communications in the OS environment. Additionally, EVs are currently being explored as potential vectors of therapies but not yet as targetable entities [165].

Targeting the immune system by the macrophage-activating agent mifamurtide resulted in the most recent improvement of OS therapy since polychemotherapy. However, stimulating the immune system by using antibodies directed against PD-1/PD-L1 in OS is still debated. This debate includes toxic effects of antibodies, poor CD8 T lymphocytes infiltrating OS, no histological evidence of the PD-1/PD-L1 in most OS samples, and no correlation with tumor outcome to date [135].

With the same logic of hitting the microenvironment in order to block tumor progression, targeting the vascular environment, which is particularly developed and supportive in OS, has also been evaluated. If the first clinical trial including the anti-VEGF antibody bevacizumab was disappointing [127], encouraging results emerged from initial clinical trials using the MKI sorafenib, which targets intracellular kinase activity of VEGFRs [125,126]. Since then, several MKIs like regorafenib [158,159], pazopanib [160,161], and more recently cabozantinib, have been reported to have beneficial effects in advanced OS and Ewing sarcoma bone tumors [162]. Accordingly, these agents had promising therapeutic results in selected patients, probably through the combined action on both angiogenic vascular compartment and OS cells in which they inhibit multiple growth factor pathways with potential oncogenic activity (c-MET, c-KIT).

In conclusion, the MKI class of small molecules represents a significant major advance in OS therapy in recent decades, and reinforces the notion that considering OS in its whole ecosystem and thereby targeting several of its components, including EVs, is the way to successful therapies.

Funding: This research was funded by INSERM, CNRS and by the association La Ligue contre le Cancer (Comities 22, 29, 37, 44, 56).

Acknowledgments: The authors are deeply grateful to Prof. Jacques Huot (Laval University, QC, Canada) for his critical reading and comments of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kansara, M.; Teng, M.W.; Smyth, M.J.; Thomas, D.M. Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 722–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gaebler, M.; Silvestri, A.; Haybaeck, J.; Reichardt, P.; Lowery, C.D.; Stancato, L.F.; Zybarth, G.; Regenbrecht, C.R.A. Three-Dimensional Patient-Derived In Vitro Sarcoma Models: Promising Tools for Improving Clinical Tumor Management. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mutsaers, A.J.; Walkley, C.R. Cells of origin in osteosarcoma: Mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone* **2014**, *62*, 56–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gaspar, N.; Océan, B.V.; Pacquement, H.; Bompas, E.; Bouvier, C.; Brisse, H.J.; Castex, M.P.; Cheurfa, N.; Corradini, N.; Delaye, J.; et al. Results of methotrexate-etoposide-ifosfamide based regimen (M-EI) in osteosarcoma patients included in the French OS2006/sarcome-09 study. *Eur. J. Cancer* **2018**, *88*, 57–66. [[CrossRef](#)]
5. Bacci, G.; Lari, S. Current treatment of high grade osteosarcoma of the extremity: Review. *J. Chemother.* **2001**, *13*, 235–243. [[CrossRef](#)]
6. Bishop, M.W.; Janeway, K.A.; Gorlick, R. Future directions in the treatment of osteosarcoma. *Curr. Opin. Pediatrics* **2016**, *28*, 26–33. [[CrossRef](#)]
7. Meyers, P.A.; Schwartz, C.L.; Krailo, M.; Kleinerman, E.S.; Betcher, D.; Bernstein, M.L.; Conrad, E.; Ferguson, W.; Gebhardt, M.; Goorin, A.M.; et al. Osteosarcoma: A randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 2004–2011. [[CrossRef](#)]
8. Allison, D.C.; Carney, S.C.; Ahlmann, E.R.; Hendifar, A.; Chawla, S.; Fedenko, A.; Angeles, C.; Menendez, L.R. A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era. *Sarcoma* **2012**, *2012*, 704872. [[CrossRef](#)]

9. Gianferante, D.M.; Mirabello, L.; Savage, S.A. Germline and somatic genetics of osteosarcoma—Connecting aetiology, biology and therapy. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2017**, *13*, 480–491. [[CrossRef](#)]
10. Chen, X.; Bahrami, A.; Pappo, A.; Easton, J.; Dalton, J.; Hedlund, E.; Ellison, D.; Shurtleff, S.; Wu, G.; Wei, L.; et al. Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 104–112. [[CrossRef](#)]
11. Kovac, M.; Blattmann, C.; Ribi, S.; Smida, J.; Mueller, N.S.; Engert, F.; Castro-Giner, F.; Weischenfeldt, J.; Kovacova, M.; Krieg, A.; et al. Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* **1989**, *8*, 98–101. [[PubMed](#)]
13. Alfranca, A.; Martinez-Cruzado, L.; Tornin, J.; Abarrategi, A.; Amaral, T.; de Alava, E.; Menendez, P.; Garcia-Castro, J.; Rodriguez, R. Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 3097–3113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mathieu, M.; Martin-Jaular, L.; Lavie, G.; Thery, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 9–17. [[CrossRef](#)]
15. Avnet, S.; Longhi, A.; Salerno, M.; Halleen, J.M.; Perut, F.; Granchi, D.; Ferrari, S.; Bertoni, F.; Giunti, A.; Baldini, N. Increased osteoclast activity is associated with aggressiveness of osteosarcoma. *Int. J. Oncol.* **2008**, *33*, 1231–1238. [[CrossRef](#)]
16. Nakashima, T.; Hayashi, M.; Fukunaga, T.; Kurata, K.; Oh-Hora, M.; Feng, J.Q.; Bonewald, L.F.; Kodama, T.; Wutz, A.; Wagner, E.F.; et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1231–1234. [[CrossRef](#)]
17. Martin, T.J.; Sims, N.A. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2015**, *16*, 131–139. [[CrossRef](#)]
18. Lamora, A.; Talbot, J.; Mullard, M.; Brounais-Le Royer, B.; Redini, F.; Verrecchia, F. TGF-beta Signaling in Bone Remodeling and Osteosarcoma Progression. *J. Clin. Med.* **2016**, *5*, 96. [[CrossRef](#)]
19. Asmane, I.; Watkin, E.; Alberti, L.; Duc, A.; Marec-Berard, P.; Ray-Coquard, I.; Cassier, P.; Decouvelaere, A.V.; Ranchere, D.; Kurtz, J.E.; et al. Insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) exclusive nuclear staining: A predictive biomarker for IGF-1R monoclonal antibody (Ab) therapy in sarcomas. *Eur. J. Cancer* **2012**, *48*, 3027–3035. [[CrossRef](#)]
20. Heymann, D.; Ory, B.; Blanchard, F.; Heymann, M.F.; Coipeau, P.; Charrier, C.; Couillaud, S.; Thiery, J.P.; Gouin, F.; Redini, F. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* **2005**, *37*, 74–86. [[CrossRef](#)]
21. Ohba, T.; Cole, H.A.; Cates, J.M.; Slosky, D.A.; Haro, H.; Ando, T.; Schwartz, H.S.; Schoenecker, J.G. Bisphosphonates inhibit osteosarcoma-mediated osteolysis via attenuation of tumor expression of MCP-1 and RANKL. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **2014**, *29*, 1431–1445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lamoureux, F.; Richard, P.; Wittrant, Y.; Battaglia, S.; Pilet, P.; Trichet, V.; Blanchard, F.; Gouin, F.; Pitard, B.; Heymann, D.; et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: Blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 7308–7318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chen, Y.; Di Grappa, M.A.; Molyneux, S.D.; McKee, T.D.; Waterhouse, P.; Penninger, J.M.; Khokha, R. RANKL blockade prevents and treats aggressive osteosarcomas. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 317ra197. [[CrossRef](#)]
24. Rousseau, J.; Escriou, V.; Lamoureux, F.; Brion, R.; Chesneau, J.; Battaglia, S.; Amiaud, J.; Scherman, D.; Heymann, D.; Redini, F.; et al. Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **2011**, *26*, 2452–2462. [[CrossRef](#)]
25. Piperno-Neumann, S.; Le Deley, M.C.; Redini, F.; Pacquement, H.; Marec-Berard, P.; Petit, P.; Brisse, H.; Lervat, C.; Gentet, J.C.; Entz-Werle, N.; et al. Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): A randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 1070–1080. [[CrossRef](#)]
26. Ouyang, Z.; Li, H.; Zhai, Z.; Xu, J.; Dass, C.R.; Qin, A.; Dai, K. Zoledronic Acid: Pleiotropic Anti-Tumor Mechanism and Therapeutic Outlook for Osteosarcoma. *Curr. Drug Targets* **2018**, *19*, 409–421. [[CrossRef](#)]

27. Endo-Munoz, L.; Cumming, A.; Rickwood, D.; Wilson, D.; Cueva, C.; Ng, C.; Strutton, G.; Cassady, A.I.; Evdokiou, A.; Sommerville, S.; et al. Loss of osteoclasts contributes to development of osteosarcoma pulmonary metastases. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7063–7072. [[CrossRef](#)]
28. Avril, P.; Le Nail, L.R.; Brennan, M.A.; Rosset, P.; De Pinieux, G.; Layrolle, P.; Heymann, D.; Perrot, P.; Trichet, V. Mesenchymal stem cells increase proliferation but do not change quiescent state of osteosarcoma cells: Potential implications according to the tumor resection status. *J. Bone Oncol.* **2016**, *5*, 5–14. [[CrossRef](#)]
29. Cathomas, R.; Rothermundt, C.; Bode, B.; Fuchs, B.; von Moos, R.; Schwitter, M. RANK ligand blockade with denosumab in combination with sorafenib in chemorefractory osteosarcoma: A possible step forward? *Oncology* **2015**, *88*, 257–260. [[CrossRef](#)]
30. Savvidou, O.D.; Bolia, I.K.; Chloros, G.D.; Papanastasiou, J.; Koutsouradis, P.; Papagelopoulos, P.J. Denosumab: Current Use in the Treatment of Primary Bone Tumors. *Orthopedics* **2017**, *40*, 204–210. [[CrossRef](#)]
31. Lassen, N.E.; Andersen, T.L.; Ploen, G.G.; Soe, K.; Hauge, E.M.; Harving, S.; Eschen, G.E.T.; Delaisse, J.M. Coupling of Bone Resorption and Formation in Real Time: New Knowledge Gained From Human Haversian BMUs. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **2017**, *32*, 1395–1405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ikebuchi, Y.; Aoki, S.; Honma, M.; Hayashi, M.; Sugamori, Y.; Khan, M.; Kariya, Y.; Kato, G.; Tabata, Y.; Penninger, J.M.; et al. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *Nature* **2018**, *561*, 195–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Huynh, N.; VonMoss, L.; Smith, D.; Rahman, I.; Felemban, M.F.; Zuo, J.; Rody, W.J., Jr.; McHugh, K.P.; Holliday, L.S. Characterization of Regulatory Extracellular Vesicles from Osteoclasts. *J. Dent. Res.* **2016**, *95*, 673–679. [[CrossRef](#)]
34. Cappariello, A.; Rucci, N. Tumour-Derived Extracellular Vesicles (EVs): A Dangerous “Message in A Bottle” for Bone. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4805. [[CrossRef](#)]
35. Garimella, R.; Washington, L.; Isaacson, J.; Vallejo, J.; Spence, M.; Tawfik, O.; Rowe, P.; Brotto, M.; Perez, R. Extracellular Membrane Vesicles Derived from 143B Osteosarcoma Cells Contain Pro-Osteoclastogenic Cargo: A Novel Communication Mechanism in Osteosarcoma Bone Microenvironment. *Transl. Oncol.* **2014**, *7*, 331–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lee, J.A.; Jung, J.S.; Kim, D.H.; Lim, J.S.; Kim, M.S.; Kong, C.B.; Song, W.S.; Cho, W.H.; Jeon, D.G.; Lee, S.Y.; et al. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. *Pediatric Blood Cancer* **2011**, *56*, 738–743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Branstetter, D.; Rohrbach, K.; Huang, L.Y.; Soriano, R.; Tometsko, M.; Blake, M.; Jacob, A.P.; Dougall, W.C. RANK and RANK ligand expression in primary human osteosarcoma. *J. Bone Oncol.* **2015**, *4*, 59–68. [[CrossRef](#)]
38. Marley, K.; Bracha, S.; Seguin, B. Osteoprotegerin activates osteosarcoma cells that co-express RANK and RANKL. *Exp. Cell Res.* **2015**, *338*, 32–38. [[CrossRef](#)]
39. Toledo, S.R.; Oliveira, I.D.; Okamoto, O.K.; Zago, M.A.; de Seixas Alves, M.T.; Filho, R.J.; Macedo, C.R.; Petrilli, A.S. Bone deposition, bone resorption, and osteosarcoma. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **2010**, *28*, 1142–1148. [[CrossRef](#)]
40. Yoshikawa, H.; Shimizu, K.; Nakase, T.; Takaoka, K. Periosteal sunburst spiculation in osteosarcoma. A possible role for bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1994**, *308*, 213–219.
41. Chan, C.K.F.; Gulati, G.S.; Sinha, R.; Tompkins, J.V.; Lopez, M.; Carter, A.C.; Ransom, R.C.; Reinisch, A.; Wearda, T.; Murphy, M.; et al. Identification of the Human Skeletal Stem Cell. *Cell* **2018**, *175*, 43–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Marie, P.J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *473*, 98–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ducy, P.; Zhang, R.; Geoffroy, V.; Ridall, A.L.; Karsenty, G. Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **1997**, *89*, 747–754. [[CrossRef](#)]
44. Komori, T.; Yagi, H.; Nomura, S.; Yamaguchi, A.; Sasaki, K.; Deguchi, K.; Shimizu, Y.; Bronson, R.T.; Gao, Y.H.; Inada, M.; et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **1997**, *89*, 755–764. [[CrossRef](#)]

45. Nishimura, R.; Wakabayashi, M.; Hata, K.; Matsubara, T.; Honma, S.; Wakisaka, S.; Kiyonari, H.; Shioi, G.; Yamaguchi, A.; Tsumaki, N.; et al. Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33179–33190. [[CrossRef](#)]
46. Feng, X.H.; Derynck, R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21*, 659–693. [[CrossRef](#)]
47. Janssens, K.; ten Dijke, P.; Janssens, S.; Van Hul, W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr. Rev.* **2005**, *26*, 743–774. [[CrossRef](#)]
48. Juarez, P.; Guise, T.A. TGF-beta in cancer and bone: Implications for treatment of bone metastases. *Bone* **2011**, *48*, 23–29. [[CrossRef](#)]
49. Maeda, S.; Hayashi, M.; Komiya, S.; Imamura, T.; Miyazono, K. Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J.* **2004**, *23*, 552–563. [[CrossRef](#)]
50. Verrecchia, F.; Redini, F. Transforming Growth Factor-beta Signaling Plays a Pivotal Role in the Interplay Between Osteosarcoma Cells and Their Microenvironment. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 133. [[CrossRef](#)]
51. Lamora, A.; Talbot, J.; Bougras, G.; Amiaud, J.; Leduc, M.; Chesneau, J.; Taurrelle, J.; Stresing, V.; Le Deley, M.C.; Heymann, M.F.; et al. Overexpression of smad7 blocks primary tumor growth and lung metastasis development in osteosarcoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2014**, *20*, 5097–5112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Ornitz, D.M.; Marie, P.J. Fibroblast growth factors in skeletal development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2019**, *133*, 195–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Zhou, W.Y.; Zheng, H.; Du, X.L.; Yang, J.L. Characterization of FGFR signaling pathway as therapeutic targets for sarcoma patients. *Cancer Biol. Med.* **2016**, *13*, 260–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Weekes, D.; Kashima, T.G.; Zanduetta, C.; Perurena, N.; Thomas, D.P.; Sunters, A.; Vuillier, C.; Bozec, A.; El-Emir, E.; Miletich, I.; et al. Regulation of osteosarcoma cell lung metastasis by the c-Fos/AP-1 target FGFR1. *Oncogene* **2016**, *35*, 2948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Danieau, G.; Morice, S.; Redini, F.; Verrecchia, F.; Royer, B.B. New Insights about the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway in Primary Bone Tumors and Their Microenvironment: A Promising Target to Develop Therapeutic Strategies? *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3751. [[CrossRef](#)]
56. Amjadi-Moheb, F.; Akhavan-Niaki, H. Wnt signaling pathway in osteoporosis: Epigenetic regulation, interaction with other signaling pathways, and therapeutic promises. *J. Cell. Physiol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
57. Goldstein, S.D.; Trucco, M.; Bautista Guzman, W.; Hayashi, M.; Loeb, D.M. A monoclonal antibody against the Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 inhibits osteosarcoma metastasis in a preclinical model. *Oncotarget* **2016**, *7*, 21114–21123. [[CrossRef](#)]
58. Yang, Y.; Yang, R.; Roth, M.; Piperdi, S.; Zhang, W.; Dorfman, H.; Rao, P.; Park, A.; Tripathi, S.; Freeman, C.; et al. Genetically transforming human osteoblasts to sarcoma: Development of an osteosarcoma model. *Genes Cancer* **2017**, *8*, 484–494. [[CrossRef](#)]
59. Navet, B.; Ando, K.; Vargas-Franco, J.W.; Brion, R.; Amiaud, J.; Mori, K.; Yagita, H.; Mueller, C.G.; Verrecchia, F.; Dumars, C.; et al. The Intrinsic and Extrinsic Implications of RANKL/RANK Signaling in Osteosarcoma: From Tumor Initiation to Lung Metastases. *Cancers* **2018**, *10*, 398. [[CrossRef](#)]
60. Pietrovito, L.; Leo, A.; Gori, V.; Lulli, M.; Parri, M.; Becherucci, V.; Piccini, L.; Bambi, F.; Taddei, M.L.; Chiarugi, P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote invasiveness and transendothelial migration of osteosarcoma cells via a mesenchymal to amoeboid transition. *Mol. Oncol.* **2018**, *12*, 659–676. [[CrossRef](#)]
61. Ponte, A.L.; Marais, E.; Gallay, N.; Langonne, A.; Delorme, B.; Herault, O.; Charbord, P.; Domenech, J. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* **2007**, *25*, 1737–1745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Humbert, P.; Brennan, M.A.; Davison, N.; Rosset, P.; Trichet, V.; Blanchard, F.; Layrolle, P. Immune Modulation by Transplanted Calcium Phosphate Biomaterials and Human Mesenchymal Stromal Cells in Bone Regeneration. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Zheng, Y.; Wang, G.; Chen, R.; Hua, Y.; Cai, Z. Mesenchymal stem cells in the osteosarcoma microenvironment: Their biological properties, influence on tumor growth, and therapeutic implications. *Stem Cell Res. Ther.* **2018**, *9*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

64. Le Nail, L.R.; Brennan, M.; Rosset, P.; Deschaseaux, F.; Piloquet, P.; Pichon, O.; Le Caignec, C.; Crenn, V.; Layrolle, P.; Herault, O.; et al. Comparison of Tumor- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Patients with High-Grade Osteosarcoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 707. [\[CrossRef\]](#)
65. Brennan, M.A.; Renaud, A.; Amiaud, J.; Rojewski, M.T.; Schrezenmeier, H.; Heymann, D.; Trichet, V.; Layrolle, P. Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem Cell Res. Ther.* **2014**, *5*, 114. [\[CrossRef\]](#)
66. Friedl, P.; Alexander, S. Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity. *Cell* **2011**, *147*, 992–1009. [\[CrossRef\]](#)
67. Nicolas-Boluda, A.; Donnadieu, E. Obstacles to T cell migration in the tumor microenvironment. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *63*, 22–30. [\[CrossRef\]](#)
68. Vallabhaneni, K.C.; Penforis, P.; Dhule, S.; Guillonneau, F.; Adams, K.V.; Mo, Y.Y.; Xu, R.; Liu, Y.; Watabe, K.; Vemuri, M.C.; et al. Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem/stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites. *Oncotarget* **2015**, *6*, 4953–4967. [\[CrossRef\]](#)
69. Bonuccelli, G.; Avnet, S.; Grisendi, G.; Salerno, M.; Granchi, D.; Dominici, M.; Kusuzaki, K.; Baldini, N. Role of mesenchymal stem cells in osteosarcoma and metabolic reprogramming of tumor cells. *Oncotarget* **2014**, *5*, 7575–7588. [\[CrossRef\]](#)
70. Vallabhaneni, K.C.; Hassler, M.Y.; Abraham, A.; Whitt, J.; Mo, Y.Y.; Atfi, A.; Pochampally, R. Mesenchymal Stem/Stromal Cells under Stress Increase Osteosarcoma Migration and Apoptosis Resistance via Extracellular Vesicle Mediated Communication. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0166027. [\[CrossRef\]](#)
71. Gebraad, A.; Kornilov, R.; Kaur, S.; Miettinen, S.; Haimi, S.; Peltoniemi, H.; Mannerstrom, B.; Seppanen-Kajansinkko, R. Monocyte-derived extracellular vesicles stimulate cytokine secretion and gene expression of matrix metalloproteinases by mesenchymal stem/stromal cells. *FEBS J.* **2018**, *285*, 2337–2359. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Mannerstrom, B.; Kornilov, R.; Abu-Shahba, A.G.; Chowdhury, I.M.; Sinha, S.; Seppanen-Kajansinkko, R.; Kaur, S. Epigenetic alterations in mesenchymal stem cells by osteosarcoma-derived extracellular vesicles. *Epigenetics* **2019**, *14*, 352–364. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Weber, B.; Kimhi, S.; Howard, G.; Eden, A.; Lyko, F. Demethylation of a LINE-1 antisense promoter in the cMet locus impairs Met signalling through induction of illegitimate transcription. *Oncogene* **2010**, *29*, 5775–5784. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Cleton-Jansen, A.M.; Anninga, J.K.; Briaire-de Bruijn, I.H.; Romeo, S.; Oosting, J.; Egeler, R.M.; Gelderblom, H.; Taminiou, A.H.; Hogendoorn, P.C. Profiling of high-grade central osteosarcoma and its putative progenitor cells identifies tumorigenic pathways. *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 2064. [\[CrossRef\]](#)
75. Cheng, L.; Pandya, P.H.; Liu, E.; Chandra, P.; Wang, L.; Murray, M.E.; Carter, J.; Ferguson, M.; Saadatzaheh, M.R.; Bijangi-Vishesharaei, K.; et al. Integration of genomic copy number variations and chemotherapy-response biomarkers in pediatric sarcoma. *BMC Med. Genom.* **2019**, *12*, 23. [\[CrossRef\]](#)
76. Smida, J.; Xu, H.; Zhang, Y.; Baumhoer, D.; Ribi, S.; Kovac, M.; von Luettichau, I.; Bielack, S.; O’Leary, V.B.; Leib-Mosch, C.; et al. Genome-wide analysis of somatic copy number alterations and chromosomal breakages in osteosarcoma. *Int. J. Cancer* **2017**, *141*, 816–828. [\[CrossRef\]](#)
77. Endo-Munoz, L.; Cai, N.; Cumming, A.; Macklin, R.; Merida de Long, L.; Topkas, E.; Mukhopadhyay, P.; Hill, M.; Saunders, N.A. Progression of Osteosarcoma from a Non-Metastatic to a Metastatic Phenotype Is Causally Associated with Activation of an Autocrine and Paracrine uPA Axis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133592. [\[CrossRef\]](#)
78. Vallabhaneni, K.C.; Tkachuk, S.; Kiyan, Y.; Shushakova, N.; Haller, H.; Dumler, I.; Eden, G. Urokinase receptor mediates mobilization, migration, and differentiation of mesenchymal stem cells. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *90*, 113–121. [\[CrossRef\]](#)
79. Baglio, S.R.; Lagerweij, T.; Perez-Lanzon, M.; Ho, X.D.; Leveille, N.; Melo, S.A.; Cleton-Jansen, A.M.; Jordanova, E.S.; Roncuzzi, L.; Greco, M.; et al. Blocking Tumor-Educated MSC Paracrine Activity Halts Osteosarcoma Progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2017**, *23*, 3721–3733. [\[CrossRef\]](#)
80. Xue, C.; Shen, Y.; Li, X.; Li, B.; Zhao, S.; Gu, J.; Chen, Y.; Ma, B.; Wei, J.; Han, Q.; et al. Exosomes Derived from Hypoxia-Treated Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis Through the PKA Signaling Pathway. *Stem Cells Dev.* **2018**, *27*, 456–465. [\[CrossRef\]](#)

81. Gong, M.; Yu, B.; Wang, J.; Wang, Y.; Liu, M.; Paul, C.; Millard, R.W.; Xiao, D.S.; Ashraf, M.; Xu, M. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 45200–45212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Gangadaran, P.; Rajendran, R.L.; Lee, H.W.; Kalimuthu, S.; Hong, C.M.; Jeong, S.Y.; Lee, S.W.; Lee, J.; Ahn, B.C. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells activates VEGF receptors and accelerates recovery of hindlimb ischemia. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2017**, *264*, 112–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Gonzalez-King, H.; Garcia, N.A.; Ontoria-Oviedo, I.; Ciria, M.; Montero, J.A.; Sepulveda, P. Hypoxia Inducible Factor-1alpha Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Stem Cells* **2017**, *35*, 1747–1759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Liu, X.; Li, Q.; Niu, X.; Hu, B.; Chen, S.; Song, W.; Ding, J.; Zhang, C.; Wang, Y. Exosomes Secreted from Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Prevent Osteonecrosis of the Femoral Head by Promoting Angiogenesis. *Int. J. Biol. Sci.* **2017**, *13*, 232–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Watanabe, J.; Sakai, K.; Urata, Y.; Toyama, N.; Nakamichi, E.; Hibi, H. Extracellular Vesicles of Stem Cells to Prevent BRONJ. *J. Dent. Res.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Takahashi, A.; Okada, R.; Nagao, K.; Kawamata, Y.; Hanyu, A.; Yoshimoto, S.; Takasugi, M.; Watanabe, S.; Kanemaki, M.T.; Obuse, C.; et al. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15287. [[CrossRef](#)]
87. Chicon-Bosch, M.; Tirado, O.M. Exosomes in Bone Sarcomas: Key Players in Metastasis. *Cells* **2020**, *9*, 241. [[CrossRef](#)]
88. Nassar, W.; El-Ansary, M.; Sabry, D.; Mostafa, M.A.; Fayad, T.; Kotb, E.; Temraz, M.; Saad, A.N.; Essa, W.; Adel, H. Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases. *Biomater. Res.* **2016**, *20*, 21. [[CrossRef](#)]
89. Ruiz, M.; Toupet, K.; Maumus, M.; Rozier, P.; Jorgensen, C.; Noel, D. TGFBI secreted by mesenchymal stromal cells ameliorates osteoarthritis and is detected in extracellular vesicles. *Biomaterials* **2020**, *226*, 119544. [[CrossRef](#)]
90. Ramasamy, S.K. Structure and Functions of Blood Vessels and Vascular Niches in Bone. *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*, 5046953. [[CrossRef](#)]
91. Sivaraj, K.K.; Adams, R.H. Blood vessel formation and function in bone. *Development* **2016**, *143*, 2706–2715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Watson, E.C.; Adams, R.H. Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)]
93. Gruneboom, A.; Hawwari, I.; Weidner, D.; Culemann, S.; Muller, S.; Henneberg, S.; Brenzel, A.; Merz, S.; Bornemann, L.; Zec, K.; et al. A network of trans-cortical capillaries as mainstay for blood circulation in long bones. *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 236–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Kusumbe, A.P.; Ramasamy, S.K.; Adams, R.H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* **2014**, *507*, 323–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Ramasamy, S.K.; Kusumbe, A.P.; Wang, L.; Adams, R.H. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature* **2014**, *507*, 376–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Wang, L.; Zhou, F.; Zhang, P.; Wang, H.; Qu, Z.; Jia, P.; Yao, Z.; Shen, G.; Li, G.; Zhao, G.; et al. Human type H vessels are a sensitive biomarker of bone mass. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2760. [[CrossRef](#)]
97. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
98. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **2011**, *473*, 298–307. [[CrossRef](#)]
99. Marcola, M.; Rodrigues, C.E. Endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis: Another brick in the wall. *Stem Cells Int.* **2015**, *2015*, 832649. [[CrossRef](#)]
100. Yu, L.; Su, B.; Hollomon, M.; Deng, Y.; Facchinetti, V.; Kleinerman, E.S. Vasculogenesis driven by bone marrow-derived cells is essential for growth of Ewing’s sarcomas. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1334–1343. [[CrossRef](#)]
101. An, R.; Schmid, R.; Klausning, A.; Robering, J.W.; Weber, M.; Bauerle, T.; Detsch, R.; Boccaccini, A.R.; Horch, R.E.; Boos, A.M.; et al. Proangiogenic effects of tumor cells on endothelial progenitor cells vary with tumor type in an in vitro and in vivo rat model. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2018**, *32*, 5587–5601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Folberg, R.; Hendrix, M.J.; Maniotis, A.J. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 361–381. [[CrossRef](#)]

103. Maniatis, A.J.; Folberg, R.; Hess, A.; Seftor, E.A.; Gardner, L.M.; Pe'er, J.; Trent, J.M.; Meltzer, P.S.; Hendrix, M.J. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 739–752. [[CrossRef](#)]
104. Ren, K.; Yao, N.; Wang, G.; Tian, L.; Ma, J.; Shi, X.; Zhang, L.; Zhang, J.; Zhou, X.; Zhou, G.; et al. Vasculogenic mimicry: A new prognostic sign of human osteosarcoma. *Hum. Pathol.* **2014**, *45*, 2120–2129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Ren, K.; Zhang, J.; Gu, X.; Wu, S.; Shi, X.; Ni, Y.; Chen, Y.; Lu, J.; Gao, Z.; Wang, C.; et al. Migration-inducing gene-7 independently predicts poor prognosis of human osteosarcoma and is associated with vasculogenic mimicry. *Exp. Cell Res.* **2018**, *369*, 80–89. [[CrossRef](#)]
106. Xia, Y.; Cai, X.; Fan, J.; Zhang, L.; Li, Z.; Ren, J.; Wu, G.; Zhu, F. RhoA/ROCK pathway inhibition by fasudil suppresses the vasculogenic mimicry of U2OS osteosarcoma cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs* **2017**, *28*, 514–521. [[CrossRef](#)]
107. Massimini, M.; De Maria, R.; Malatesta, D.; Romanucci, M.; D'Anselmo, A.; Della Salda, L. Establishment of three-dimensional canine osteosarcoma cell lines showing vasculogenic mimicry and evaluation of biological properties after treatment with 17-AAG. *Vet. Comp. Oncol.* **2019**, *17*, 376–384. [[CrossRef](#)]
108. Valdivia, A.; Mingo, G.; Aldana, V.; Pinto, M.P.; Ramirez, M.; Retamal, C.; Gonzalez, A.; Nualart, F.; Corvalan, A.H.; Owen, G.I. Fact or Fiction, It Is Time for a Verdict on Vasculogenic Mimicry? *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 680. [[CrossRef](#)]
109. Ohba, T.; Cates, J.M.; Cole, H.A.; Slosky, D.A.; Haro, H.; Ando, T.; Schwartz, H.S.; Schoenecker, J.G. Autocrine VEGF/VEGFR1 signaling in a subpopulation of cells associates with aggressive osteosarcoma. *Mol. Cancer Res.* **2014**, *12*, 1100–1111. [[CrossRef](#)]
110. Mei, J.; Gao, Y.; Zhang, L.; Cai, X.; Qian, Z.; Huang, H.; Huang, W. VEGF-siRNA silencing induces apoptosis, inhibits proliferation and suppresses vasculogenic mimicry in osteosarcoma in vitro. *Exp. Oncol.* **2008**, *30*, 29–34.
111. Aslan, C.; Maralbashi, S.; Salari, F.; Kahroba, H.; Sigaroodi, F.; Kazemi, T.; Kharaziha, P. Tumor-derived exosomes: Implication in angiogenesis and antiangiogenesis cancer therapy. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 16885–16903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Perut, F.; Roncuzzi, L.; Zini, N.; Massa, A.; Baldini, N. Extracellular Nanovesicles Secreted by Human Osteosarcoma Cells Promote Angiogenesis. *Cancers* **2019**, *11*, 779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Raimondi, L.; De Luca, A.; Gallo, A.; Costa, V.; Russelli, G.; Cuscino, N.; Manno, M.; Raccosta, S.; Carina, V.; Bellavia, D.; et al. Osteosarcoma cell-derived exosomes affect tumor microenvironment by specific packaging of microRNAs. *Carcinogenesis* **2019**. [[CrossRef](#)]
114. Yang, J.; Yang, D.; Sun, Y.; Sun, B.; Wang, G.; Trent, J.C.; Araujo, D.M.; Chen, K.; Zhang, W. Genetic amplification of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway genes, including VEGFA, in human osteosarcoma. *Cancer* **2011**, *117*, 4925–4938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Kaya, M.; Wada, T.; Akatsuka, T.; Kawaguchi, S.; Nagoya, S.; Shindoh, M.; Higashino, F.; Mezawa, F.; Okada, F.; Ishii, S. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2000**, *6*, 572–577.
116. Lammler, J.; Fan, M.; Rosenthal, H.G.; Patni, M.; Rinehart, E.; Vergara, G.; Ablah, E.; Wooley, P.H.; Lucas, G.; Yang, S.Y. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor correlates with the advance of clinical osteosarcoma. *Int. Orthop.* **2012**, *36*, 2307–2313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Dumars, C.; Ngyuen, J.M.; Gaultier, A.; Lanel, R.; Corradini, N.; Gouin, F.; Heymann, D.; Heymann, M.F. Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 78343–78354. [[CrossRef](#)]
118. Charity, R.M.; Foukas, A.F.; Deshmukh, N.S.; Grimer, R.J. Vascular endothelial growth factor expression in osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2006**, *448*, 193–198. [[CrossRef](#)]
119. Chen, D.; Zhang, Y.J.; Zhu, K.W.; Wang, W.C. A systematic review of vascular endothelial growth factor expression as a biomarker of prognosis in patients with osteosarcoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.* **2013**, *34*, 1895–1899. [[CrossRef](#)]
120. Yu, X.W.; Wu, T.Y.; Yi, X.; Ren, W.P.; Zhou, Z.B.; Sun, Y.Q.; Zhang, C.Q. Prognostic significance of VEGF expression in osteosarcoma: A meta-analysis. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.* **2014**, *35*, 155–160. [[CrossRef](#)]

121. Liu, K.; Ren, T.; Huang, Y.; Sun, K.; Bao, X.; Wang, S.; Zheng, B.; Guo, W. Apatinib promotes autophagy and apoptosis through VEGFR2/STAT3/BCL-2 signaling in osteosarcoma. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e3015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Rutkowski, P.; Kaminska, 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.* **2003**, *84*, 151–159. [[CrossRef](#)]
123. Kaya, M.; Wada, T.; Kawaguchi, S.; Nagoya, S.; Yamashita, T.; Abe, Y.; Hiraga, H.; Isu, K.; Shindoh, M.; Higashino, F.; et al. Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 864–869. [[CrossRef](#)]
124. Xie, L.; Ji, T.; Guo, W. Anti-angiogenesis target therapy for advanced osteosarcoma (Review). *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 625–636. [[CrossRef](#)]
125. Grignani, G.; Palmerini, E.; Dileo, P.; Asaftei, S.D.; D'Ambrosio, L.; Pignochino, Y.; Mercuri, M.; Picci, P.; Fagioli, F.; Casali, P.G.; et al. A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard multimodal therapy: An Italian Sarcoma Group study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2012**, *23*, 508–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Grignani, G.; Palmerini, E.; Ferraresi, V.; D'Ambrosio, L.; Bertulli, R.; Asaftei, S.D.; Tamburini, A.; Pignochino, Y.; Sangiolo, D.; Marchesi, E.; et al. Sorafenib and everolimus for patients with unresectable high-grade osteosarcoma progressing after standard treatment: A non-randomised phase 2 clinical trial. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 98–107. [[CrossRef](#)]
127. Navid, F.; Santana, V.M.; Neel, M.; McCarville, M.B.; Shulkin, B.L.; Wu, J.; Billups, C.A.; Mao, S.; Daryani, V.M.; Stewart, C.F.; et al. A phase II trial evaluating the feasibility of adding bevacizumab to standard osteosarcoma therapy. *Int. J. Cancer* **2017**, *141*, 1469–1477. [[CrossRef](#)]
128. Zheng, B.; Ren, T.; Huang, Y.; Guo, W. Apatinib inhibits migration and invasion as well as PD-L1 expression in osteosarcoma by targeting STAT3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *495*, 1695–1701. [[CrossRef](#)]
129. Lowery, C.D.; Blosser, W.; Dowless, M.; Renschler, M.; Perez, L.V.; Stephens, J.; Pytowski, B.; Wasserstrom, H.; Stancato, L.F.; Falcon, B. Anti-VEGFR2 therapy delays growth of preclinical pediatric tumor models and enhances anti-tumor activity of chemotherapy. *Oncotarget* **2019**, *10*, 5523–5533. [[CrossRef](#)]
130. Inagaki, Y.; Hookway, E.; Williams, K.A.; Hassan, A.B.; Oppermann, U.; Tanaka, Y.; Soilleux, E.; Athanasou, N.A. Dendritic and mast cell involvement in the inflammatory response to primary malignant bone tumours. *Clin. Sarcoma Res.* **2016**, *6*, 13. [[CrossRef](#)]
131. Liu, T.; Fang, X.C.; Ding, Z.; Sun, Z.G.; Sun, L.M.; Wang, Y.L. Pre-operative lymphocyte-to-monocyte ratio as a predictor of overall survival in patients suffering from osteosarcoma. *FEBS Open Bio* **2015**, *5*, 682–687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Nonomura, N.; Takayama, H.; Nakayama, M.; Nakai, Y.; Kawashima, A.; Mukai, M.; Nagahara, A.; Aozasa, K.; Tsujimura, A. Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate cancer. *BJU Int.* **2011**, *107*, 1918–1922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Pollard, J.W. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J. Leukoc. Biol.* **2008**, *84*, 623–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Buddingh, E.P.; Kuijjer, M.L.; Duim, R.A.; Burger, H.; Agelopoulos, K.; Myklebost, O.; Serra, M.; Mertens, F.; Hogendoorn, P.C.; Lankester, A.C.; et al. Tumor-infiltrating macrophages are associated with metastasis suppression in high-grade osteosarcoma: A rationale for treatment with macrophage activating agents. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2110–2119. [[CrossRef](#)]
135. Gomez-Brouchet, A.; Illac, C.; Gilhodes, J.; Bouvier, C.; Aubert, S.; Guinebretiere, J.M.; Marie, B.; Larousserie, F.; Entz-Werle, N.; de Pinieux, G.; et al. CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies from the French OS2006 phase 3 trial. *Oncimmunology* **2017**, *6*, e1331193. [[CrossRef](#)]
136. Kleinerman, E.S.; Meyers, P.A.; Raymond, A.K.; Gano, J.B.; Jia, S.F.; Jaffe, N. Combination therapy with ifosfamide and liposome-encapsulated muramyl tripeptide: Tolerability, toxicity, and immune stimulation. *J. Immunother. Emphas. Tumor Immunol. Off. J. Soc. Biol. Ther.* **1995**, *17*, 181–193. [[CrossRef](#)]
137. Meyers, P.A. Muramyl tripeptide (mifamurtide) for the treatment of osteosarcoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2009**, *9*, 1035–1049. [[CrossRef](#)]

138. Fidler, I.J.; Sone, S.; Fogler, W.E.; Barnes, Z.L. Eradication of spontaneous metastases and activation of alveolar macrophages by intravenous injection of liposomes containing muramyl dipeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 1680–1684. [[CrossRef](#)]
139. Kleinerman, E.S.; Jia, S.F.; Griffin, J.; Seibel, N.L.; Benjamin, R.S.; Jaffe, N. Phase II study of liposomal muramyl tripeptide in osteosarcoma: The cytokine cascade and monocyte activation following administration. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1992**, *10*, 1310–1316. [[CrossRef](#)]
140. MacEwen, E.G.; Kurzman, I.D.; Rosenthal, R.C.; Smith, B.W.; Manley, P.A.; Roush, J.K.; Howard, P.E. Therapy for osteosarcoma in dogs with intravenous injection of liposome-encapsulated muramyl tripeptide. *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, *81*, 935–938. [[CrossRef](#)]
141. Casey, D.L.; Cheung, N.V. Immunotherapy of Pediatric Solid Tumors: Treatments at a Crossroads, with an Emphasis on Antibodies. *Cancer Immunol. Res.* **2020**, *8*, 161–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Fritzsching, B.; Fellenberg, J.; Moskovszky, L.; Sapi, Z.; Krenacs, T.; Machado, I.; Poeschl, J.; Lehner, B.; Szendroi, M.; Bosch, A.L.; et al. CD8(+)/FOXP3(+)-ratio in osteosarcoma microenvironment separates survivors from non-survivors: A multicenter validated retrospective study. *Oncoimmunology* **2015**, *4*, e990800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Koirala, P.; Roth, M.E.; Gill, J.; Piperdi, S.; Chinai, J.M.; Geller, D.S.; Hoang, B.H.; Park, A.; Fremed, M.A.; Zang, X.; et al. Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Lussier, D.M.; O'Neill, L.; Nieves, L.M.; McAfee, M.S.; Holechek, S.A.; Collins, A.W.; Dickman, P.; Jacobsen, J.; Hingorani, P.; Blattman, J.N. Enhanced T-cell immunity to osteosarcoma through antibody blockade of PD-1/PD-L1 interactions. *J. Immunother.* **2015**, *38*, 96–106. [[CrossRef](#)]
145. Zhu, Z.; Jin, Z.; Zhang, M.; Tang, Y.; Yang, G.; Yuan, X.; Yao, J.; Sun, D. Prognostic value of programmed death-ligand 1 in sarcoma: A meta-analysis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 59570–59580. [[CrossRef](#)]
146. Keung, E.Z.; Burgess, M.; Salazar, R.; Parra, E.R.; Rodrigues-Canales, J.; Bolejack, V.; Van Tine, B.A.; Schuetz, S.M.; Attia, S.; Riedel, R.F.; et al. Correlative Analyses of the SARCO28 Trial Reveal an Association Between Sarcoma-Associated Immune Infiltrate and Response to Pembrolizumab. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2020**. [[CrossRef](#)]
147. Hasan Ali, O.; Diem, S.; Markert, E.; Jochum, W.; Kerl, K.; French, L.E.; Speiser, D.E.; Fruh, M.; Flatz, L. Characterization of nivolumab-associated skin reactions in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1231292. [[CrossRef](#)]
148. Paoluzzi, L.; Cacavio, A.; Ghesani, M.; Karambelkar, A.; Rapkiewicz, A.; Weber, J.; Rosen, G. Response to anti-PD1 therapy with nivolumab in metastatic sarcomas. *Clin. Sarcoma Res.* **2016**, *6*, 24. [[CrossRef](#)]
149. Sermer, D.; Brentjens, R. CAR T-cell therapy: Full speed ahead. *Hematol. Oncol.* **2019**, *37*, 95–100. [[CrossRef](#)]
150. Koksall, H.; Muller, E.; Inderberg, E.M.; Bruland, O.; Walchli, S. Treating osteosarcoma with CAR T cells. *Scand. J. Immunol.* **2019**, *89*, e12741. [[CrossRef](#)]
151. Rainusso, N.; Brawley, V.S.; Ghazi, A.; Hicks, M.J.; Gottschalk, S.; Rosen, J.M.; Ahmed, N. Immunotherapy targeting HER2 with genetically modified T cells eliminates tumor-initiating cells in osteosarcoma. *Cancer Gene Ther.* **2012**, *19*, 212–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Ahmed, N.; Brawley, V.S.; Hegde, M.; Robertson, C.; Ghazi, A.; Gerken, C.; Liu, E.; Dakhova, O.; Ashoori, A.; Corder, A.; et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) -Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1688–1696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Huang, X.; Park, H.; Greene, J.; Pao, J.; Mulvey, E.; Zhou, S.X.; Albert, C.M.; Moy, F.; Sachdev, D.; Yee, D.; et al. IGF1R- and ROR1-Specific CAR T Cells as a Potential Therapy for High Risk Sarcomas. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Bedard, P.L.; Hyman, D.M.; Davids, M.S.; Siu, L.L. Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology. *Lancet* **2020**, *395*, 1078–1088. [[CrossRef](#)]
155. Wang, G.; Sun, M.; Jiang, Y.; Zhang, T.; Sun, W.; Wang, H.; Yin, F.; Wang, Z.; Sang, W.; Xu, J.; et al. Anlotinib, a novel small molecular tyrosine kinase inhibitor, suppresses growth and metastasis via dual blockade of VEGFR2 and MET in osteosarcoma. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 979–993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Fioramonti, M.; Santini, D.; Iuliani, M.; Ribelli, G.; Manca, P.; Papapietro, N.; Spiezia, F.; Vincenzi, B.; Denaro, V.; Russo, A.; et al. Cabozantinib targets bone microenvironment modulating human osteoclast and osteoblast functions. *Oncotarget* **2017**, *8*, 20113–20121. [[CrossRef](#)]

157. Fioramonti, M.; Fausti, V.; Pantano, F.; Iuliani, M.; Ribelli, G.; Lotti, F.; Pignochino, Y.; Grignani, G.; Santini, D.; Tonini, G.; et al. Cabozantinib Affects Osteosarcoma Growth Through A Direct Effect On Tumor Cells and Modifications In Bone Microenvironment. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4177. [[CrossRef](#)]
158. Davis, L.E.; Bolejack, V.; Ryan, C.W.; Ganjoo, K.N.; Loggers, E.T.; Chawla, S.; Agulnik, M.; Livingston, M.B.; Reed, D.; Keedy, V.; et al. Randomized Double-Blind Phase II Study of Regorafenib in Patients With Metastatic Osteosarcoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 1424–1431. [[CrossRef](#)]
159. Duffaud, F.; Mir, O.; Boudou-Rouquette, P.; Piperno-Neumann, S.; Penel, N.; Bompas, E.; Delcambre, C.; Kalbacher, E.; Italiano, A.; Collard, O.; et al. Efficacy and safety of regorafenib in adult patients with metastatic osteosarcoma: A non-comparative, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 120–133. [[CrossRef](#)]
160. Aggerholm-Pedersen, N.; Rossen, P.; Rose, H.; Safwat, A. Pazopanib in the Treatment of Bone Sarcomas: Clinical Experience. *Transl. Oncol.* **2019**, *13*, 295–299. [[CrossRef](#)]
161. Longhi, A.; Paioli, A.; Palmerini, E.; Cesari, M.; Abate, M.E.; Setola, E.; Spinnato, P.; Donati, D.; Hompland, I.; Boye, K. Pazopanib in relapsed osteosarcoma patients: Report on 15 cases. *Acta Oncol.* **2019**, *58*, 124–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Italiano, A.; Mir, O.; Mathoulin-Pelissier, S.; Penel, N.; Piperno-Neumann, S.; Bompas, E.; Chevreau, C.; Duffaud, F.; Entz-Werle, N.; Saada, E.; et al. Cabozantinib in patients with advanced Ewing sarcoma or osteosarcoma (CABONE): A multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, 446–455. [[CrossRef](#)]
163. Zhu, C.; Ma, X.; Hu, Y.; Guo, L.; Chen, B.; Shen, K.; Xiao, Y. Safety and efficacy profile of lenvatinib in cancer therapy: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 44545–44557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Matsuo, K.; Otaki, N. Bone cell interactions through Eph/ephrin: Bone modeling, remodeling and associated diseases. *Cell Adhes. Migr.* **2012**, *6*, 148–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Wiklander, O.P.B.; Brennan, M.A.; Lotvall, J.; Breakefield, X.O.; El Andaloussi, S. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Titre : Impact du microenvironnement et de la vascularisation tumorale dans la réponse de l'ostéosarcome à la chimiothérapie

Mots clés : Ostéosarcome, microenvironnement, vascularisation, immunohistochimie.

Résumé : L'ostéosarcome, la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente, est actuellement traité par chimiothérapie et chirurgie. Des travaux récents suggèrent que le microenvironnement tumoral pourrait être un élément clé dans la compréhension de la tumorigénèse et du traitement de l'ostéosarcome. Nous avons émis l'hypothèse que l'hétérogénéité du microenvironnement pourrait moduler la réponse à la chimiothérapie. Nous avons également évalué des marquages spécifiques de vascularisation en immunohistochimie liés à la zone et à la qualité de réponse au traitement. L'initiation tumorale de modèle MOS-J syngénique d'ostéosarcome murin a été réalisée dans les sites intra-osseux et paratibial. Nous observons une différence significative dans la réponse au traitement par doxorubicine entre ces deux conditions en termes de volume tumoral et de nécrose induite. Nous avons ensuite analysé le réseau vasculaire sur différentes régions par immunohistochimie en immunofluorescence par multiplexing. La doxorubicine semble réduire l'expression des éléments CD31+ dans le front d'invasion. Nous observons une distribution spécifique des deux types de vaisseaux évalués en microscopie confocale : les vaisseaux serpiginieux, immatures CD31+/endomucine+ et les vaisseaux matures CD31+/α-SMA+. Ces derniers pourraient être liés à une bonne réponse au traitement dans notre modèle murin car ils étaient quatre fois plus présents dans notre modèle intra-osseux de bonne réponse à la doxorubicine. Ces travaux suggèrent un rôle décisif du microenvironnement dans la réponse de l'ostéosarcome à la chimiothérapie avec une cinétique de volume tumoral et une nécrose variable entre les deux sites de développement de notre modèle. L'analyse vasculaire innovante en immunofluorescence par multiplexing doit être évaluée de manière dynamique, avec une analyse précoce du développement tumoral, pour comprendre si les vaisseaux matures CD31+/α-SMA+ sont les marqueurs d'un facteur de bon pronostic ou ceux d'une normalisation vasculaire. Des tumeurs osseuses humaines devraient être évaluées sur ces marqueurs vasculaires spécifiques en tant que potentiels marqueurs de bonne réponse à la chimiothérapie.

Title : Impact of the microenvironment and tumor vasculature in the response of osteosarcoma to chemotherapy

Keywords: Osteosarcoma, microenvironment, vascularization, immunohistochemistry.

Abstract: Osteosarcoma, the most common malignant primary bone tumor, is currently treated with chemotherapy and surgery. Recent works suggest that the tumor microenvironment may be a key element in tumor development and therapeutic understandings. We hypothesized that microenvironment heterogeneity may play a role in its response to chemotherapy. We also search for specific vascularization labelings in immunohistochemistry linked to the area and the quality of response to treatment. Tumor initiation site with osteosarcoma MOS-J syngenic mouse model was performed in intra-osseous and paratibial sites. We observe a significant difference in the Doxorubicin treatment response between these two conditions in tumor volume and induced necrosis. We then focused our vascular network analysis on different areas with immunohistochemistry and immunofluorescent multiplexing in control and Doxorubicin conditions. Doxorubicin seems to lower CD31+ element expression in the invasion front. We observe a specific distribution of the two kinds of vessels assessed in confocal microscopy CD31+/endomucin+ sprouting vessels and CD31+/α-SMA+ mature vessels. These last ones may be linked to a good response to chemotherapy in our mouse model as they were four times more present in our intra-osseous good response model to chemotherapy. This work suggests a decisive microenvironment role in osteosarcoma response to chemotherapy with differential tumor kinetic and necrosis between two development sites in our model. The innovative vascular analysis by immunohistochemistry multiplexing must be assessed dynamically, with an earlier tumor development analysis, to understand if the CD31+/α-SMA+mature vessels are a good prognosis marker or a vascular normalization. Human tumor bone material should be evaluated on these specific vascular markers as potential useful response markers to chemotherapy.