

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE ET PHARMACIE

**Nouvelles approches thérapeutiques des ostéosarcomes par
des stratégies combinatoires ciblées**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale de BIOLOGIE-SANTE
Biologie – Médecine – Santé
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

*présentée
et soutenue publiquement par*

Moriceau Gatien

Le 6 octobre 2010, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

Mme VICO Laurence Directrice de Recherche INSERM, Saint Etienne
M. BLAY Jean-Yves Professeur des Universités - Praticien Hospitalier,
Lyon

Examineurs

M. MENTAVERRI Romuald Maitre de Conférences des Universités, Amiens
M. BLANCHARD Frédéric Chargé de Recherche INSERM, Nantes

Directeur de thèse

M. HEYMANN Dominique Professeur des Universités - Praticien Hospitalier,
Nantes

Ce travail a été réalisé dans le :

**Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et
Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives - INSERM UMR-S**

957



Liste des abréviations

RGD : peptide arginine, glycine, acide aspartique
TGFβ: Transforming Growth Factor β
IGF: Insulin like Growth Factor
TNF: Tumor Necrosis Factor
BMP: Bone Morphogenetic Protein
TRAP: Tartrate Resistant Acid Phosphatase
PPARγ2: Proliferator Activated Receptor Gamma 2
AP-1: Activator Protein 1
MMP-2: Matrix Metalloproteinase de type 2
M-CSF: Macrophage-Colony Stimulating Factor
RANK: Receptor Activator of Nuclear factor κB
RANKL: RANK Ligand
OPG: Osteoprotegerin
FGF: Fibroblast Growth Factor
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
TDM: TomoDensitoMétrie
IRM: Imagerie par Résonance Magnétique
MDM2: Murine double Minute
Rb: Retinoblastoma
CDK: Cyclin Dependent Kinase
ATP: Adenosine Tri-Phosphate
HES: Hémalun, Eosine, Safran
MDR: Multi Drug Resistant
PPi: PyroPhosphate endogène
N-BPs: Nitrogen containing Bisphosphonates
FPPs: Farnesyl diphosphate synthase
FAK: Focal Adhesion Kinase
Zol: Zoledronic Acid
ABC: ATP-Binding Cassette
MRP: Multidrug Resistant associated Protein
GSH: Gluthation
MXR: Mitoxantrone Resistance associated transporter
LRP: Lung Resistant Protein
BCRP: Breast Cancer Resistant Protein
P-gp: glycoprotein-P
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

Sommaire

I. Le tissu osseux.....	p9
A. Organisation du tissu osseux.....	p10
1) Organisation générale.....	p10
2) Organisation macroscopique.....	p11
a) Os cortical.....	p11
b) Os trabéculaire.....	p13
B. Constituants du tissu osseux.....	p13
1) La matrice extracellulaire.....	p13
2) L'ostéoblaste.....	p15
3) L'ostéoclaste.....	p18
C. Le remodelage osseux.....	p20
II. Pathologie osseuse tumorale.....	p23
A. Les tumeurs osseuses primitives.....	p23
B. L'ostéosarcome.....	p27
1) Définition.....	p27
2) Traitement de l'ostéosarcome.....	p33
C. Résistance aux agents thérapeutiques.....	p35
D. Phénomènes de résistance dans l'ostéosarcome.....	p40
E. Stratégies innovantes pour contourner ces phénomènes de résistance.....	p42
III. Objectifs de la thèse.....	p45

Partie I : Ostéosarcome et résistance à l'acide Zolédronique.....p48

I. L'acide Zolédronique, bisphosphonate de troisième génération.....p49

Article 1 : « Implication de la farnésyl diphosphate synthase dans les mécanismes de résistance à l'acide Zolédronique dans les cellules d'ostéosarcome ».....p53

Complément de discussion et perspectives de l'article 1.....p55

Partie II : L'acide Zolédronique potentialise l'effet de RAD001 en termes de prolifération cellulaire, d'activité métabolique, diminue le volume et la progression tumorale et améliore la réparation tissulaire.....p60

I. RAD001 dérivé de la rapamycine, inhibiteur spécifique de la protéine mTORp61

Article 2 : « L'acide Zolédronique potentialise l'inhibition de mTOR et abolit les résistances des cellules d'ostéosarcomes au RAD001 : Rôle pivot du processus de prénylation ».....p71

Complément de discussion et perspectives de l'article 2.....p73

Partie III : La Lovastatine potentialise l'effet de l'Apomine et inhibe la signalisation induite par la HMG-CoA réductase.....p78

I. L'Apomine et la Lovastatine inhibent spécifiquement l'enzyme HMG-CoA réductase.....p79

Article 3 : « L'Apomine potentialise l'effet de la Lovastatine sur des cellules d'ostéosarcome et diminue la progression et le volume tumoral *in vivo* ».....p86

Perspectives de l'article 3.....p110

Partie IV : L'Imatinib inhibe la prolifération cellulaire, induit une mort cellulaire dépendant des caspases et réduit le volume et la progression tumorale dans deux modèles d'ostéosarcome.....p112

Article 4 : « L'Imatinib comme nouvelle approche thérapeutique des ostéosarcomes.....p113

Conclusions générales et perspectives.....p147

Bibliographie.....p154

INTRODUCTION

Le tissu Osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé, d'origine mésenchymateuse composé d'une fraction organique et d'une fraction minérale qui lui confèrent ses propriétés de rigidité et d'élasticité. L'os est ainsi une véritable « charpente » de l'organisme qui assure la protection des organes vitaux et constitue un point d'ancrage au système musculaire.

Sur le plan métabolique, il joue un rôle extrêmement important dans le maintien de l'homéostasie phosphocalcique, minérale et cellulaire car il est le principal réservoir métabolique des éléments minéraux (en particulier de calcium et de phosphore) et contribue ainsi à la régulation de la composition des fluides extracellulaires. Par ailleurs, dans certains espaces médullaires, principalement des os plats se positionnent la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse assurant le renouvellement des éléments figurés du sang.

Le tissu osseux, caractérisé par sa dureté et son apparente rigidité, ne reste pas pour autant dans un état statique. En effet, tout au long de la vie, le tissu osseux subit d'importants remaniements : il est le siège chez l'adulte d'un remodelage permanent qui fait suite à un remaniement osseux se déroulant jusqu'à la fin de la croissance. Le remodelage osseux est un processus complexe qui permet de préserver les propriétés biomécaniques du squelette et d'adapter ce dernier aux contraintes mécaniques auxquelles il est soumis. Deux types cellulaires interviennent principalement dans ce processus : les ostéoclastes, responsables de la dégradation ou résorption osseuse, et les ostéoblastes qui permettent la production de matrice organique qui se minéralisera dans une seconde étape (apposition osseuse).

Deux autres tissus sont intimement associés au tissu osseux : l'endoste et le périoste. Ces deux tissus conjonctifs forment une enveloppe aux faces interne et externe de l'os compact et contiennent des vaisseaux et des cellules souches à capacité ostéogène.

A. Organisation du tissu osseux

1) Organisation générale

Le squelette humain est composé de trois types d'os :

- Les os longs comme l'humérus, le fémur ou le tibia se caractérisent par une partie nettement plus grande que les deux autres. Ils servent classiquement de modèle pour décrire la structure de l'os.
- Les os courts tels que les vertèbres ou les phalanges ont leurs trois parties sensiblement égales. Ils sont composés d'un noyau d'os spongieux entouré d'os compact.
- Les os plats comme le sternum ou les os pariétaux ont une partie nettement plus courte que les deux autres.

L'os long chez l'adulte est constitué d'une partie centrale cylindrique appelée diaphyse et de deux extrémités élargies et arrondies appelées épiphyses, couvertes de cartilage articulaire. Des régions coniques, appelées métaphyses, connectent la diaphyse à chaque épiphyse. La forme et la structure particulières des os longs leur confèrent la capacité de résister aux forces de tension, de traction et de cisaillement.

Histologiquement, on distingue l'os cortical ou compact de l'os trabéculaire ou spongieux, l'ensemble étant entouré d'une enveloppe externe richement vascularisée, le périoste, sauf au niveau du cartilage articulaire et des insertions des tendons et des ligaments (figure 1). Cette enveloppe joue un rôle fondamental dans la croissance en longueur et surtout circonférentielle de l'os. Elle est constituée de deux couches, une couche superficielle fibreuse vascularisée et une couche profonde contenant des cellules souches et des pré-ostéoblastes (Toppets et al, 2004).

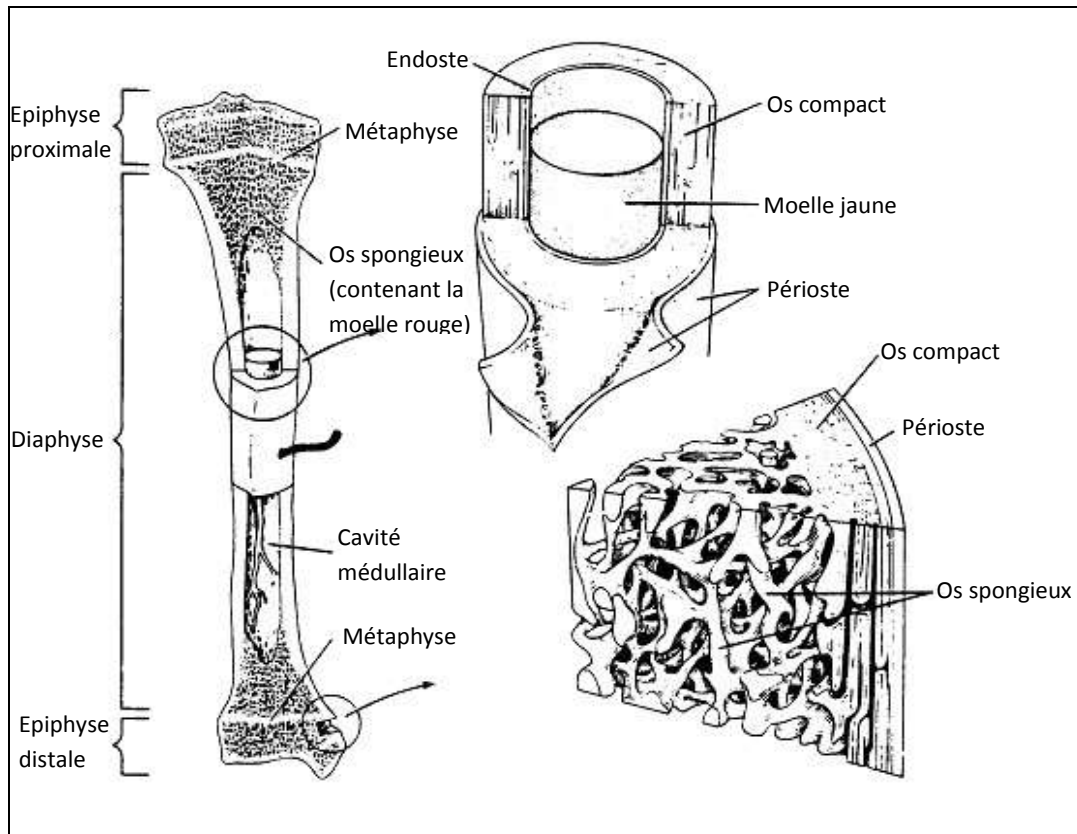


Figure 1 : Organisation structurale d'un os long

2) Organisation macroscopique

La classification en os cortical et trabéculaire est basée sur le degré de porosité (Toppets, 2004) :

- 5 à 30% pour l'os cortical qui constitue la diaphyse des os longs et l'enveloppe des os plats et courts.
- 30 à 90% pour l'os trabéculaire situé surtout au centre de la diaphyse et dans les régions métaphysaire et diaphysaire ainsi que dans les os courts et plats. (Young and Kobluk, 1995).

a) Os cortical

L'os cortical, également appelé os compact, représente 80-85% du tissu osseux et constitue une enveloppe résistante composée par la juxtaposition d'ostéons cylindriques de 200 à 300 μm de diamètre alignés parallèlement à la diaphyse. Chaque ostéon (qui correspond à l'unité structurale de l'os cortical), est composé de lamelles concentriques de substance

organique minéralisée disposée autour d'un canal. Cette substance organique est principalement composée de fibres de collagène orientées de façon hélicoïdale au grand axe du canal parallèlement les unes aux autres de façon à conférer au tissu cortical une résistance mécanique optimale. Ce canal, appelé canal de Havers, large de 40 à 50 μm , permet le passage de vaisseaux et de fibres nerveuses amyéliniques et autour duquel se positionnent cinq à quinze lamelles osseuses concentriques. Largement ouvert dans les ostéons primaires, le canal de Havers est délimité par les cellules ostéoprogénitrices et les ostéoblastes. Ces cellules (ostéoblastes matures) se retrouvent emmurées dans la matrice extracellulaire lors de la maturation des ostéons et deviennent alors des ostéocytes, conduisant au comblement partiel du canal. Les canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux transversaux dits de Volkmann qui permettent la communication entre la vascularisation périostée et les vaisseaux de la moelle osseuse (figure 2) (Heymann et al, 2008).

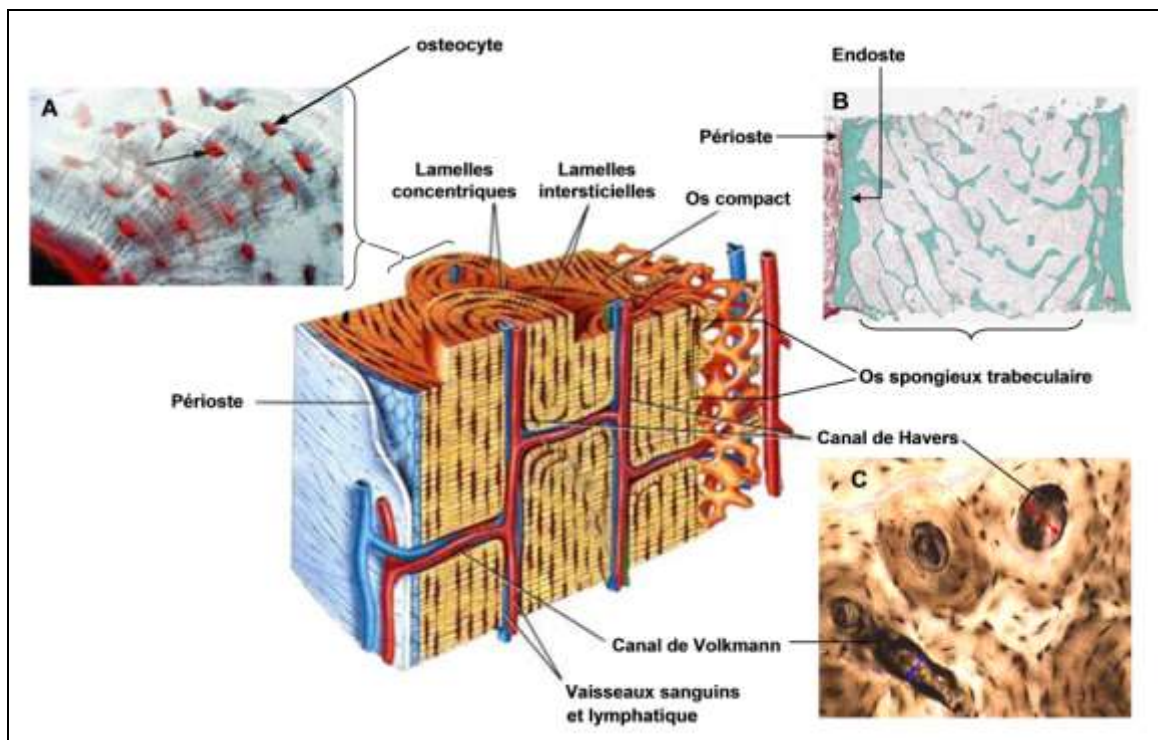


Figure 2 : Représentation schématique d'un os de type haversien. (d'après Marie, 1998). A : coloration d'ostéocytes piégés dans des lacunes appelées ostéoplastes positionnées dans les différentes lamelles concentriques d'un ostéon. B : réseau trabéculaire tendu entre de l'os cortical composé d'os compact. Chaque os cortical est limité sur sa face interne d'endoste et sur face externe de périoste. Coloration au trichrome de Goldner. C : canal de Havers et canal de Volkmann vue en coupe longitudinale (Laboratoire de Physiopathologie de la résorption osseuse, INSERM UMR-S 957).

b) Os trabéculaire

L'os trabéculaire est également appelé os spongieux. Il est constitué d'un réseau de travées osseuses composées de plaques de tissu minéralisé reliées entre elles par des arches. Entre les travées osseuses se positionne la moelle hématopoïétique représentant environ 75% du volume total de l'os spongieux. De par sa structure, l'os trabéculaire dispose d'une large surface d'échange (7 m^2) avec la moelle osseuse, lui permettant ainsi d'effectuer au mieux ses fonctions hématopoïétiques. Les cellules ostéoblastiques se trouvant à l'interface de la moelle osseuse et du tissu minéralisé jouent un rôle essentiel dans les échanges entre ces deux structures.

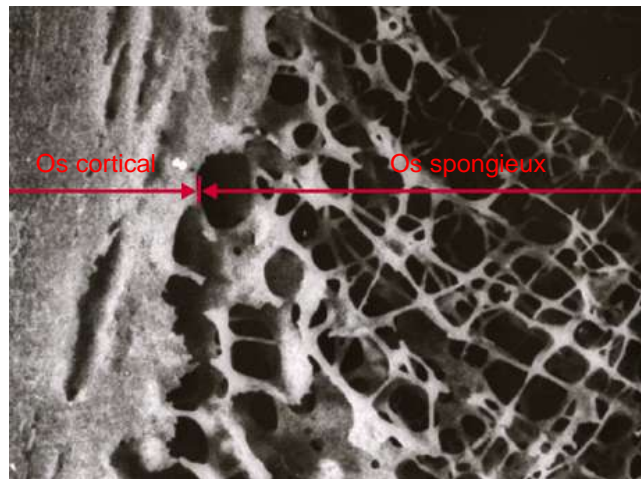


Figure 3 : Jonction entre os spongieux et os cortical (grossissement $\times 40$) (Gotzos et al, 2007).

B. Constituants du tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif constitué de cellules : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes, ainsi que d'une matrice extracellulaire qui occupe entre 92 et 95% du volume tissulaire.

1) La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire peut être subdivisée en deux phases, organique et minérale. Sa teneur en eau, environ 9%, est très variable en fonction de l'âge et du degré de minéralisation.

La fraction organique qui représente 30% de l'os sec et dégraissé est composée essentiellement de fibres de collagène de type I entourées d'une substance fondamentale interfibrillaire. Dans le tissu osseux lamellaire, les fibres de collagène sont arrangées de façon parallèle au sein d'une même lamelle osseuse, mais leur orientation varie d'une lamelle à l'autre. La substance interfibrillaire est composée de constituants variés tels que des glycoprotéines (ostéopontine, sialoprotéine osseuse), des protéines contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé (ostéocalcine), des phosphoprotéines, des phospholipides, des protéoglycanes, des cytokines et des facteurs de croissance. L'ostéocalcine qui est la plus abondante des protéines non collagéniques (10 à 20%) est spécifique de la matrice extracellulaire du tissu osseux. Elle jouerait un rôle dans l'attraction des ostéoclastes dans les foyers de résorption et dans le processus de minéralisation (Glowacki et al, 1991; Swaminathan et al, 2001). Plusieurs protéines non collagéniques telles que l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse et la fibronectine renferment une séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD). Cette séquence RGD caractérise les protéines d'adhérence cellulaire et est reconnue par certaines protéines membranaires appelées intégrines (Ruoslahti et al, 1991). Ainsi, les intégrines présentes à la surface des ostéoblastes permettraient leur attachement à la matrice extracellulaire. Des facteurs de croissance et des cytokines (transforming growth factor ou TGF insulin-like growth factor ou IGF, les interleukines et les bone morphogenetic proteins ou BMP) sont également présents en petites quantités dans la matrice osseuse (Hauschka et al, 1986). Ces facteurs protéiques jouent un rôle important dans l'activation et la différenciation cellulaire et interviennent dans le couplage entre formation et résorption osseuse (Heymann et al, 2008).

La phase minérale qui constitue 70% de la matrice osseuse confère à l'os sa rigidité, sa résistance mécanique et représente la plus importante réserve minérale de l'organisme. En effet, environ 99% du calcium de l'organisme, 85% du phosphore et entre 40 et 60% du sodium et du magnésium sont incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse. Elle est essentiellement composée de phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) disposés dans les espaces interfibrillaires. Leur nombre et leur taille s'accroissent lentement au cours du processus de minéralisation secondaire succédant à la minéralisation primaire qui elle-même suit immédiatement la synthèse de matrice par les ostéoblastes (Heymann et al, 2008).

2) L'ostéoblaste

Les ostéoblastes différenciés sont des cellules mononucléées de forme cuboïdale disposées en une monocouche cellulaire à la surface osseuse (figure 4). Ces cellules ont pour fonction principale la synthèse de la substance ostéoïde, matrice organique qui sera minéralisée par la précipitation à la surface des fibres de collagène de type I et de cristaux de phosphate de calcium.

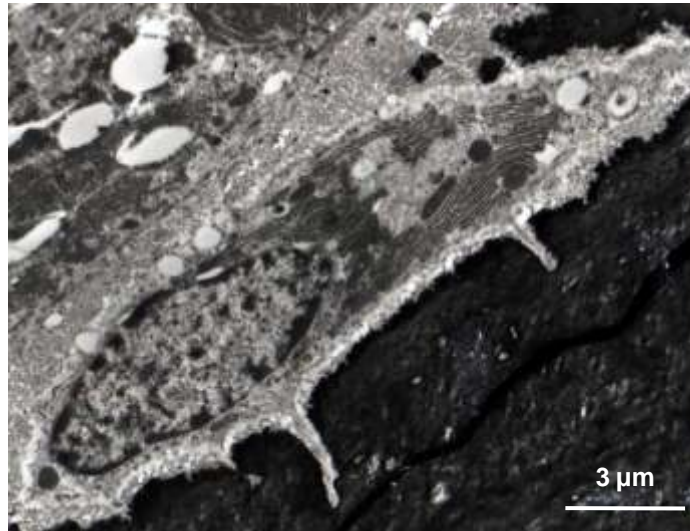


Figure 4 : Ostéoblaste observé par microscopie électronique à transmission (Bosshardt et al, 2005).

D'origine mésodermique, les progéniteurs ostéoblastiques sont des cellules mésenchymateuses (Owen et al, 1988), essentiellement présentes chez l'adulte dans le stroma médullaire mais également au niveau du périoste et de l'endoste. Ces cellules souches pluripotentes sont communes aux ostéoblastes, chondrocytes, myocytes et adipocytes. La différenciation vers l'une ou l'autre voie implique l'expression de facteurs de transcription spécifiques. Ainsi, l'expression de Sox-9 gouvernera la voie chondroblastique, celle de Myo-D la voie myoblastique, celle de RUNX2 la voie ostéoblastique et celle de PPAR γ 2 la voie adipocytaire (Pittenger et al, 1999). Une série complexe d'étapes de prolifération et de différenciation conduisent aux ostéoblastes matures depuis les cellules souches mésenchymateuses (figure 5). Leur cytoplasme renferme un abondant réticulum endoplasmique granuleux responsable d'une importante basophilie du cytoplasme associée à une réactivité forte pour la phosphatase alcaline et un appareil de Golgi très développé

témoins d'une activité de synthèses protéiques importante. Leur fonction principale est la synthèse de la trame protéique de l'os.

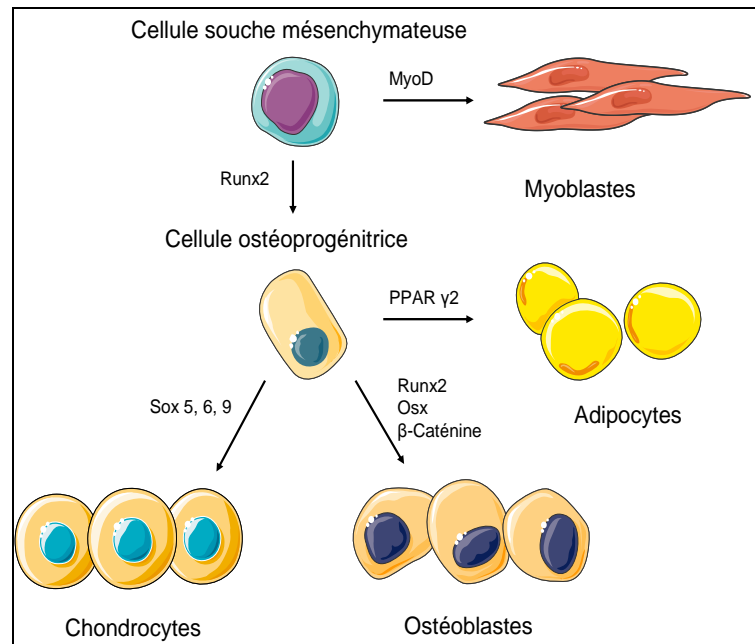


Figure 5 : Les ostéoblastes sont issus de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses sous l'action de facteurs de transcription (d'après Marie, 2008).

L'engagement des cellules précurseurs vers la voie ostéoblastique implique également de nombreux facteurs de transcription. Ainsi, l'importance du complexe AP-1 (constitué d'homo ou hétérodimères de facteurs de transcription de la famille Jun/Fos) dans le développement du tissu osseux a été mise en évidence dans des souris présentant une surexpression de c-Fos, caractérisées par la transformation des ostéoblastes et l'apparition d'ostéosarcomes (Grigoriadis et al, 1993; Wagner et al, 2002). Au contraire, des souris fos $-/-$ présentent un retard de croissance, une ostéopérose, maladie métabolique osseuse autosomique provoquée par une anomalie fonctionnelle des ostéoclastes à l'origine de la persistance de cartilage calcifié dans l'os trabéculaire, ainsi que des défauts dans le remodelage osseux et une hématopoïèse altérée (Wang et al, 1992). L'activité de ce complexe AP-1, très intense dans les ostéoblastes en prolifération, diminue fortement lors de la différenciation terminale en ostéoblastes.

A l'issue de la période de formation osseuse, les ostéoblastes peuvent soit devenir des cellules bordantes soit subir une différenciation terminale en ostéocytes soit mourir par apoptose.

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes inactivés, ou quiescents, et forment une monocouche de cellules aplaties ou fusiformes contenant peu de cytoplasme et peu d'organites ce qui traduit une activité de synthèse réduite. Ces cellules communiquent par l'intermédiaire de fins et courts prolongements cytoplasmiques à l'extrémité desquels se positionnent des systèmes de jonction de type jonctions communicantes. Des molécules de connexine 43 participent à l'organisation de ces systèmes de jonction.

Les ostéocytes proviennent de la différenciation terminale de la lignée ostéoblastique, sous l'action notamment de la Matrix Metalloproteinase de type 2 (MMP-2) et de la Dentin Matrix Protein-1 (Noble et al, 2008) et de l'Oncostatin M (Brounais et al, 2009). Ils sont enfermés dans la matrice organique minéralisée au sein d'une logette dénommée ostéoplaste. Suite à l'activation des ostéoblastes, certains d'entre eux vont peu à peu s'enfouir dans la matrice organique qu'ils ont synthétisée tout en gardant leur liaison avec les ostéoblastes restés en surface grâce à l'établissement de systèmes de jonction communicantes impliquant des molécules de connexine 43. La matrice organique ainsi formée va progressivement se minéraliser, entourant les cellules qui vont y être piégées et se différencier en ostéocytes. Les ostéocytes sont des ostéoblastes « âgés », caractérisés par de fins et longs prolongements cytoplasmiques traversant la matrice organique minéralisée dans de fins canicules. Les ostéocytes possèdent un réticulum plasmique granulaire et un appareil de Golgi réduit par rapport à celui des ostéoblastes actifs, ce qui marque une capacité moindre de synthèse protéique. Chaque ostéocyte établit d'étroit contacts avec ces voisins par l'intermédiaire de système de jonction communicantes. Les ostéocytes jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie phospho-calcique et, en restant en contact avec les ostéoblastes participent à l'harmonisation du remodelage osseux :

- Les ostéocytes interagissent avec les fibres de collagènes tapissant les ostéoplastes par l'intermédiaire de molécule de type intégrine (intégrine β_1) et fonctionnent comme des mécanorécepteurs, percevant les modulations des contraintes mécaniques.
- Les ostéocytes synthétisent des facteurs solubles, comme la slérostine, inhibant la synthèse de matrice organique par les ostéoblastes ainsi que leur différenciation.

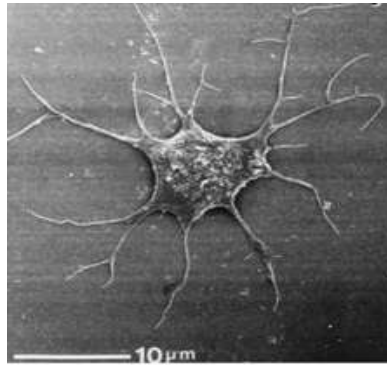


Figure 6 : Ostéocyte en microscopie électronique à balayage, d'après (Tanaka-Kamioka et al, 1998).

3) L'ostéoclaste

Les ostéoclastes sont des cellules post-mitotiques, d'origine hématopoïétique, qui proviennent d'une cellule souche commune à lignée monocyttaire. Ils se forment par fusion de cellules mononucléées et ils semblent qu'ils puissent se former à partir de monocytes circulants. On estime que 3% des monocytes circulant sont des précurseurs ostéoclastiques. Ce sont des cellules de grande taille (de 50 μm à 100 μm de diamètre), multinucléées (de 4 à 10 noyaux) et observables dans les zones de dégradation du tissu osseux.

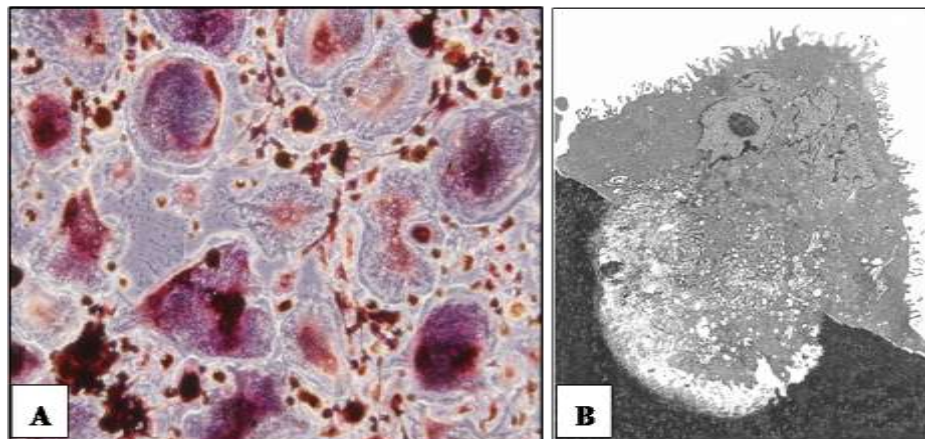


Figure 7 : A. Ostéoclastes obtenus par différenciation de monocytes CD14⁺ en présence de RANKL (100ng/mL) et de M-CSF (25ng/mL) pendant 12 jours ; marquage cytotologique révélant l'activité TRAP des ostéoclastes (grossissement original : ×40). B. Ostéoclaste en cours de résorption issu d'une tumeur à cellules géantes et cultivé sur une pastille de dentine observé au microscope électronique à transmission (×5000) (Heymann et Rousselle, 2000).

En effet, les ostéoclastes sont spécialisés dans la dégradation des matrices calcifiées par un mécanisme extracellulaire dénommé : « résorption osseuse ». Ces cellules ont donc l'ensemble des organites indispensables à cette fonction : de nombreuses mitochondries permettant de fournir l'énergie nécessaire, plusieurs appareils de Golgi, peu de réticulum endoplasmique et d'abondantes vésicules lysosomales contenant des enzymes dont la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP). En résorbant la surface osseuse, les ostéoclastes forment des lacunes de résorption appelées : « lacunes de Howship ».

Ainsi le processus de résorption fait intervenir de nombreuses pompes à protons nécessitant de l'ATP et des enzymes (TRAP, MMP-9 ou cathepsine K). La MMP-9 participe à la migration des ostéoclastes à la surface de la matrice minéralisée. Les protons produits sous l'action d'une anhydrase carbonique de type II sont expulsés sous la bordure en brosse par des pompes à protons membranaires ATP-dépendantes (Holliday et al, 2005). La libération des protons fait chuter le pH de l'environnement sous-ostéoclastique, induit la dissolution des phases minérales du tissu osseux et constitue un environnement optimal pour l'activité des enzymes comme la cathepsine K. L'ostéoclaste libère alors de nombreuses enzymes lysosomales dégradant les éléments de la matrice organique, formant alors une lacune de Howship. Parmi les ions libérés, le calcium induit une dépolarysation des filaments d'actine de la zone clair et un détachement des ostéoclastes, qui se déplacent à la surface du tissu osseux pour résorber une zone contiguë (Chellaiah et al, 2005). Les produits de dégradation de la matrice organique sont expulsés à la partie apical des cellules par transcytose.

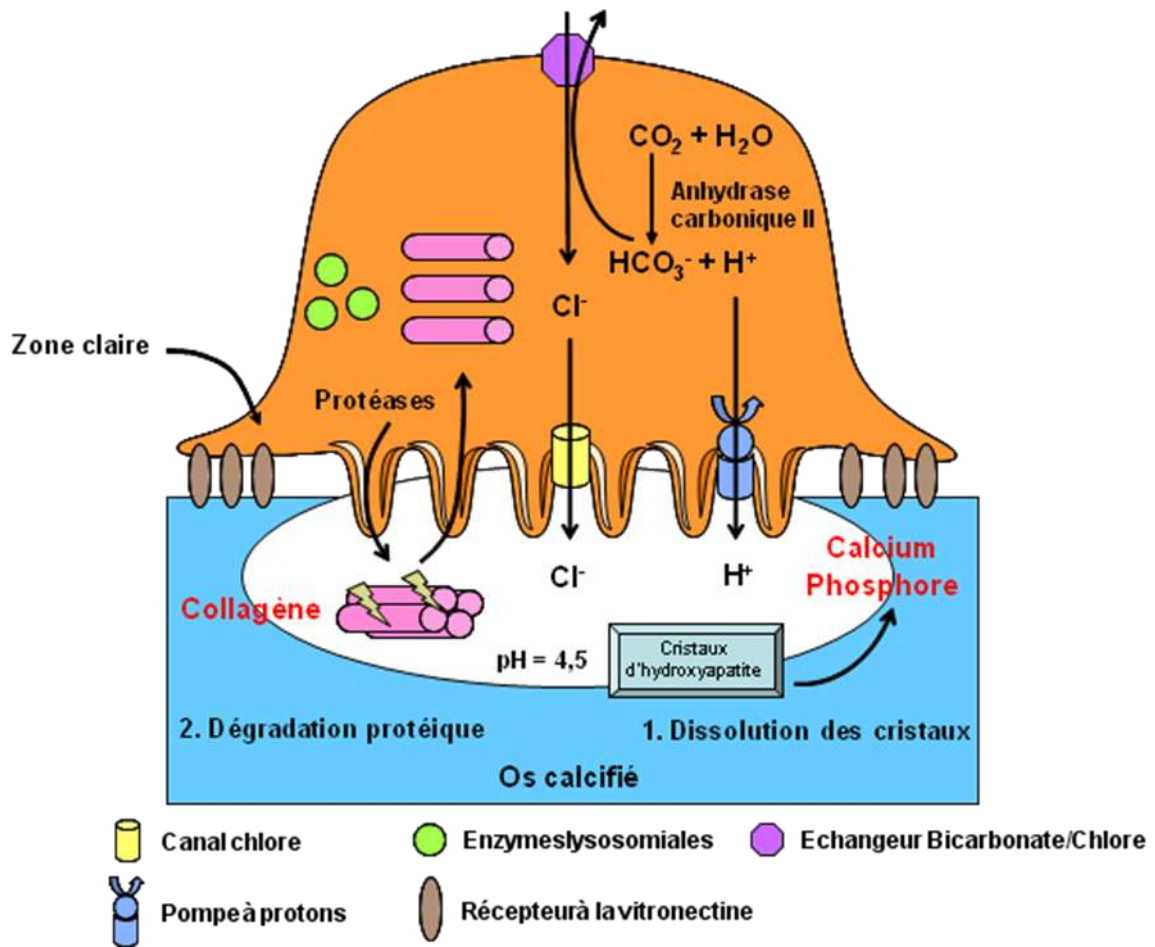


Figure 8 : Schéma d'un ostéoclaste actif (d'après Rousselle et Heymann, 2002).

C. Le remodelage osseux

Tout au long de la vie, l'os est le siège d'un remaniement permanent. Ce processus permet au tissu osseux de s'adapter aux différentes contraintes mécaniques, d'assurer l'homéostasie minérale et assure la cicatrisation des fractures. Cette activité de remodelage donne naissance aux éléments de base de l'os cortical appelés ostéons mais également à l'os spongieux (Frost et al, 1969). Une séquence de remodelage dure en moyenne de 4 à 6 mois et se déroule selon une chronologie bien précise : le remodelage osseux débute par une phase d'activation des ostéoclastes qui conduit à la résorption osseuse suivie d'une phase de transition qui aboutit au recrutement des cellules ostéoprogénitrices, à l'activation des ostéoblastes puis une phase d'inversion et enfin une phase de formation d'une nouvelle matrice osseuse (Hill et al, 1998). A chaque instant, environ 5% des surfaces intracorticales et 20% des surfaces trabéculaires

sont le siège d'un remodelage. Ce processus implique un couplage étroit entre résorption et formation.

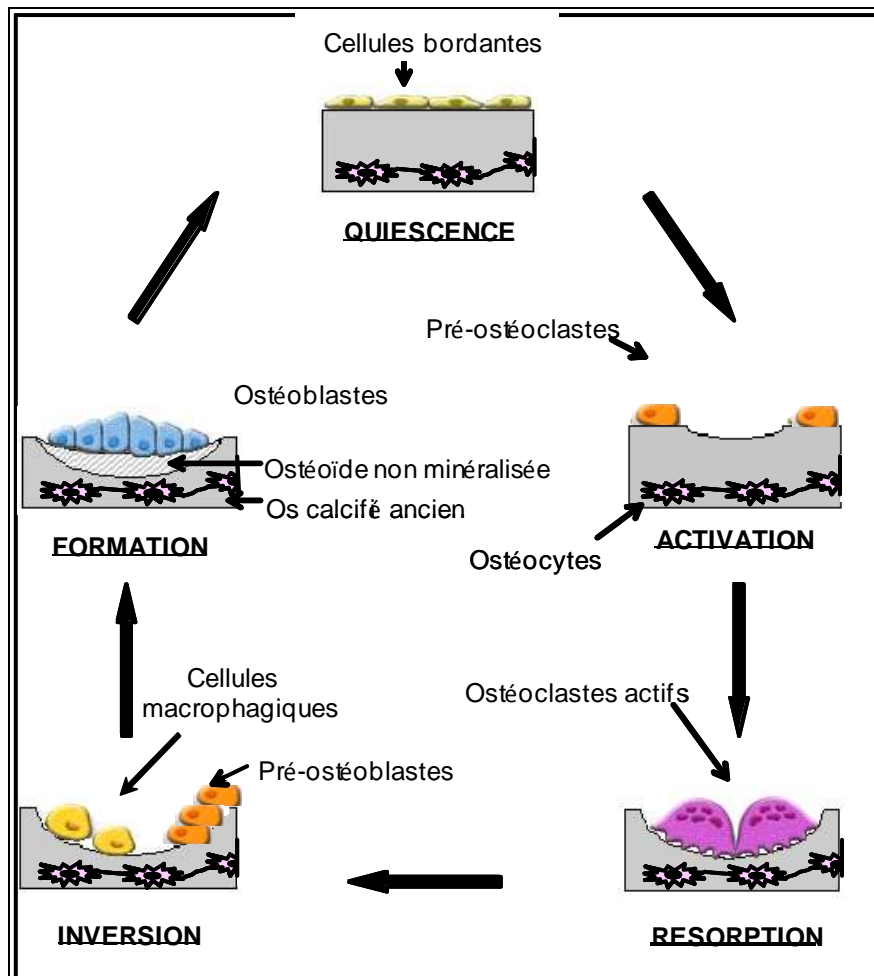


Figure 9 : Les différentes étapes du remodelage osseux.

Phase d'activation : La séquence du remodelage débute en un point d'une surface osseuse quiescente recouverte par des cellules bordantes (figure 9). Ces cellules seraient capables de percevoir un signal d'initiation dont la nature exacte est inconnue mais qui pourrait être de nature hormonale ou cytokinique, comme c'est le cas dans l'ostéoporose où une diminution du taux d'estrogène entraîne une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes (Pacifci et al, 1998). Enfin elle pourrait relever d'un stimulus mécanique (altération de l'architecture locale de l'os : fracture, prise de poids...) (Turner et al, 1998). La captation de ce signal conduirait à la dégradation de la fine couche de matrice non minéralisée située sous les cellules bordantes, exposant ainsi la matrice minéralisée à l'action des ostéoclastes. En effet les cellules bordantes ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se

multiplier ou se différencier à nouveau en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires. Lors de la phase d'activation, sous l'action des facteurs ostéorésorbants [PTH, vitamine D3 et prostaglandine E2,...], les ostéoblastes se rétractent et laissent la place aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui peuvent adhérer à la matrice.

Phase de résorption : Elle débute par l'activation des précurseurs ostéoclastiques présents dans la moelle osseuse au site de remodelage et conduit à leur différenciation en ostéoclastes matures et à leur attachement à la surface osseuse (figure 9). Des études récentes ont montré que la différenciation et l'activité ostéoclastiques sont modulées par des facteurs libérés par les cellules stromales de la lignée ostéoblastique. Parmi les facteurs synthétisés, l'interleukine 6 (IL-6) et le macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) sont des stimulateurs de la résorption. Les cellules stromales ostéoblastiques expriment également RANK ligand (RANKL) qui stimule l'ostéoclastogenèse en agissant sur RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B) situé à la surface des précurseurs ostéoclastiques mononucléés. A l'inverse, l'ostéoprotégérine (OPG), facteur soluble également produit par les cellules ostéoblastiques agit comme un antagoniste de RANK ligand (Simonet et al, 1997; Lacey et al, 1998). Une fois attaché à la matrice osseuse, l'ostéoclaste crée un microenvironnement acide qui permet la dissolution de la phase inorganique qui précède la dégradation de la fraction protéique de la matrice osseuse grâce à l'équipement enzymatique de l'ostéoclaste (figure 9) (Parfitt et al, 1992).

Phase de réversion : Le couplage entre résorption et formation intervient durant la phase de transition. La dégradation de la matrice entraîne une augmentation du taux de calcium intracellulaire des ostéoclastes qui va provoquer une désorganisation des podosomes et par conséquent le détachement de l'ostéoclaste. Les ostéoclastes qui se détachent de la surface osseuse meurent par apoptose vraisemblablement médiée par le système Fas/Fas ligand (Kavanagh et al, 2006). Ces ostéoclastes sont alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune. Il a été suggéré que les facteurs favorisant la formation osseuse soient intégrés dans la matrice osseuse et relargués durant la phase de résorption. Cela concernerait en particulier les insulin-like growth factors (IGF), les fibroblast growth factors (FGF), le transforming growth factor- β (TGF β), les bone morphogenic proteins (BMP) et le platelet

derived growth factor (PDGF). La surface osseuse ainsi libérée par les ostéoclastes et correspondant au fond de la lacune de Howship est riche en éléments tels que l'ostéopontine qui activeraient les ostéoblastes.

Phase de formation : Elle débute par la prolifération des cellules ostéoprogénitrices qui vont ensuite tapisser le fond de la lacune de Howship (figure 9). Les ostéoblastes vont alors synthétiser les constituants de la matrice protéique osseuse. Puis après un délai de 10 à 15 jours, ce tissu se minéralise par le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite dans les espaces interfibrillaires du collagène. Cette étape de minéralisation comporte une phase rapide appelée minéralisation primaire puis se poursuit plus lentement pendant une durée variable appelée minéralisation secondaire. La durée de la minéralisation secondaire est liée à la fréquence du remodelage.

Phase quiescente : Une fois la phase de formation achevée, les ostéoblastes qui en partie meurent par apoptose ou sont emmurés dans la matrice osseuse sous forme d'ostéocytes, laissent la place aux cellules bordantes qui vont recouvrir la surface osseuse (figure 9) et demeurer quiescentes jusqu'à une prochaine activation des ostéoclastes.

En ce qui concerne l'os cortical, les différentes phases durent environ dix jours pour la résorption, quinze jours pour la phase d'inversion et quatre-vingt dix jours pour la formation. En ce qui concerne l'os spongieux, la formation osseuse est plus longue : il faut quatre à six mois pour restaurer l'os lamellaire spongieux.

II. Pathologie osseuse tumorale

A. Les tumeurs osseuses primitives

Les tumeurs osseuses primitives sont considérées comme des pathologies rares et peuvent être divisées en deux groupes : les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes.

Les tumeurs osseuses bénignes sont les plus fréquentes et peuvent s'observer à tout âge avec tout de même une prédilection chez l'enfant et l'adulte jeune. Les tumeurs osseuses primitives malignes représentent moins de 1% des cancers et environ 10% de l'ensemble des tumeurs de l'enfant et de l'adulte jeune. Cependant un second pic d'incidence se situe vers 60 ans avec des tumeurs osseuses primitives qui surviennent à la suite de pathologies du remodelage osseux telles que la maladie de Paget. Aux Etats-Unis, l'incidence annuelle des tumeurs osseuses primitives chez les moins de 20 ans est estimée à 8,7 nouveaux cas par an par million d'habitants. L'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing représentent environ 90% des tumeurs osseuses primitives (Desandes et al, 2004).

Le diagnostic d'une tumeur osseuse repose sur des méthodes d'investigations complémentaires incluant l'imagerie, la chirurgie et l'histologie de manière à mettre en place une thérapie adaptée.

Diagnostic d'une tumeur osseuse primitive

La première étape est toujours la radiologie conventionnelle. S'en passer, et aller directement au scanner ou à l'IRM devant des douleurs ou une masse, peut conduire à des erreurs grossières. L'association de paramètres diagnostiques non radiologiques (comme l'âge, la localisation, la taille, la partie de l'os atteinte...), et radiologiques oriente très fortement le diagnostic et guide l'attitude pratique. L'examen repose sur des clichés orthogonaux de tout l'os douloureux, complétés au besoin par des clichés localisés améliorant la résolution spatiale et donc l'étude des petits détails, des incidences obliques pour détecter des anomalies limitées du cortex ou des calcifications des parties molles. Elle révèle le plus souvent des signes de tumeur très agressive. La tumeur peut être rarement lytique pure, faisant disparaître les travées osseuses, condensantes pures, ossifiées ou contenant des calcifications de type cartilagineuses (arciformes à centre clair). Une biopsie dans une région de ce type peut amener un diagnostic de chondrosarcome, soulignant l'intérêt d'une confrontation multidisciplinaire. Le plus souvent elle est mixte, associant condensation et lyse. La limite de la tumeur avec l'os normal donne une image de sa rapidité d'évolution. Celle des ostéosarcomes est le plus souvent de type perméatif, faite de multiples petites lésions lytiques, la transition entre l'os normal et pathologique ne pouvant être déterminée précisément. Les réactions du périoste à la progression tumorale sont très fréquentes, et là encore traduisent une tumeur agressive. Les spicules périostées perpendiculaires, souvent divergentse (en coucher

de soleil), sont fréquentes et les appositions parallèles sont souvent rompues en leur centre par la rapide progression tumorale (éperon de Codman). L'envahissement des parties molles, quasi constant, n'est évident que si la tumeur est calcifiée, sinon mieux précisé en scanner ou IRM. Au total, l'aspect de lésions agressives souvent très évocateur du diagnostic, doit conduire à compléter l'examen par d'autres techniques d'imagerie, si possible avant la biopsie, qui fausse le bilan d'extension. Le scanner est demandé s'il existe des problèmes diagnostiques (Regent et al, 1986), ou si l'IRM n'est pas disponible pour le bilan d'extension. Il est particulièrement efficace dans l'étude des os courts et plats, rares sièges d'ostéosarcome (figure 10). Dans ces localisations difficiles à étudier sur les clichés conventionnels, le scanner est une précieuse aide diagnostique, révélant des lésions lytiques ou condensantes, une atteinte limitée du cortex, des appositions périostées et la lésion des parties molles. Mais parfois même pour les os longs, il peut améliorer l'analyse de la lésion. Ainsi, de petites calcifications, de minimes appositions périostées perpendiculaires, un envahissement des parties molles, une atteinte de part et d'autre d'un cortex paraissant encore intact (et traduisant ainsi la rapidité de progression tumorale) (Brown et al, 1986), peuvent augmenter la suspicion de malignité.



Figure 10 : A : Ostéosarcome radique clavéculaire peu visible en radiologie ; B : IRM (coupe horizontale) montrant très bien cet ostéosarcome (François Gouin, CHU de Nantes, INSERM U957).

Une bonne technique d'imagerie utilise des coupes d'épaisseur adaptée (fines pour les os longs), et les possibilités de traitement d'images (agrandissements, fenêtrages différents pour l'os et les parties molles, inversion d'images pour analyser l'os dense, mesures de densité). L'injection de produit de contraste n'est pas utile quand l'IRM est également réalisée, la visualisation des parties molles étant supérieure en IRM. Celle-ci ne permet pas une bonne

analyse des calcifications et donc sa valeur diagnostique est très limitée. Les mesures des temps de relaxation, et les études dynamiques après injection n'ont qu'une valeur diagnostique très limitée. Par contre, le contraste très supérieur et le choix du plan de coupe sans déplacer le patient rendent l'IRM très supérieure dans le bilan d'extension (malgré les nouvelles possibilités du scanner avec reconstructions 3D). L'utilisation de l'IRM ou de la TomoDensitométrie (TDM) permettent de localiser avec précision l'extension tumorale et ainsi de faciliter la résection chirurgicale (Gillespy et al, 1988; Panicek et al, 1997).

En plus de l'imagerie de la tumeur primitive, diverses autres analyses radiologiques permettent de déterminer l'extension métastatique de la maladie. En effet, environ 10 à 20% des ostéosarcomes sont métastatiques au diagnostic, principalement au niveau des poumons dans 90% des cas et au niveau osseux dans 10% des cas. La fréquence des métastases est plus élevée dans le sarcome d'Ewing représentant 20 à 30% des cas. La scintigraphie osseuse au technétium-99m, permet de définir la tumeur primitive mais a surtout l'intérêt de rechercher d'autres localisations osseuses (McKillop et al, 1981), d'autant plus qu'environ 30% des patients ayant des métastases peuvent être guéris avec la chimiothérapie et de multiples résections chirurgicales (Bacci et al, 2003; Marina et al, 1992; Meyers et al, 1993).

Lors d'un diagnostic d'une tumeur osseuse primitive, la biopsie est réalisée rapidement après le bilan d'extension locale. La biopsie est donc la première intervention chirurgicale pour un patient avec une tumeur osseuse. Le type de biopsie effectué doit être soigneusement déterminé en évaluant la taille et l'emplacement de la tumeur, le diagnostic différentiel, et l'âge du patient. Il est fortement recommandé que la biopsie soit réalisée par le chirurgien qui effectuera la résection définitive. En effet une biopsie mal réalisée peut rendre la résection impossible (Mankin et al, 1996). Enfin l'anatomopathologie est indispensable pour l'étude des lésions macroscopiques et microscopiques des tissus pathologiques. Ces études permettront de définir le sous-type histologique de la tumeur, d'orienter le diagnostic et gouverneront les soins à apporter. A ce jour, l'imagerie est essentielle pour le diagnostic, pour le bilan d'extension locale et à distance, l'évaluation de l'efficacité du traitement et la détection de récurrence.

B. L'ostéosarcome

1) Définition

Des cas d'ostéosarcomes ont été décrits sur des momies de l'Égypte ancienne datant de plus de 5000 ans (Capasso et al, 2005) avec la possibilité d'une intervention chirurgicale sous forme d'amputation. Un cas également bien documenté d'ostéosarcome, ayant le profil radiologique typique en « feu d'herbes », a été observé sur le fémur d'un jeune péruvien datant de 1100 après JC (figure 11).

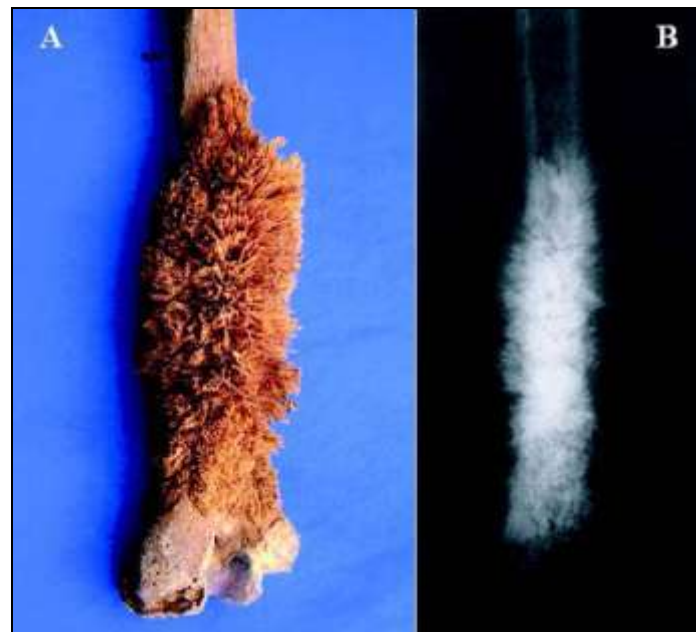


Figure 11 : A : Ostéosarcome du fémur chez un jeune péruvien datant de 1100 après JC,
B : Profil radiologique typique en « feu d'herbes » (B). (Capasso 2005)

L'ostéosarcome est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales (Schajowicz et al, 1993). Trois groupes sont identifiés selon leur localisation : les ostéosarcomes de surface, ceux de siège intracortical et les ostéosarcomes intramédullaires ou centraux qui sont les plus fréquents. Les ostéosarcomes intracorticaux sont extrêmement rares et seules des observations isolées sont rapportées. Les ostéosarcomes développés à la surface de l'os sont généralement de bon pronostic, et les ostéosarcomes centraux regroupent

différentes variantes histologiques qui, à l'exception de la forme dite «bien différenciée intramédullaire», sont toutes de haute malignité. De plus, l'histologie permettra de définir le type d'ostéosarcome (ostéoblastique, fibroblastique ou chondroblastique) (figure 12).

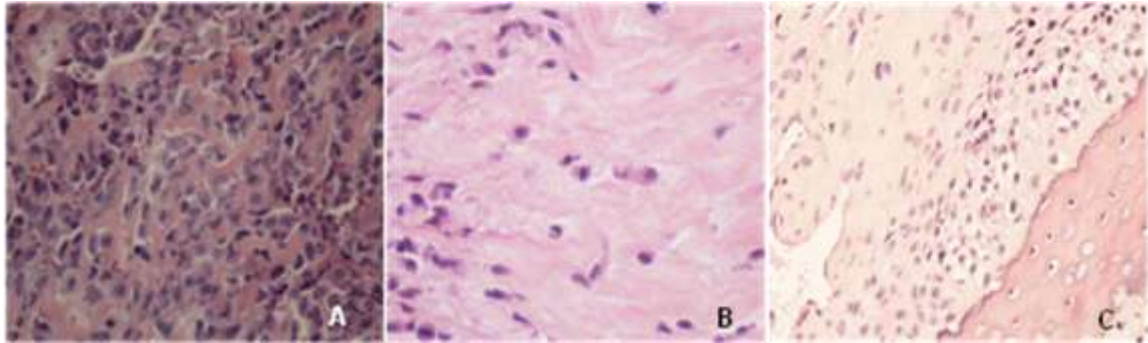


Figure 12 : Préparations histologiques d'ostéosarcomes ; A : Aspect typique d'un ostéosarcome ostéogénique, grossissement x 40. B : Ostéosarcome fibroblastique, grossissement x 20. C : Ostéosarcome chondroblastique, grossissement x20 (MF Heymann, CHU de Nantes, INSERM U957).

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuse primitive maligne avec une incidence annuelle d'environ 4,8 nouveaux cas par million d'enfants de moins de 20 ans aux USA (Linnet et al, 1999) et 3.6 nouveaux cas par million d'enfant de moins de 15 ans en France (Desandes et al, 2004). L'ostéosarcome survient plus généralement sur une population jeune, avec un pic d'incidence observé à l'âge de 18 ans avec une relative prédominance masculine (sex-ratio moyen de 1,4 : 1). Il est rare avant 10 ans, exceptionnel avant 5 ans, mais aussi très rare après 60 ans où il survient généralement sur terrain prédisposé. L'âge de survenue au moment de la poussée de croissance pubertaire, la localisation souvent métaphysaire de ces tumeurs suggèrent un lien entre la croissance osseuse et la survenue des ostéosarcomes (Guinebretière et al, 2001).

L'étiologie de l'ostéosarcome reste inconnue à ce jour. Si de nombreuses théories ont été émises à partir de constatations expérimentales (origine virale, traumatique, chimique, etc.), aucune n'a été confirmée chez l'homme. On constate également une plus grande fréquence de développement chez les sujets de grande taille et à l'inverse une plus faible incidence dans les populations asiatiques et latino-américaines. L'ostéosarcome secondaire se rencontre chez l'adulte ayant préalablement développé une dysplasie fibreuse, une tumeur à cellules géantes, ou bien une maladie osseuse sous-jacente comme

la maladie de Paget ou suite à une radiothérapie (Guinebretière et al, 2001). L'ostéosarcome est très rarement familial, cependant, quelques cas d'ostéosarcomes congénitaux ont été décrits (Lynch et al, 2003). Il survient dans un tableau de tumeurs multiples de différentes variétés histologiques et correspond à la présence d'un gène de prédisposition aux tumeurs (Hauben et al, 2003). On peut citer le syndrome de Li-Fraumeni qui correspond à l'anomalie innée de l'un des allèles du gène p53, où l'enfant développe de multiples tumeurs aussi bien sarcomateuses (os et tissus mous) que carcinomateuses ou le rétinoblastome bilatéral, maladie caractérisée par des tumeurs oculaires bilatérales et où les ostéosarcomes s'observent 100 fois plus fréquemment que dans la population normale (Chauveinc et al, 2001).

Les anomalies cytogénétiques observées dans les ostéosarcomes sont caractérisées par leur extrême fréquence et leur grande complexité (figure 13). Il n'existe pas de lésion génétique spécifique reconnue, mais une fréquente atteinte des loci des gènes p53 (environ 50% des patients)(Sandberg and Bridge, 2003) et Rb (gène du rétinoblastome)(environ 70% des patients) a été observée (Fuchs and Pritchard, 2002; Wadayama et al, 1994, Savola et al, 2010). Une étude réalisée sur une cohorte de 29 patients atteints d'ostéosarcome a ainsi montré que 38% d'entre eux présentent une ou plusieurs altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle de la transition G1-S, et donc dans l'entrée dans le cycle cellulaire (Lopez-Guerrero et al, 2004). Il s'agit principalement de mutations du gène Rb, p53, et/ou de l'amplification des gènes MDM2 (inhibiteur de p53) et CDK4 (Cycline Dependante Kinase 4, nécessaire à la transition G1-S). Une sur-expression du proto-oncogène c-myc (contrôle de la prolifération/différenciation, adhérence et apoptose)(Sandberg et Bridge, 2003) ainsi que du facteur de transcription AP-1 (homo ou hétérodimère de c-Jun et c-Fos régulant des gènes essentiels pour la prolifération et la différenciation des ostéoblastes)(Papachristou et al, 2003) a également été observée dans des ostéosarcomes. Ces protéines touchées par ces mutations peuvent devenir des cibles thérapeutiques intéressantes. En effet, les proto-oncogènes mutés induisent une prolifération anarchique, ainsi une approche permettant d'inhiber l'effet pro-prolifératif est à envisager et rétablirait des signaux contrôlant plus finement la prolifération, tout comme inhiber des inhibiteurs de p53 qui permettrait à p53 d'avoir son effet pro-apoptotique.

De plus, l'analyse des caryotypes a révélé une grande complexité, avec de nombreux réarrangements chromosomiques et des variations dans le nombre de chromosomes, mais n'a conduit à l'identification d'aucune spécificité. La présence d'altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle de la transition G1-S a également pu être corrélée avec la survie des patients, puisque tous les patients présentant de telles altérations étaient décédés durant le suivi, alors que plus de la moitié des autres patients étaient encore en vie à la fin de l'étude. De plus, un lien entre phénotype et génotype a été observé : aucune des mutations recherchées n'a été détectée dans les tumeurs de type ostéoblastique très différenciées qui sont de meilleur pronostic (Lopez-Guerrero et al, 2004).

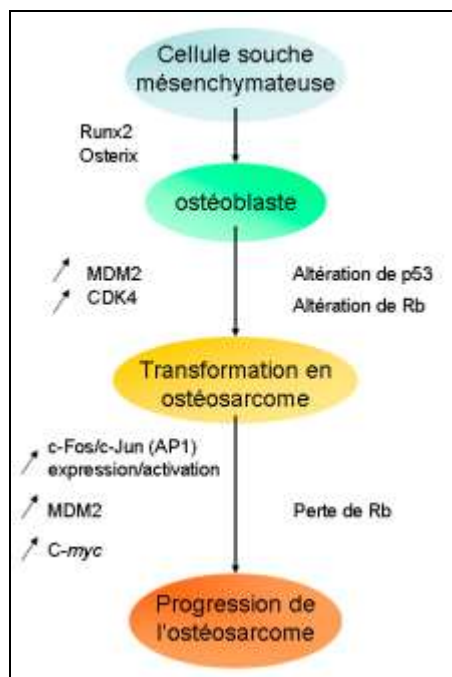


Figure 13 : Mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans le développement et la progression des ostéosarcomes.

La principale manifestation clinique de l'ostéosarcome est la douleur au site tumoral, irradiant vers les articulations voisines. Une masse palpable apparaît plus tardivement, sensible à la palpation et pouvant gêner la mobilité de l'articulation selon la taille. A un stade plus tardif, des signes inflammatoires cutanés et une stase veineuse sont visibles. L'ostéosarcome touche préférentiellement la métaphyse des os longs. Moins de 10 % surviennent à la diaphyse et les localisations épiphysaires sont encore plus rares (figure 13). Il se localise surtout au genou : extrémité inférieure du fémur (40 %) et extrémité supérieure du tibia (15 %), puis à l'extrémité supérieure du fémur et de l'humérus (14 %), sites correspondant aux segments

osseux dont la croissance est la plus importante de l'organisme. Les os plats et les os courts sont plus rarement touchés. Le crâne et la face sont atteints dans moins de 10 % des cas, préférentiellement à la voûte et la base du crâne, ainsi que la mandibule. Des cas d'ostéosarcomes ont été rapportés pour tous les os du squelette, même pour les sésamoïdes (Guinebretière et al, 2001).

Le développement d'un ostéosarcome entraîne, comme nous l'avons vu précédemment, la formation directe d'os ou de substance ostéoïde et également, une ostéolyse maligne (figure 14) qui résulte d'une hyperactivité ostéoclastique, consécutive à la sécrétion de cytokines d'origine tumorale, telles que RANKL, l'IL-1, IL-6, le TNF α , un peptide associé à la parathormone ou Parathormone related peptide (PTH-rP).



Figure 14 : Radiographie d'un ostéosarcome : Ostéocondensations hétérogènes de la métaphyse et de l'épiphyse fémorale, ostéolyse corticale, ostéogénèse dans les parties molles (péri-osseuses) (François Guoin, CHU de Nantes, INSERM U 957)

L'action de ces différents facteurs sécrétés par les cellules tumorales peut agir directement sur les ostéoclastes (figure 15) par l'interaction RANKL/RANK. La résorption osseuse libère à son tour des facteurs de croissance [TGF β et Insulin-like Growth Factor (IGF-1)] piégés dans la matrice extracellulaire. Les produits de dégradation de la matrice stimulent alors la prolifération maligne et un cercle vicieux s'installe entre la prolifération tumorale et l'ostéolyse associée (figure 15).

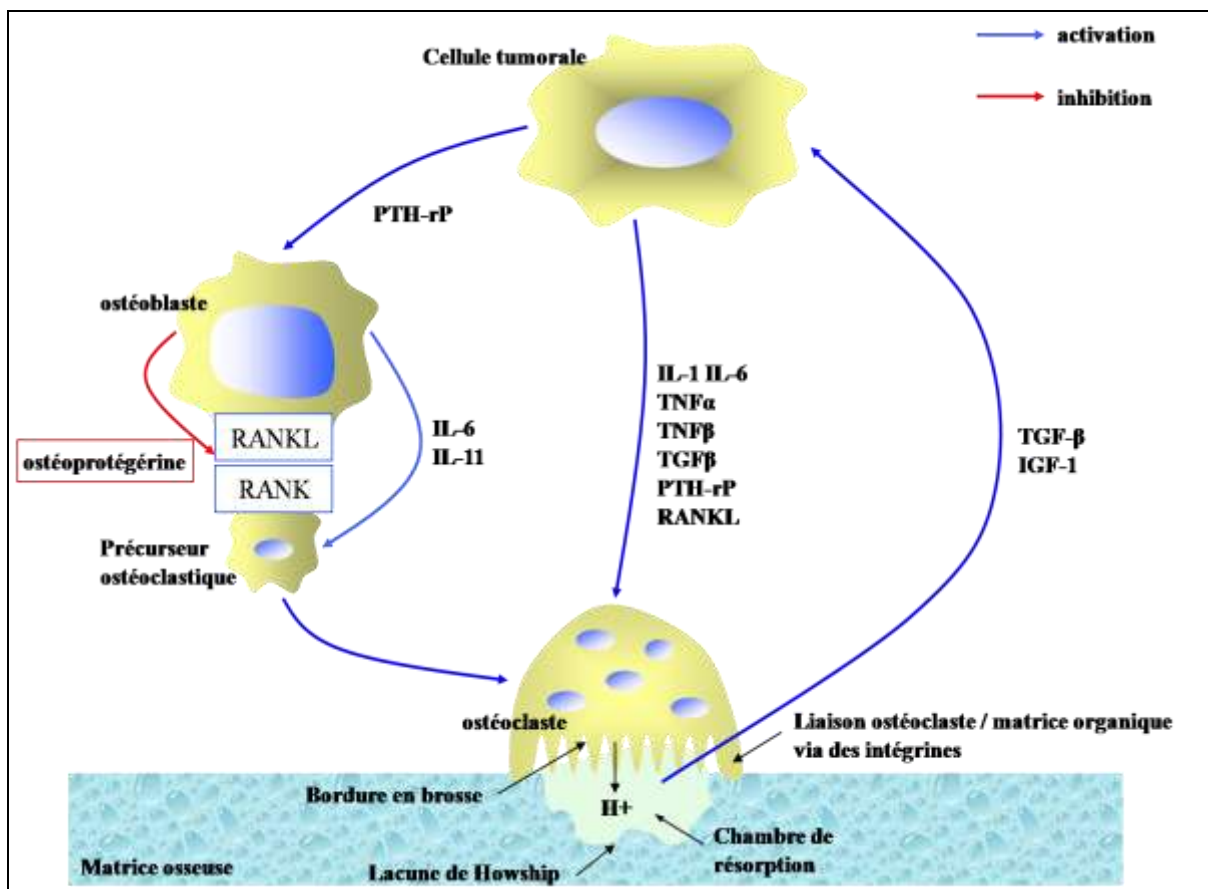


Figure 15 : Cercle vicieux entre prolifération tumorale et hyper-résorption osseuse d'origine maligne. Entre résorption et prolifération tumorale s'instaure un cercle vicieux dans lequel le TGF β et l'IGF-1 libérés de la matrice lors de l'hyper-résorption osseuse stimulent l'activité et la prolifération des cellules tumorales, qui à leur tour produisent des facteurs, qui vont activer la résorption osseuse, directement ou via les ostéoblastes (Ory et al, 2007).

2) Traitements des ostéosarcomes

Jusque dans les années 70, le traitement de l'ostéosarcome était purement local avec comme seul traitement l'acte chirurgical. L'amputation du membre représentait le traitement radical de la tumeur primitive, mais augmentait la survenue de métastases majoritairement pulmonaires chez environ 80% des patients dans les semaines ou les mois suivant l'amputation et conduisait au décès du patient. En effet, avec la chirurgie seule, la survie à 5 ans était de 12% et 3 patients sur 4 décédaient dans les deux ans suivant le diagnostic. Depuis 30 ans, les progrès de la chimiothérapie utilisée de manière néo-adjuvante associée à l'amélioration des techniques chirurgicales conservatrices ont considérablement augmenté les taux de survie qui atteignent 70% à 5 ans dans les meilleures séries. Le concept de chimiothérapie « néo-adjuvante » a été introduit par Rosen en 1976, où la chimiothérapie préopératoire avait diminué le volume de la tumeur chez 17 patients sur 20 et ainsi facilité l'ablation de la tumeur et la conservation du membre (Rosen et al, 1976). Deux études randomisées ont comparé un groupe de patients traités avec chimiothérapie adjuvante et un groupe de patients sans chimiothérapie. Les résultats mettaient en évidence une augmentation significative de la survie dans le groupe de patients traités par chimiothérapie (Eilber et al, 1987; Link et al, 1986).

Même si aucune preuve formelle ne démontre son avantage (Goorin et al, 2003), la chimiothérapie initiale administrée en pré-opératoire offre de multiples avantages, notamment un traitement prophylactique précoce des métastases, une diminution de la taille de la tumeur primitive et la possibilité d'évaluer la réponse histologique à la chimiothérapie préopératoire sur la pièce de résection. En effet, l'étude du taux de nécrose des cellules tumorales au moment de l'exérèse chirurgicale après chimiothérapie préopératoire se révèle être un facteur pronostique en corrélation avec la survie globale du patient. La nécrose tumorale est évaluée par la classification universellement reconnue et établie en 1977 par Huvos (Huvos et al, 1977) qui détermine le pourcentage moyen de cellules viables sur la pièce opératoire. Si moins de 5% de cellules tumorales viables (correspondant au grade III ; Grade IV, aucune cellule viable) sont présentes sur la pièce opératoire, le patient est considéré comme bon répondeur. Les séquences de chimiothérapie adjuvante sont adaptées en fonction de la qualité de la réponse histologique à la chimiothérapie préopératoire. La chimiothérapie adjuvante est différente de celle d'induction et est définie suivant la réponse histologique du patient.

Les quatre molécules les plus utilisées (plus de 20% de réponse en monothérapie) dans le traitement des ostéosarcomes sont le méthotrexate à haute dose, la doxorubicine, le cisplatine et l'ifosfamide (van Oosterom et al, 1992).

- Le méthotrexate (utilisé chez les jeunes patients) est un agent cytotoxique anti-métabolite qui agit en inhibant une enzyme-clé de la synthèse de la thymidine, la dihydrofolate réductase. Après l'injection de méthotrexate à doses élevées (entre 8 et 12 g/m²), il est nécessaire d'administrer une hyperhydratation alcaline et l'antidote de ce médicament qui est l'acide folinique, afin de prévenir les principaux effets secondaires qui sont la toxicité cutanéomuqueuse, rénale et neurologique centrale (Blackwell et al, 1995). Une surveillance quotidienne de la fonction rénale et de la décroissance des taux sanguins de méthotrexate est indispensable afin d'adapter la durée de cette rescue.

- La doxorubicine est un agent cytotoxique considéré initialement comme un agent intercalant, qui agit également en inhibant des enzymes impliquées dans le déenroulement de l'acide désoxyribonucléique (ADN), les topo-isomérases de type II. Les principaux effets secondaires immédiats de cette molécule sont la toxicité hématologique et la toxicité muqueuse, cette toxicité dépend de la dose et du schéma d'administration (Link et al, 1986). Les effets secondaires à long terme de cette molécule sont ceux de la classe des anthracyclines à laquelle elle appartient, avec une atteinte de la contractilité du myocarde aboutissant à des tableaux menaçant d'insuffisance cardiaque si l'on dépasse une dose cumulée de 500 mg/m². Ainsi, les doses de doxorubicine utilisées par cure n'excèdent pas en général 60 à 80 mg/m².

- Le cisplatine est un agent cytotoxique alkylant qui agit en induisant la formation de « ponts inter- et intrabrin » dans les chaînes d'ADN. Cet agent thérapeutique est généralement administré sur un mode séquentiel avec une dose par cure de 80 à 120 mg/m². Les principaux effets secondaires de cette molécule sont la toxicité hématologique, la toxicité rénale, une toxicité neurologique périphérique et auditive. Cette toxicité impose l'administration d'une hyperhydratation saline pendant l'administration du cisplatine (Cvitkovic et al, 1993) et une surveillance attentive de la créatinine et des fonctions auditives avant chaque cure.

- L'ifosfamide est un agent cytotoxique alkylant qui agit en induisant la formation de ponts interbrins en se fixant sur le N7 des guanines. Cette molécule est généralement administrée sur un mode séquentiel avec une dose de 1 à 3 g/m²/j pendant 4 à 5 jours et ceux toutes les trois semaines. Les principaux effets secondaires de ce médicament sont la toxicité hématologique, l'alopécie, la toxicité neurologique, la toxicité rénale et la toxicité vésicale

(Cvitkovic E 1993). Cette dernière toxicité impose l'administration conjointe de mesna et d'une hyperhydratation. Le mesna est utilisé pour protéger le patient contre certains effets nocifs au niveau de la vessie provoqués par certains agents de chimiothérapie appelés oxazaphosphorines (tels le cyclophosphamide et l'ifosfamide). Après son injection, le mesna demeure dans le sang et il est rapidement acheminé dans le rein. Dans le rein, il se lie aux métabolites des drogues antitumorales potentiellement nocifs pour la vessie et les rend inoffensifs. Le cyclophosphamide a également été utilisé dans les programmes de chimiothérapie adjuvante, et de phase II pour les ostéosarcomes. Le taux de réponse en monothérapie est cependant faible et l'efficacité du protocole est discutée (Mosende et al, 1977).

Le traitement actuel, basé sur une polychimiothérapie néo-adjuvante souvent mal tolérée associée à une chirurgie conservatrice, a largement contribué à l'amélioration du taux de survie des patients dans ces dernières années. Cependant, une absence de réponse aux drogues anti-tumorales est souvent observée et demeure un problème majeur conduisant au développement de métastases puis au décès du patient. De plus, les séquences de traitement, les hospitalisations répétées font de la chimiothérapie un traitement difficile à supporter dégradant la qualité de vie du patient. C'est pourquoi, de nouvelles approches thérapeutiques sont en développement. Parmi celles-ci, l'utilisation des bisphosphonates connus pour leur action inhibitrice de la résorption osseuse est l'une des approches envisagées dans le traitement des tumeurs osseuses primitives (Moriceau et al, 2010). Les bisphosphonates sont actuellement utilisés dans le traitement palliatif des métastases osseuses par certains cliniciens (Holen et al, 2010). Dans ce contexte, une étude multicentrique (protocole « OS 2006 ») est actuellement en cours [Promoteur : Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer, investigateur principal : Dr L. Brugières (Institut Gustave Roussy)], avec pour objectif d'étudier l'intérêt thérapeutique de l'acide Zolédronique en association avec la chimiothérapie conventionnelle. Ce programme prévoit l'inclusion de 470 patients sur une période de 6 ans avec un suivi de 3 ans après la dernière inclusion.

C. Résistance aux agents thérapeutiques

Le traitement des cancers est devenu au cours des dernières années de plus en plus sophistiqué et cible désormais des molécules impliquées dans la prolifération anarchique des

cellules tumorales (cycle cellulaire, voies métaboliques, voies apoptotiques, microenvironnement tumoral). Le principal défi est alors d'administrer une dose de drogue qui maximise l'efficacité et réduit la toxicité du traitement. Cependant, aucun traitement n'est efficace à 100% en raison de résistances mises en place par les cellules tumorales. L'origine de ces résistances est multiple et liée à la variabilité inter-individuelle des patients mais aussi à la variabilité génétique des cellules au sein d'une même tumeur.

Dans la majorité des cas la résistance est intrinsèque à la tumeur ; elle survient rapidement lors de l'administration des premières séances de chimiothérapie, sans phase de sensibilité initiale. En effet, il y a une trentaine d'années, Goldie et Coldman (Goldie et al 1979) proposaient un modèle mathématique pour expliquer l'apparition de clones malins résistants dans une tumeur. Ce modèle postulait l'apparition statistiquement probable de mutations donnant une moindre sensibilité à un ou plusieurs agents cytostatiques. La théorie de Goldie et Coldman repose sur le fait qu'au moment du diagnostic la plupart des tumeurs possèdent des clones résistants. En effet, pour un gramme de tumeur, soit 10^9 cellules, le taux de mutation par gène est probablement de 10^{-5} donc 10^4 clones sont potentiellement résistants à une drogue donnée dans cette tumeur. La résistance à deux drogues survient alors dans moins de une cellule sur 10^{10} cellules. Ceci est la base de l'intérêt d'utilisation de plusieurs drogues dans un protocole de chimiothérapie. Cependant, après une première phase de chimiothérapie des résistances apparaissent témoignant d'une résistance acquise.

Cette résistance acquise à un large spectre de molécules thérapeutiques est induite par l'expression de protéine membranaire détectant et évacuant ces molécules hors de la cellule. Cet efflux a pour conséquence une diminution de la concentration intra-cytoplasmique de drogue et donc une diminution de l'efficacité de l'agent anti-tumoral. Ce phénomène, plus connu sous le nom de phénotype MDR (multidrug resistance), a été mis en évidence par Biedler et Riehm, en 1970, dans des lignées tumorales. Ils ont observé qu'en rendant ces cellules résistantes à un agent cytostatique, celles-ci devenaient simultanément résistantes à d'autres agents cytostatiques de mode d'action et de structure totalement différents (Biedler et al, 1970). Cette résistance, retrouvée depuis dans beaucoup de lignées tumorales d'espèce et d'origine tissulaire différentes, s'observe vis-à-vis des anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine), des alcaloïdes (vinblastine, vincristine), des taxanes et des épipodophyllotoxines (étoposides). Le phénotype MDR se caractérise par un efflux actif (adénosine triphosphate [ATP]-dépendant) des cytostatiques (Figure 16). Cet efflux est gouverné par plusieurs molécules de la même famille des transporteurs à cassettes ATP

également appelés transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) c'est-à-dire que ces pompes sont dépendantes de l'ATP et qu'elles utilisent l'énergie fournie par l'ATP pour expulser à l'extérieur de la cellule un grand nombre d'agents de chimiothérapie ou de xénobiotiques. Le rôle de ces protéines semble essentiellement la protection des cellules et des organismes contre les xénobiotiques, substances d'origine naturelle potentiellement toxiques. Plusieurs familles de cytostatiques hydrophobes, extraits de plantes ou de microorganismes, sont typiquement des xénobiotiques. La structure minimale d'une protéine ABC est composée d'un site de liaison de l'ATP (*ATP-binding cassette*) de 200 à 250 acides aminés, et de six domaines hydrophobes transmembranaires. La structure habituellement rencontrée est un redoublement de cette structure minimale (deux sites ATP et 12 sites transmembranaires) (figure 16).

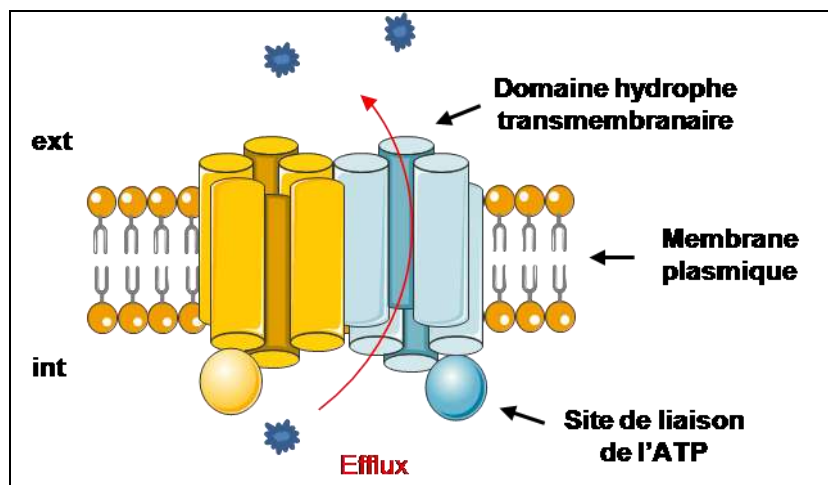


Figure 16 : Protéine ABC avec structure redoublée (Adapté d'après Li et al, 2010).

Ces transporteurs ABC sont composés de :

- la P-glycoprotéine (*permeability glycoprotein*), mise en évidence dans des cellules malignes et dans des tissus normaux [cortex surrénalien, cellules endothéliales de la barrière hémoméningée (Diaz-Borjbn et al, 1999)] (Nielsen et al, 1996) et est codée par le gène MDR1 localisé sur le chromosome 7 (Kantharidis et al, 2000).
- les MRP (*multidrug resistance associated protein*) caractérisés par la présence dans la membrane plasmique d'autres protéines « canaux » codées entre autre par les gènes MRP₁ et MRP₂ (Leslie et al 2001). Elles sont exprimées dans la partie basale des hépatocytes et sont

impliquées dans le transport biliaire. Plusieurs mutations de leurs gènes ont été observées chez des patients atteints du syndrome de Dubin-Johnson (DJS), syndrome autosomique récessif caractérisé par une hyperbilirubinémie conjuguée. Ce phénotype est caractérisé par un efflux dépendant de l'ATP des médicaments sous forme conjuguée au glutathion (GSH).

- les MXR (Mitoxantrone Resistance associated transporter) et les BCRP (Breast Cancer Resistance Protein).

- la LRP (Lung Resistant Protein), identifiée dans une lignée résistante de cancer du poumon, cette protéine régulerait l'entrée nucléaire des médicaments concernés. Il ne s'agit pas d'une protéine de la famille ABC. Sa palette de résistance est plus large que celle des protéines ABC, et s'étend en particulier aux alkylants et aux sels de platine. Cette protéine est l'homologue de la *major vault protein* de rat qui constitue un composant majoritaire d'une organelle intracytoplasmique ayant probablement un rôle dans le trafic cellulaire (Scheffer et al 2000).

La diversité de réponse des cellules tumorales aux agents de chimiothérapies est une des difficultés à contourner par les cliniciens pour optimiser le traitement des patients. En effet, chaque cellule tumorale d'un patient donné possède une carte génétique qui lui est unique. Par conséquent, chaque tumeur présente un profil de résistance différent, et les cellules au sein d'une même tumeur présentent une forte hétérogénéité vis-à-vis des mécanismes de résistance. Les mécanismes de résistance entre deux cellules issues d'un même clone peuvent églement différées avec un rôle important du microenvironnement de la cellule tumorale. De plus, même si une tumeur n'est pas intrinsèquement résistante à un agent de chimiothérapie en particulier, son hétérogénéité génétique pourra la conduire à acquérir une résistance par sélection clonale face à une drogue active imposant une forte sélection (Di Nicolantonio et al, 2005).

D'autres mécanismes de résistance existent, ne mettant pas en jeu de pompe à efflux et n'induisent de résistance qu'à une quantité réduite de médicaments ayant des mécanismes d'action semblables (figure 17) : à savoir, perte des récepteurs membranaires ou encore augmentation ou altération de la cible spécifique du médicament. Dans de telles situations, l'utilisation de plusieurs agents thérapeutiques ciblant des mécanismes moléculaires différents suffisent dans la majorité des cas à obtenir une bonne réponse aux traitements. Malheureusement, le plus souvent les cellules possèdent des mécanismes qui leur confèrent une résistance simultanée à des drogues ayant des structures et des mécanismes différents. Ce

phénomène nommé « Multidrug resistance » a différentes origines : une augmentation de l'efflux (décrit précédemment), une réduction de l'assimilation du médicament, une modification de la structure lipidique de la membrane plasmique (Liu et al, 2001), des modifications génétiques bloquant la mort cellulaire (Lowe et al, 1993), une activation des mécanismes de réparation de l'ADN (Synold et al, 2001), une altération de la régulation du cycle cellulaire ou une inhibition de l'internalisation nucléaire *via* les LRP (Lung Resistance Protein) (Dalton et al, 1999).

De manière générale, les lésions induites par les agents cytostatiques, si elles sont irréparables, induisent la mort cellulaire programmée ou apoptose. Par conséquent tous les facteurs pouvant diminuer cette mort cellulaire chimio-induite vont augmenter la survie cellulaire des cellules tumorales, et donc la résistance à tous les agents cytostatiques. A titre d'exemple la protéine p53 est activée en réponse aux dommages de l'ADN, et stoppe le cycle cellulaire en phase G1 (*via* p21), permettant soit la réparation de l'ADN lésé, soit l'induction de l'apoptose si les lésions sont irréparables, jouant ainsi son rôle de gardien de l'intégrité du génome. Dans le cas d'une mutation de p53, le seuil de lésion de l'ADN conduisant à l'apoptose augmente, responsable d'une survie cellulaire et d'aggravation des lésions géniques transmises aux cellules tumorales filles. Des altérations géniques des inhibiteurs de cycle cellulaire sont également observées, par exemple dans la famille INK4 (p15 et p16), qui contrôlent la progression des cellules de la phase G1 à la phase S. En effet, un taux élevé de p27, inhibiteur universel des cyclines, dans les lymphocytes tumoraux est corrélé à une résistance relative à la fludarabine *in vitro* et une évolutivité plus rapide de la maladie (Vrhovac et al 1998).

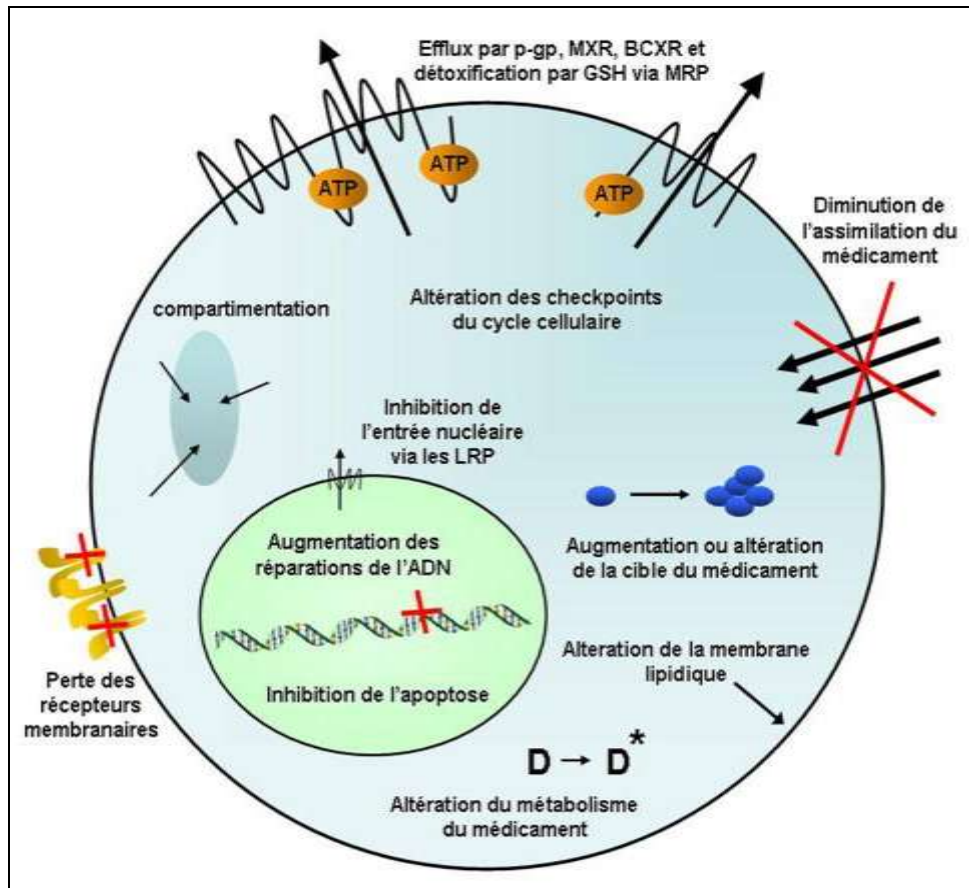


Figure 17 : Principaux mécanismes de résistances aux agents anti-tumoraux observés dans les cellules cancéreuses (Adapté d'après Baggetto et al, 1997).

D. Phénomènes de résistance dans l'ostéosarcome

Dans le traitement des ostéosarcomes, la polychimiothérapie a permis d'atteindre un taux de survie de 70% au milieu des années 1980 dans les meilleures séries à 5 ans (Bertermann et al, 1985). Ce protocole thérapeutique repose sur des cures alternées combinant différents agents pharmacologiques et alternant une chimiothérapie d'induction, chirurgie et chimiothérapie adjuvante. Cependant, le taux de survie peine à être amélioré et ce malgré l'apparition de nouvelles thérapies anti-tumorales. C'est pourquoi l'étude des mécanismes de résistance impliqués dans l'échappement thérapeutique des ostéosarcomes est une étape primordiale de l'amélioration du taux de survie.

Les mécanismes de résistance des ostéosarcomes vis-à-vis des agents anti tumoraux sont bien documentés (Chou et al, 2006). Les études de cytogénétique réalisées dans

l'ostéosarcome montrent l'existence d'une grande instabilité génétique avec la présence d'anomalies chromosomiques multiples, avec des variations importantes d'une tumeur à l'autre et au sein d'une même tumeur, d'une cellule à l'autre. Les anomalies les plus fréquentes sont l'amplification des régions 6p12-p21, 17p11.2 et 12q13-q14 et la perte de régions chromosomiques en particulier 2q, 3p, 9, 10p, 12q, 13q, 14q, 15q, 16, 17p et 18q (Wang et al, 2005). Ces modifications génétiques affectent des voies de signalisations essentielles à la cellule telles que : des altérations des voies de régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire régulées par p53 et Rb (Arndt et al 1999; Sandberg et al 2003), des modifications d'oncogènes telles que la délétion de p16^{INK4A} (inhibiteur des cyclines dépendantes des kinase 2A) ainsi qu'une surexpression de c-fos et une amplification de la kinase dépendante des cyclines 4 (cdk4) (Benassi et al, 1999; Wei et al, 1999; David et al, 2005). Cette instabilité génétique conduit à l'existence d'une population cellulaire hétérogène au sein d'une même tumeur et à l'émergence de sous populations résistantes. L'ostéosarcome est une tumeur décrite comme étant relativement résistante aux traitements chimiothérapeutiques, en effet des agents habituellement actifs dans les autres tumeurs solides pédiatriques telles que la vincristine et le 5-fluorouracil s'avèrent inefficaces dans le traitement des ostéosarcomes (Pratt et al, 1994). Les résistances les plus fréquemment décrites sont les résistances au cisplatine, à la doxorubicine et au méthotrexate (Banerjee et al, 1995). Ces résistances ont alors pour origine les mécanismes suivants: mutation de la cible du médicament, surexpression ou sous expression de la cible du médicament, diminution de l'assimilation du médicament, inactivation du médicament, augmentation de l'élimination du médicament et augmentation des réparations de l'ADN (Grem et al, 1988; Siddik 2003; Beretta et al, 2004). Cependant, le mécanisme de résistance le plus cité pour les ostéosarcomes reste le phenotype MDR (MultiDrug Resistance phenotype) dû à la surexpression à la membrane de la P-gp ou autres protéines associées. En effet les niveaux d'expression de MDR1 (Gomes et al, 2006) ou de la P-gp (Baldini et al, 1999; Serra et al, 2006) peuvent être utilisés en tant que facteurs pronostiques. Plus récemment, d'autres facteurs pronostiques ont été décrits tels que le niveau d'expression des Clusterin/Apolipoprotein J (Lourda et al, 2007), l'expression de PXR (Pregnate Xenobiotic Receptor) un inducteur majeur du cytochrome P450 3A4 (Mensah-Osman et al, 2007) ou encore l'expression de la glutathion S-transferase P1, une enzyme de détoxification cellulaire fréquemment impliquée dans les mécanismes de résistance (Huang et al, 2007). Ces facteurs pronostiques de la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques permettent de personnaliser les traitements aux patients et ainsi d'améliorer leur prise en charge.

E. Stratégies innovantes pour contourner ces phénomènes de résistance

Le phénomène de résistance thérapeutique est un des problèmes majeurs rencontrés au cours du traitement des cancers. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de limiter ou d'éviter l'émergence de ces phénomènes de résistance. Les stratégies proposées pour cela ont été très diverses :

- Inversion de l'efflux des cytostatiques dû aux pompes ABC en utilisant des cytostatiques non efflués par les protéines ABC. Le succès des traitements par la cytarabine à fortes doses dans les Leucémies Aiguës Myéloblastiques (LAM) en échec pourrait être expliqué par l'absence d'efflux de cet analogue des bases pyrimidiques par la P-gp (Ratnam et al, 2003).
- Inhibition de la P-gp en utilisant des molécules interagissant avec elle telle la Vérapamil. La perspective de contrôler la chimiorésistance en co-administrant ces produits avec les cytostatiques chez des patients porteurs de tumeurs multirésistantes a conduit à de nombreux essais de phases I et II. La plupart de ces médicaments agissent par compétition avec les cytostatiques auprès de la P-gp, sans modifier son expression (Donmez et al, 2010).
- Restauration de l'apoptose en inhibant bcl-2 par exemple. L'utilisation d'un SiRNA ciblant bcl-2 augmente de façon très nette l'apoptose chimio-induite (Deiters et al, 2010).
- Sensibiliser les cellules tumorales à l'aide d'autres agents qui permettront une nouvelle chimio-sensibilité (Riggins et al, 2005).

Enfin les thérapies ciblées qui sont basées sur une cible spécifique, connue, ouvrent de nouvelles voies thérapeutiques. Elles reposent non plus sur l'utilisation de drogues à très fortes doses engendrant des effets secondaires pour les patients mais s'orientent sur une protéine responsable d'une sur-prolifération ou d'une anomalie induisant une cancérisation. Cette nouvelle approche est fondée sur plusieurs principes :

(a) une meilleure connaissance de la biologie du cancer permettant d'identifier des cibles potentielles spécifiques de chaque cancer et leurs inhibiteurs.

(b) de nouvelles techniques permettant une identification plus rapide de ces cibles.

(c) une connaissance approfondie de la cible dans le cadre de tumeurs malignes spécifiques produisant des biomarqueurs prédictifs et s'accompagnera de tests de diagnostic qui permettra une meilleure posologie thérapeutique.

(d) la compréhension de la cible en détail permettant de découvrir les mécanismes de la résistance aux médicaments et les moyens de les contourner (Hait et al, 2009).

L'exemple concret d'une thérapie ciblée est l'utilisation de l'imatinib (gleevec) dans le cadre de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC). La découverte de l'anomalie génétique spécifique de la LMC a montré la présence d'un chromosome Philadelphie, qui était dû à une translocation réciproque $t(9;22)(q34;q11)$ dans lequel un morceau du bras long du chromosome 9 (q34) est remplacé par un fragment du bras long du chromosome 22 (q11). Cette translocation donnant naissance à la protéine de fusion BCR : abl, Owen Witte et ses collègues ont démontré en 1984 que la protéine BCR: abl induit la transformation des précurseurs myéloïdes et, par conséquent, représente l'événement pathologique sous-jacent à la formation de la LMC. La démonstration de l'activité tyrosine kinase de BCR: abl conduit à la prise de conscience que cela pourrait être une cible pour traiter la LMC. Dans le début des années 1990, Druker et ces collaborateurs débutent des études avec petites molécules inhibitrices de la kinase Abl. Ils identifient l'Imatinib ou STI571 (signal transduction inhibition) comme candidat clinique. Ils effectuent ensuite des études cliniques qui ont montré une activité remarquable de l'imatinib dans la phase chronique (moins de 5% de blastes dans le sang) de la CML, avec une activité réelle, mais moins en phase accélérée (6 à 30% de blastes dans le sang) et blastique (30% ou plus) (Hait et al, 2009).

Il est désormais possible d'identifier et de valider en même temps une cible en utilisant l'ARN interférence (ARNi). Des bibliothèques d'ARNi peuvent être utilisées pour dépister des cibles spécifiques des cellules cancéreuses. La cible peut alors être clonée et exprimée, et les bibliothèques chimiques contenant des centaines de milliers voire des millions de composés sont « projetées » contre l'activité de l'enzyme purifiée dans des analyses à haut débit afin de générer des structures chimiques qui montreront un certain niveau d'activité avec la cible. Ces structures peuvent être optimisées contre la cible, puis purifiées dans des lignées cellulaires cancéreuses souvent mises en place pour une cible spécifique. La puissance de la biologie structurale couplée avec la chimie basée sur des fragments conduisent à la production rapide de composés aux propriétés améliorées, ce qui augmente la probabilité d'une meilleure optimisation et au final une meilleure efficacité.

Cependant la thérapie ciblée affiche aussi ces limites car compte tenu de l'hétérogénéité génétique et de la plasticité de la plupart des cancers, il est peu probable que l'utilisation d'un agent ciblant une seule molécule suffira à obtenir une rémission de longue durée et totale dans

la plupart des cancers car l'inhibition d'une seule protéine induira des boucles de rétrocontrôle. A titre d'exemple, de récentes études démontrent que l'inhibition de mammalian target of rapamycin (mTOR) par RAD001 (dérivé de la rapamycine) conduit à l'augmentation de l'activation de ERK, probablement par un rétrocontrôle négatif faisant intervenir S6K-PI3K-RAS (Stegmeier et al, 2010). L'inhibition de mTOR est donc compensée par d'autres voies métaboliques.

Dans ce contexte, il est fort probable que la conception de combinaisons thérapeutiques permettra d'éviter les compensations métaboliques et améliorera les thérapies anti-cancéreuses dans les cancers à un stade avancé.

Plusieurs stratégies de combinaisons peuvent être envisagées :

- Combinaisons médicamenteuses ciblant des voies de signalisation parallèles (« combinaisons horizontales »). Plusieurs molécules thérapeutiques peuvent agir sur différentes cibles moléculaires qui appartiennent à des voies métaboliques différentes et qui interviennent dans une signalisation importante de la cellule. De cette façon, la cellule tumorale qui de façon intrinsèque peut résister à l'effet d'un agent thérapeutique aura plus de difficultés à résister lors d'une association médicamenteuse car les compensations métaboliques seront plus difficiles à mettre en place. Ces boucles de rétrocontrôle mises en place pour une seule molécule seront beaucoup moins efficaces du fait de l'étendue de l'action des différentes molécules.
- Combinaisons médicamenteuses ciblant des « nœuds » moléculaires différents au sein de la même voie de signalisation (« combinaisons verticales »). Cette approche a pour but d'optimiser l'inhibition d'une voie de signalisation entière et d'éviter la mise en place de certaine boucle de rétrocontrôle compensant l'effet inhibiteur d'un des deux agents.
- Combinaisons médicamenteuses inhibant une même cible *via* des mécanismes différents. Dans le cas de l'acquisition d'une seconde mutation qui rendrait l'enzyme cible réfractaire à l'inhibition induite par la première molécule, l'utilisation de deux molécules ciblant la même protéine mais avec une action totalement différente et donc complémentaire tendrait à éviter l'émergence de résistance et à augmenter leur efficacité (Stegmeier et al, 2010) (figure 18).

La meilleure compréhension de la biologie des cancers (contexte génétique de la tumeur, propriété intrinsèque de la tumeur) ainsi que le développement de nouvelles thérapies

ciblées combinatoires nous permettront d'élargir les schémas de traitements pour les patients. Le but étant d'améliorer l'efficacité tout en minimisant les effets secondaires et d'éviter l'émergence de phénomènes de résistance. Les thérapies ciblées ouvrent la porte à une nouvelle ère passionnante dans la recherche de nouveaux médicaments contre le cancer.

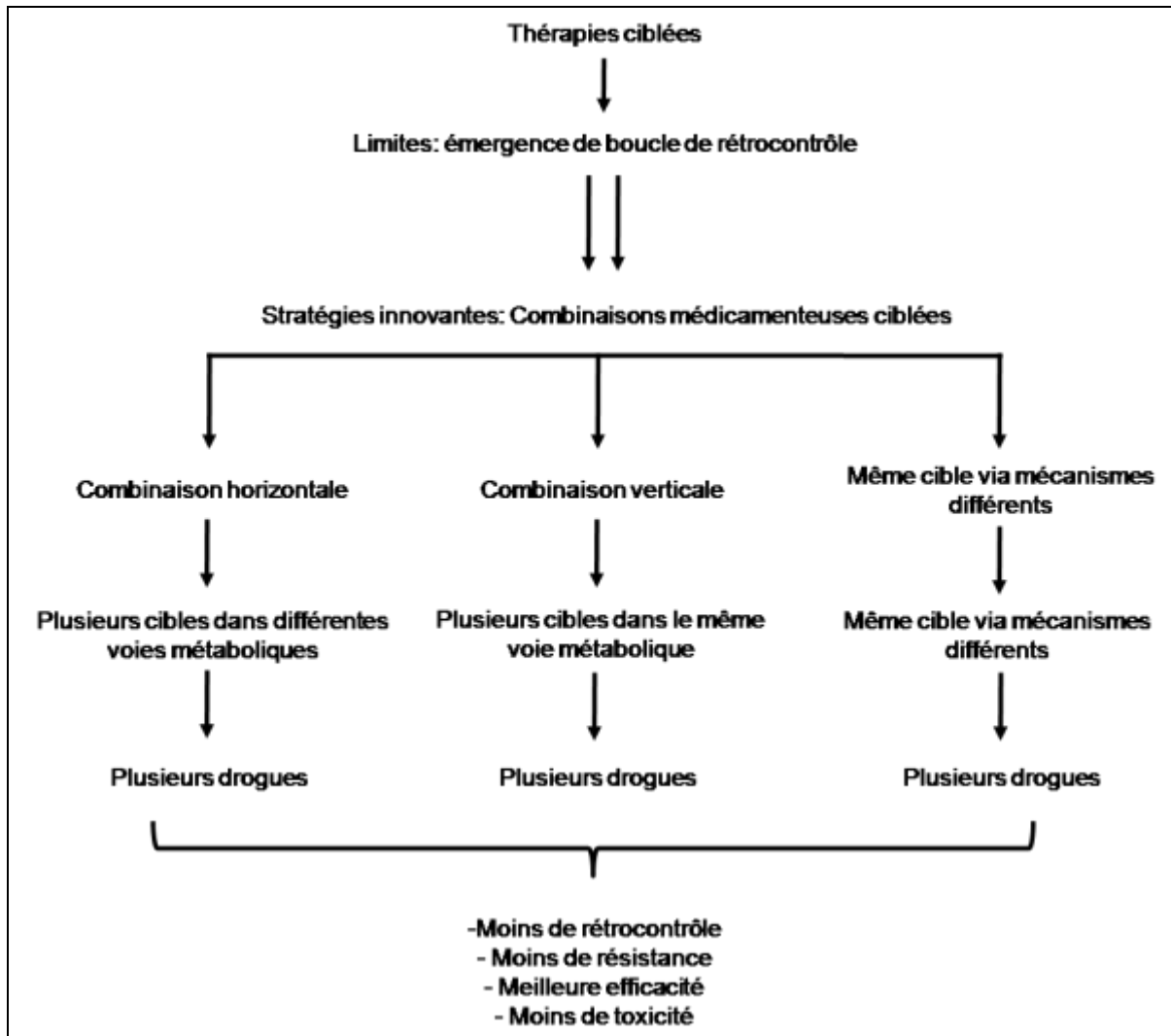


Figure 18 : Combinaisons médicamenteuses ciblées permettant de nouvelles approches thérapeutiques des cancers (adapté d'après Stegmeier et al, 2010).

III. Objectif de la thèse

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre entre deux mécanismes: la formation et la résorption osseuse. Tout déséquilibre

entre ces processus est à l'origine de pathologies qui peuvent être ostéocondensantes ou ostéolytiques, bénignes ou malignes. L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives et est très souvent associée à une ostéolyse. Les traitements actuels, qui consistent en une résection chirurgicale de la tumeur et en une polychimiothérapie ont largement contribué à la progression du taux de survie des patients. Mais la forte toxicité des molécules de chimiothérapie utilisées, souvent mal tolérées chez les jeunes patients, dont la médiane d'âge est de 18 ans, ainsi que le mauvais pronostic associé à la détection de métastases pulmonaires, font qu'il est nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques des ostéosarcomes.

Le développement d'un ostéosarcome a pour conséquence d'affecter rapidement la balance entre l'apposition et la résorption osseuse. En effet, dans la plupart des tumeurs osseuses primitives (ostéosarcome et sarcome d'Ewing), la malignité de la tumeur se caractérise le plus souvent par l'ostéolyse associée au développement tumoral. Lors de cette résorption, des facteurs de croissance piégés dans la matrice extracellulaire sont libérés. Les produits de dégradation de la matrice stimulent alors la prolifération tumorale maligne et un cercle vicieux s'établit entre la prolifération tumorale et la résorption osseuse.

Ory et al (2007) ont montré l'intérêt thérapeutique d'utiliser un bisphosphonate de troisième génération (l'acide Zolédronique) comme stratégie thérapeutique potentielle des ostéosarcomes seul ou en association avec l'ifosfamide dans un modèle murin d'ostéosarcome (Heymann et al, 2005). Cette combinaison a permis d'améliorer la réparation tissulaire et d'améliorer l'architecture osseuse. De plus, le Zol supprime l'apparition de métastases pulmonaires dans un même modèle et prolonge la survie des rats (Ory et al, 2005). Ces données ont conduit à l'introduction du Zol dans un protocole clinique (OS 2006).

Dans cette optique, nos travaux ont consisté au développement de stratégies thérapeutiques innovantes de l'ostéosarcome en combinant des molécules ciblant différentes voies métaboliques. Ces stratégies ont pour but d'améliorer l'efficacité des traitements et d'offrir des alternatives de premier choix aux échecs des chimiothérapies.

Ce travail de thèse avait donc pour objectif :

- De comprendre quels pourraient être les mécanismes de résistance mis en place par les cellules d'ostéosarcome pour contrer l'effet de l'acide Zolédronique.
- De trouver les meilleures combinaisons médicamenteuses possibles lors de stratégies combinatoires ciblées afin de potentialiser leurs effets, de réduire leurs doses et de valider ces combinaisons dans des modèles d'ostéosarcome murin reflétant la pathologie humaine en termes de survie des animaux, suivi du volume tumoral et analyse de la microarchitecture osseuse.
- Nous avons ciblé les protéines mTOR et FPPs, le Zol ayant montré une efficacité prometteuse dans les différentes études menées au laboratoire, nous avons décidé de l'associer avec un inhibiteur de mTOR, RAD001.
- Nous avons étudié les effets de deux inhibiteurs complémentaires de la HMG-CoA réductase, enzyme clé de la voie du mévalonate, à savoir l'Apomine et la Lovastatine.
- Et enfin, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de protéine à activité tyrosine kinase, l'Imatinib du fait de l'expression des protéines PDGFR a et b ainsi que d'Abl dans les cellules tumorales étudiées.

PARTIE I :

**Ostéosarcome et résistance à
l'acide Zolédronique**

I. L'acide Zolédronique, bisphosphonate de troisième génération

Les bisphosphonates (BPs) sont des agents anti-résorption osseuse utilisés dans le traitement des troubles du métabolisme phosphocalcique associés au développement tumoral (l'hypercalcémie maligne), à la maladie de Paget et à l'ostéoporose. Les bisphosphonates sont des dérivés de synthèse de type P-C-P (liaison phosphore-carbone-phosphore) absents naturellement dans l'organisme. Ce sont des analogues du pyrophosphate, acide pyrophosphorique où l'oxygène est remplacé par un carbone. Cette caractéristique (P-C-P) les rend totalement résistants aux systèmes enzymatiques, entre autres aux phosphatases des ostéoclastes et leur confère la capacité de se fixer aux ions divalents tels que le Ca^{2+} (Rogers et al, 2003). Pour cette raison, les bisphosphonates quittent rapidement la circulation sanguine pour se fixer aux sites de remodelage osseux actifs et ont permis grâce à leur tropisme avec les cristaux d'hydroxyapatite le développement de la scintigraphie osseuse et de PET-CT (Moriceau et al, 2010).

Trois générations de bisphosphonates ont été développées : la première génération (dont la structure est très proche de celle du PPI) comprend des dérivés avec un radical méthyl ou chlorure attaché à l'atome central de carbone et inhibe faiblement la résorption osseuse (étidronate, clodronate, tiludronate). Ces bisphosphonates sont métabolisés par les cellules de mammifères en analogue toxique de l'ATP (Frith et al, 1997). L'accumulation dans le cytoplasme des ostéoclastes de ce métabolite toxique inhibe la résorption osseuse en induisant l'apoptose des cellules ostéoclastiques (Frith et al, 2001), probablement en inhibant des enzymes dépendantes de l'ATP composant les pores de perméabilité mitochondriale (Lehenkari et al, 2002). La seconde qui regroupe le pamidronate, l'alendronate et l'ibandronate possède une chaîne alkyl avec un atome d'azote comme radical et leur activité anti-résorption est supérieure à ceux de première génération. Enfin la troisième génération représentée par l'acide Zolédronique (Zol) et le risédronate (figure 19) entre autres contient un radical hétérocyclique avec un ou deux atomes d'azote qui font d'eux, de puissants agents anti-résorption osseuse (Heymann et al, 2004). Ces bisphosphonates azotés (deuxième et troisième génération : N-BPs) ne sont pas métabolisés en analogue toxique de l'ATP mais agissent en inhibant une enzyme clef de la voie du mévalonate : la farnésyl diphosphate synthase (FPPs) (figure 20).

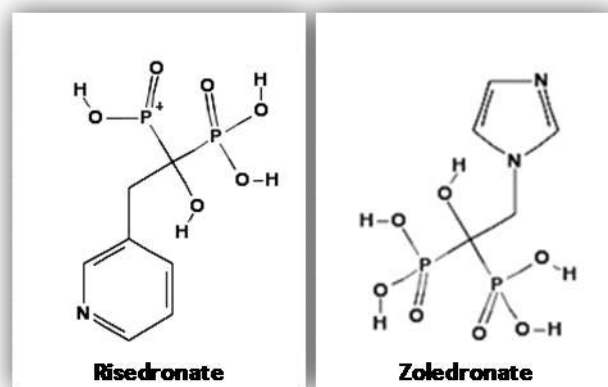


Figure 19 : **Bisphosphonates de troisième génération** : Risédronate et Zolédronate.

Des études ont montré qu'une légère modification conformationnelle de la chaîne latérale R², déjà connue pour ses effets sur le potentiel anti-résorption des ostéoclastes (Dunford et al, 2001), affecterait également l'inhibition de la FPPs (Rogers et al, 2003). Ces études suggèrent que la FPPs est la cible pharmacologique majeure des N-BPs dans les ostéoclastes et permet d'expliquer la relation entre la structure des bisphosphonates et leur potentiel anti-résorption. Récemment, grâce à la co-cristallisation de la FPPs humaine et de l'acide Zolédronique, le mécanisme par lequel les N-BPs inhibent la FPPs a été élucidé (Kavanagh et al, 2006; Rondeau et al, 2006). En effet, ces études montrent que les N-BPs interagissent avec le site de liaison au géranyl diphosphate de l'enzyme, stabilisant ainsi l'interaction de la partie nitrogène du N-BP avec un résidu thréonine lysine. Les analyses de cinétique enzymatique indiquent que les interactions des N-BPs avec la FPPs peuvent être très complexes. En effet, les N-BPs entrent directement en compétition avec le diméthylallyl diphosphate ou le GPP pour la fixation à leur site de liaison à la FPPs (Kavanagh et al, 2006). Cette compétition est suivie par des interactions encore plus complexes modifiant la conformation et la structure tertiaire de l'enzyme permettant d'expliquer le fort potentiel inhibiteur des N-BPs pour cette enzyme.

En inhibant la FPPs, les N-BPs inhibent la synthèse du farnésyl diphosphate (FPP) et du géranylgeranyl diphosphate (GGPP). Or, ces deux métabolites sont essentiels à une modification post-traductionnelle des protéines : la prénylation. La principale conséquence est l'inhibition de prénylation des petites GTPase (Lane et al, 2006). Cette inhibition a été démontrée dans les ostéoclastes aussi bien *in vitro* (Sato et al, 1990; Breuil et al, 1998) que *in vivo* (Frith et al, 2001). L'inhibition de la prénylation des petites GTPase telles que celles de

la famille de Ras, Rho et Rab inhibe leur ancrage à la membrane et par conséquent perturbe d'importantes voies de signalisation essentielles aux ostéoclastes (Coxon et al, 2003). Une autre étude fait état d'un nouveau type de mécanisme par lequel les N-BPs pourraient atteindre les ostéoclastes, toujours en agissant sur la voie du mévalonate (Monkkonen et al, 2006). En effet, l'inhibition de la FPP synthase provoque l'accumulation de son substrat, l'IPP, qui semble s'associer à l'AMP pour former un nouvel analogue de l'ATP : L'ApppI. Ce métabolite, à l'instar de celui des bisphosphonates de première génération, inhiberait l'adénine nucléotide translocase (composant les pores de perméabilité mitochondriale) et induirait la mort par apoptose des ostéoclastes. Enfin, Thompson et al (2006) ont montré que les bisphosphonates et en particulier l'alendronate entrait dans la cellule par l'intermédiaire d'une endocytose en phase liquide et requerrait une acidification endosomale.

La FPP synthase étant une enzyme hautement conservée et ubiquitaire, les N-BPs peuvent potentiellement affecter n'importe quel type cellulaire *in vitro*, dont les cellules tumorales. De nombreux effets de N-BPs ont déjà été démontrés *in vitro* sur la survie, la prolifération, l'adhérence, la migration et l'invasion des cellules tumorales (Green et al, 2004). Récemment, des données pré-cliniques et cliniques ont démontré que les N-BPs possédaient une activité anti-tumorale dans les métastases osseuses (Duivenvoorden et al, 2007), dans les carcinomes prostatiques (Bruder et al, 2006) et rénaux (Pandha et al, 2006), dans l'ostéosarcome (Evdokiou et al, 2003 ; Heymann et al, 2004 ; Ory et al, 2007) et dans le chondrosarcome (Gouin et al, 2006). De plus, des données pré-cliniques démontrent l'intérêt thérapeutique d'associer un N-BPs à un agent de chimiothérapie conventionnel en terme de survie, de réparation des tissus et de progression tumorale (Heymann et al, 2005 ; Duivenvoorden et al, 2007). Les N-BPs peuvent donc être considérés comme des agents bi-fonctionnels possédant une activité anti-résorption et anti-tumorale.

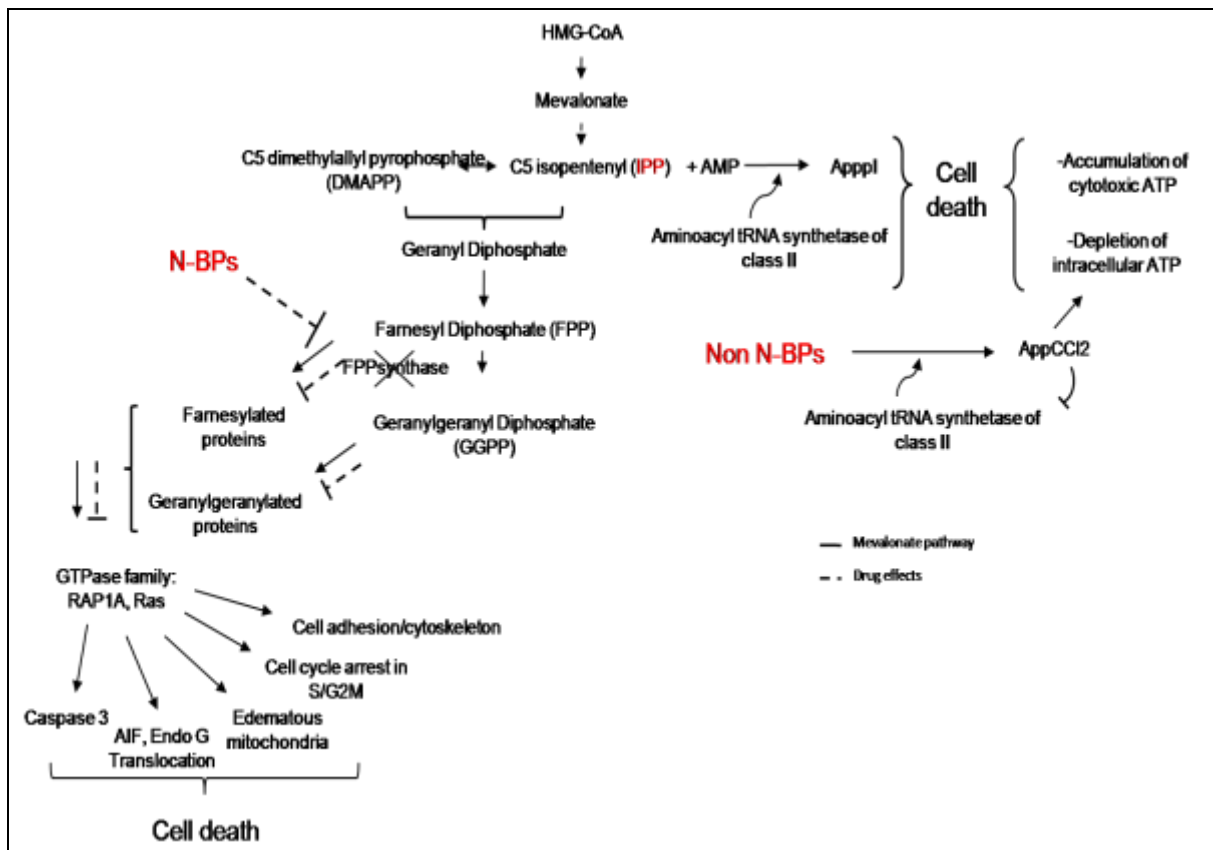


Figure 20 : Effet des Bisphosphonates azotés ou non sur leurs voies métaboliques. Les bisphosphonates azotés (N-BPs) inhibent la FPPs (enzyme clé de la voie du mévalonate) et induisent la non prénylation de petites GTPases telles que Ras ou RAP1A. Les bisphosphonates non azotés (Non N-BPs) sont convertis en dérivés cytotoxique de l'ATP (AppCC12) et induisent une déplétion intracellulaire d'ATP et une accumulation d'ATP cytotoxique (Moriceau et al, 2010).

Article 1

« Implication de la Farnesyl Diphosphate synthase dans les mécanismes de résistance à l'acide Zolédronique dans les cellules d'ostéosarcome »

[J Cell Mol Med.](#) 2008 Jun;12(3):928-41.

FARNESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE IS INVOLVED IN THE RESISTANCE TO ZOLEDRONIC ACID OF OSTEOSARCOMA CELLS.

[Ory B](#), [Moriceau G](#), [Trichet V](#), [Blanchard F](#), [Berreur M](#), [Rédini F](#), [Rogers M](#), [Heymann D](#).

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, ERI 7, Nantes, France.

Ory et al (Ory B et al, 2007) ont récemment démontré un effet anti tumoral de l'acide Zoledronique (Zol) *in vitro* sur diverses lignées d'ostéosarcomes indépendamment de leur statut p53 et Rb. Le Zol inhibe la prolifération cellulaire, la migration, perturbe l'organisation du cytosquelette et induit l'apoptose de ces cellules indépendamment de l'activité des caspases. De plus, le Zol stimule les cellules T gammadelta qui joue un rôle important dans la réponse immunitaire innée contre les cellules cancéreuses (Yuasa et al, 2007).

Cette étude a consisté à rechercher le développement de mécanismes de résistance au Zol après un traitement prolongé des ostéosarcomes.

En effet un traitement de 1µM de Zol pendant 4 à 8 semaines réduit significativement la sensibilité des cellules d'ostéosarcomes aux fortes concentrations de Zol (10 à 100µM) aussi bien en termes d'inhibition de prolifération, d'effet sur le cycle cellulaire que d'effet sur la migration. Des tests de prolifération (XTT) nous ont permis de montrer d'une part que les cellules résistantes au Zol étaient toujours sensibles aux agents conventionnels tels que le méthotrexate, le mafosfamide et la doxorubicine et d'autre part que le processus de résistance n'était pas associé avec un phénotype de type multidrug resistance (MDR). De plus, des expériences complémentaires réalisées en présence de clodronate et de pamidronate indiquent que ce phénomène de résistance est restreint à la famille de bisphosphonates contenant un atome d'azote (N-BPs).

Au vue de ces résultats, notre étude s'est portée sur l'implication de la Farnesyl Diphosphate Synthase (FPPs), enzyme clef de la voie d'action des N-BPs. Une relation entre le niveau de transcription de la FPPs, son activité enzymatique et le niveau de résistance a pu être établie. Pour démontrer l'implication de la FPPs dans les mécanismes de résistance au Zol, des cellules résistantes ont été transfectées avec des siRNA FPPs, ce qui accroît fortement la sensibilité de ces cellules au Zol. L'origine innée ou acquise de cette résistance a été étudiée d'une part par clonage de la lignée cellulaire OSRGA et d'autre part par traitement avec de très faibles concentrations de Zol. Il s'avère que les cellules d'ostéosarcomes présentent à la fois une hétérogénéité pour l'expression de la FPPs corrélée au niveau de sensibilité au Zol, et une propension à la surexpression de la FPPs en réponse à un traitement de Zol à faible dose également corrélée au niveau de sensibilité au Zol .

Cette étude confirme le potentiel thérapeutique du Zol dans le traitement des tumeurs osseuses et révèle que la durée du traitement ainsi que la concentration employée sont des facteurs importants à prendre en compte afin d'éviter le développement de résistance métabolique.

Farnesyl diphosphate synthase is involved in the resistance to zoledronic acid of osteosarcoma cells

**B. Ory^{a, b}, G. Moriceau^{a, b}, V. Trichet^{a, b}, F. Blanchard^{a, b}, M. Berreur^{a, b},
F. Rédini^{a, b}, M. Rogers^c, D. Heymann^{a, b, d, *}**

^a *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, ERI 7, Nantes, France*

^b *Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Nantes, France*

^c *Bone & Musculoskeletal Research Program, Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, UK*

^d *Hospital, Nantes, France*

Received: July 17, 2007; Accepted: October 12, 2007

Abstract

We recently demonstrated original anti-tumor effects of zoledronic acid (Zol) on osteosarcoma cell lines independently of their p53 and Rb status. The present study investigated the potential Zol-resistance acquired by osteosarcoma cells after prolonged treatment. After 12 weeks of culture in the presence of 1 μM Zol, the effects of high doses of Zol (10–100 μM) were compared between the untreated rat (OSRGA, ROS) and human (MG63, SAOS2) osteosarcoma cells and Zol-pretreated cells in terms of cell proliferation, cell cycle analysis, migration assay and cytoskeleton organization. Long-term treatment with 1 μM Zol reduced the sensitivity of osteosarcoma cells to high concentrations of Zol. Furthermore, the Zol-resistant cells were sensitive to conventional anti-cancer agents demonstrating that this resistance process is independent of the multidrug resistance phenotype. However, as similar experiments performed in the presence of clodronate and pamidronate evidenced that this drug resistance was restricted to the nitrogen-containing bisphosphonates, we then hypothesized that this resistance could be associated with a differential expression of farnesyl diphosphate synthase (FPPS) also observed in human osteosarcoma samples. The transfection of Zol-resistant cells with FPPS siRNA strongly increased their sensitivity to Zol. This study demonstrates for the first time the induction of metabolic resistance after prolonged Zol treatment of osteosarcoma cells confirming the therapeutic potential of Zol for the treatment of bone malignant pathologies, but points out the importance of the treatment regimen may be important in terms of duration and dose to avoid the development of drug metabolic resistance.

Key words: osteosarcoma • bisphosphonate • zoledronic acid • metabolic resistance • farnesyl diphosphate synthase

Introduction

Osteosarcoma is the most frequent malignant primary bone tumor that develops mainly in the young,

the median age of diagnosis being 18 years [1]. Despite recent improvements in chemotherapy and surgery, the problem of non-response to chemotherapy remains. Thus, current strategies for the treatment of high-grade osteosarcoma fail to improve its prognosis [2, 3], mainly because of chemotherapy resistance. This poor prognosis of osteosarcoma warrants new therapeutic strategies to improve the overall rate of survival.

Bisphosphonates (BPs) are stable synthetic analogues deriving from endogenous pyrophosphate

*Correspondence to: DOMINIQUE HEYMANN, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822 - INSERM ERI 7, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France.
Tel.: 33 240 412 845
Fax: 33 240 412 860
E-mail: dominique.heyman@univ-nantes.fr

(PPi) [4]. Various side chains can be added to the central carbon atom, thus producing a range of BPs with differential clinical activity and potency [5]. The most common therapeutic application of BPs is osteoporosis, and their use has been extended to the treatment of malignant osteolysis and hypercalcemia. Two groups of BPs can be identified including non-nitrogen-containing and nitrogen-containing BPs. The BPs that lack a nitrogen atom, closely related to PPi (such as clodronate, etidronate and tiludronate) are metabolized intracellularly to cytotoxic analogues of ATP and decrease osteoclast survival [5]. In contrast, nitrogen-containing BPs (such as pamidronate, alendronate, risedronate, ibandronate and zoledronate) induce apoptosis of osteoclasts by inhibiting enzymes of the mevalonate pathway, especially farnesyl diphosphate synthase (FPPS) [6, 7]. FPPS prevents the biosynthesis of cholesterol and isoprenoid lipids (FPP and geranylgeraniol diphosphate) which are required for the prenylation of small GTPases (*i.e.* Ras, Rho and Rac), a biochemical reaction essential for the anchorage of small GTPases to cell membranes and to protein-protein interactions [8]. In addition to their powerful anti-bone resorption effects, recent *in vitro* studies evidenced a direct anti-tumor activity exerted by zoledronic acid (Zol) on several cancer cells (myeloma, carcinoma and sarcoma) [9, 10]. Preclinical data confirmed the Zol anti-tumor activity in experimental models of bone tumors. Among these studies, we reported recently the enhancement of tumor regression and tissue repair when Zol is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma [11] and that Zol suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice [12]. Furthermore, recent clinical trials in patients suffering from malignant bone diseases demonstrated that Zol was safe and well tolerated at the approved dose of 4 mg *i.v.* every 3–4 weeks [4]. Because the main difficulty encountered in treating cancer relates to mutations carried by many tumor cells in key genes such as p53, Rb or proteins affecting caspase signalling, we demonstrated selective and original anti-tumor effects of Zol on several osteosarcoma cell lines independently of their p53 and Rb status [13]. Indeed, Zol inhibited osteosarcoma cell proliferation through a cell cycle arrest in S and G2/M phases and induced atypical apoptosis independent of caspase activation, characterized by the translocation of Apoptosis Inducing Factor and Endonuclease-G [13].

These data now allow to consider these molecules as potential therapeutic agents in clinical trials of tumor bone pathologies independently of the p53 and Rb status of the tumor.

The optimization and increase in specificity of cancer treatments has improved their efficacy and reduced the associated adverse effects, but unfortunately has not yet resulted in a cure for the majority of patients. Studies of the mechanisms by which tumor cells escape treatment is essential to circumvent drug resistance in cancer cells and to design new therapeutic protocols that are not subject to these drug-resistances [14]. Two types of resistance mechanism have been identified [15]. The first one results in resistance restricted to a specific drug or limited to a small number of related drugs, which can be bypassed by modification of the chemotherapeutic agent. The second mechanism conferring multidrug resistance to many unrelated drugs, is called multidrug resistance (MDR) and is responsible for many failures of cancer treatment [16]. The most common mechanisms responsible for the various forms of resistance are the overexpression of efflux pumps, inhibition of apoptosis, increased repair of DNA damage, mutations in key cell cycle checkpoint genes and increased or altered drug targets [14]. Similar to non-osseous malignancies, osteosarcomas frequently exhibit a MDR phenotype explaining why patient survival has not improved since the mid-1980s despite advances in anticancer therapies. Because Zol represents a potential novel anti-neoplastic agent for the therapy of osteosarcoma, the present study investigated the potential development of innate and/or acquired resistance to Zol and the molecular mechanisms involved in this phenomenon.

Material and methods

Patients

This study included seven patients (three females aged 41–93 years, four males aged 16–79 years) that were referred to our institution for the treatment of osteosarcoma. All cases were diagnosed as osteogenic osteosarcoma based on histological samples obtained by open biopsies. The experimental procedures followed in the present study were in accordance with the ethical standards of the responsible institutional committee on human experimentation and

with Helsinki Declaration of 1975, revised in 1983. The study was approved by the institutional ethic committee.

Cells, culture conditions and establishment of Zol-resistant cell lines

The rat osteosarcoma OSRGA cell line was initially established from a radio-induced osteosarcoma [17, 18]. The rat ROS17/2.8 cell line was kindly provided by Prof. H.J. Donahue (Penn State University, USA), and the human MG63 and SAOS2 cell lines were purchased from ATCC (USA). These cell lines were cultured in DMEM (BioWhittaker, Belgium) supplemented with 5% Fetal Calf Serum (Hyclone, France) and 2 mM L-glutamine (BioWhittaker). Rat and human osteosarcoma cell lines resistant to Zol (MG53res, SAOS2res, ROSres, OSRGAres) were established by 3 months of continuous treatment with 1 μ M Zol.

Cell growth and viability

Cell growth and viability were determined by a cell proliferation reagent assay kit using sodium 3'[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate (XTT) (Roche Molecular Biomedicals, Germany). Two thousand cells/well were plated into 96-well plates and cultured for 72 hrs in culture medium in the presence or the absence of 10^{-12} – 10^{-4} M Zol. Zol was provided by Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) as the disodium hydrate form. In another set of experiments, cells were treated for 72 hrs in the presence or the absence of 10^{-9} – 10^{-6} M methotrexate (Sigma, France), doxorubicine (Sigma) and 1–50 μ g/ml mafosfamide (Baxter, France), 10–1000 μ M clodronate (Sigma), 1–500 μ M pamidronate (Sigma) and 5 μ M verapamil (Sigma). After the culture period, XTT reagent was added to each well and incubated for 5 hrs at 37°C, the corresponding absorbance was then determined at 490 nm. Cell viability was also assessed by trypan blue exclusion and live and dead cells were scored manually. Cell death was also monitored microscopically after Hoechst n°33258 staining (Sigma). In this experiment, cells were seeded at 10^4 cells/well in a 24-well plate and treated or not with 10 μ M Zol for 48 hrs or 100 nm staurosporine (Sigma) for 16 hrs, stained by 10 μ g/ml Hoechst reagent for 30 min at 37°C and then observed under UV microscopy (DMRXA, Leica, Germany). Statistical evaluation of the data was performed using the ANOVA test.

Western blot analysis

Zol-treated cells were lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 5% Tris pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% Na deoxycholate, 1 mM

Na_3VO_4 , 0.5 mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin). Protein concentration was determined by the BCA kit (Pierce Chemical, USA). A total of 50 μ g of total cell lysate protein were run on SDS-PAGE, electrophoretically transferred to Immobilon-P membrane (Millipore, MA, USA). The membrane was blotted with antibodies anti-p-Rb (Ser 807/811), -p-cdc2 (tyr15), -actin (Cell Signaling Technologies, USA), -p21^{WAF1} (BD Biosciences, USA) and the unprenylated form of Rap1A (Santa Cruz, USA) to indirectly quantified FPPS enzymatic activity, in PBS, 0.05% Tween 20 and 3% bovine serum albumin (BSA). The membrane was washed and probed with the secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. Antibody binding was then visualized with the enhanced chemoluminescence system (ECL Kit; Roche Molecular Biomedicals). The band densities were measured using the GeneTools computer software program (SynGene).

Caspase -1, -3 and -8 activities

Caspase -1, -3 and -8 activities were assessed on 10 μ l of total Zol-treated or not cell lysates using the kit CaspACETM Assay System, 'Fluorometric' (Promega, USA) following the manufacturer's recommendations. Cells treated with UV light for 30 sec 24 hrs before harvesting were used as a positive control. Results were expressed in arbitrary units referred to the total protein content.

Cell cycle analysis

OSRGA, MG63 and SAOS2 cells were incubated in the absence or the presence of 10 μ M Zol for 48 hrs, trypsinized, washed twice and incubated in PBS containing 0.12% Triton X-100, 0.12 mM EDTA and 100 μ g/ml ribonuclease A. Then 50 μ g/ml propidium iodide were added to each sample for 20 min at 4°C. Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry (FAC Scan), based on 2N and 4N DNA content.

Time-lapse microscopy and confocal microscopic analysis

For time-lapse experiments, cells were seeded at 5×10^4 cells/well and cultured in 6-multiwell plates in the absence or the presence of 10 μ M Zol. Phase-contrast photographs (Leica) were taken every 10 min during 60 hrs and edited using the MetamorphTM software. Cell divisions and apoptotic cells were then manually scored. To study cell migration, cells plated in 6-well plates and cultured until confluence were treated or not with 10 μ M Zol for 24 hrs before a slit was made in the cell monolayer. Actin filament detection

was performed after cell treatment with or without 10 μm Zol fixed in 4% paraformaldehyde and stained with FITC-conjugated phalloidin (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma). Cover glasses were fitted with the Long Pro Kit (Molecular probes). Images were collected on a Leica TCS-SP1 confocal microscope with 63/1.4x oil immersion lens. The digital images were visualized with a 24-bit imaging system including Leica's TCS-NT software and projections were generated from z-stacks.

siRNA gene silencer

The FPPS gene expression was knocked down using specific human and rat FPPS siRNA (Ambion, France) and the INTERFERinTM transfection reagent (Polyplus transfection, France). Cells were seeded at 40% confluency in a 24-well plate 1 day before transfection. In each well 10 nm siRNA duplexes diluted in serum-free medium were incubated with 2 μl of INTERFERinTM for 30 min at room temperature. Then, 100 μl mixture per well were added onto the cells and incubated at 37°C. The 72 hrs-Zol treatment started 24 hrs after siRNA transfection. For each condition tested, a negative siRNA control was used (Santa Cruz biotechnology, Germany). Additional experiments were performed in the presence of geranylgeraniol (GGO) (Sigma, France).

RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from cultured OSRGA, MG63 and SAOS2 cells using the TRIzol reagent (Invitrogen, France). First, RNA was reversed-transcribed (RT), using 400 U MMLV-RT from Invitrogen, then 2 μl of the RT reaction mixture were subjected to PCR using upstream and downstream primers to determine the expression of rat and human FPPS [Human FPPS sense: AGATCTGTGGGGGTCTTCCT, anti sense: TCCCGAATGCTACTACCAC; Rat FPPS sense: AGTACAATCGGGTCTGACG, anti sense: CGCGATAGGCAGGTAGAAAG] and 0.25 μl of 5 U/ μl Taq polymerase (Eurobio, France). After the number of PCR cycles was increased, a plot was done for each sample, the cycle values corresponding to the linear part of the amplification curve were then determined (28 cycles, $T_m = 58^\circ\text{C}$) and used to quantify the message *versus* the 18S signal determined in the same way. The PCR products were electrophoresed in 1% agarose gel-containing ethidium bromide. The band densities were measured using the GeneTools computer software program. Three independent experiments were performed for each gene and a representative experiment is shown in the Results section.

Results

Osteosarcoma cell lines develop Zol-resistance after long-term continuous treatment with low-dose Zol

Consistent with previous results [11, 12, 19], Zol treatment of Zol-sensitive rat ROS, OSRGA (Fig. 1A) and human MG63, SAOS2 (Fig. 1B) osteosarcoma cells strongly reduced their proliferation and induced the cell death without any caspase 1, 3 or 8 activation (data not shown). Thus, 0.1–100 μM Zol decreased the viable cell number in a dose-dependent manner (IC₅₀: 1–8 μM) as revealed by the XTT assay. After 3 month continuous treatment with 1 μM Zol, rat and human osteosarcoma cells became less sensitive to Zol and resistant cell lines (OSRGAres, ROSres, MG63res, SAOS2res) were then progressively established (Fig. 1A). Indeed, the potency of Zol to affect cell proliferation was strongly reduced on human resistant cell lines and Zol was ineffective on rat resistant cell lines (Fig. 1A).

The influence of this resistance process was also assessed on the other known activities of Zol on tumor cells [cell cycle (Fig. 1B), DNA checkpoints (Fig. 1B), cytoskeleton (Fig. 1C), cell migration (Fig. 1C) [13]]. Cell cycle analysis was performed after 48 hrs of 10 μM Zol-treatment. The results obtained confirmed that 48 hrs of Zol-treatment induced a strong cell cycle arrest in S and G₂/M phases in Zol-sensitive OSRGA cells (Fig. 1B, [13]) and showed that Zol-treatment did not modulate the cell cycle in OSRGAres cells (Fig. 1B). Indeed, the number of cells in S, G₂/M phases strongly increased from 35% to 53% for OSRGA cells in the presence of 10 μM Zol concomitantly with a decrease of cells in G₀/G₁ phase: 42% *versus* 64% (Fig. 1B). A similar phenomenon was observed in human osteosarcoma cell lines (data not shown). We therefore investigated by western blot whether the DNA checkpoint proteins were involved in the cell cycle blockade observed in the presence of Zol. Thus, the treatment of sensitive OSRGA cells by 10 μM Zol increased the inactive form of cdc2 (p-cdc2, Tyr15) after 72 hrs of treatment. Simultaneously, Zol strongly reduced p21 expression and transiently upregulated Rb phosphorylation (Ser 807 and 811) after 24 hrs of Zol treatment (Fig. 1B). No modulation of p-cdc2, Rb and p21 was observed

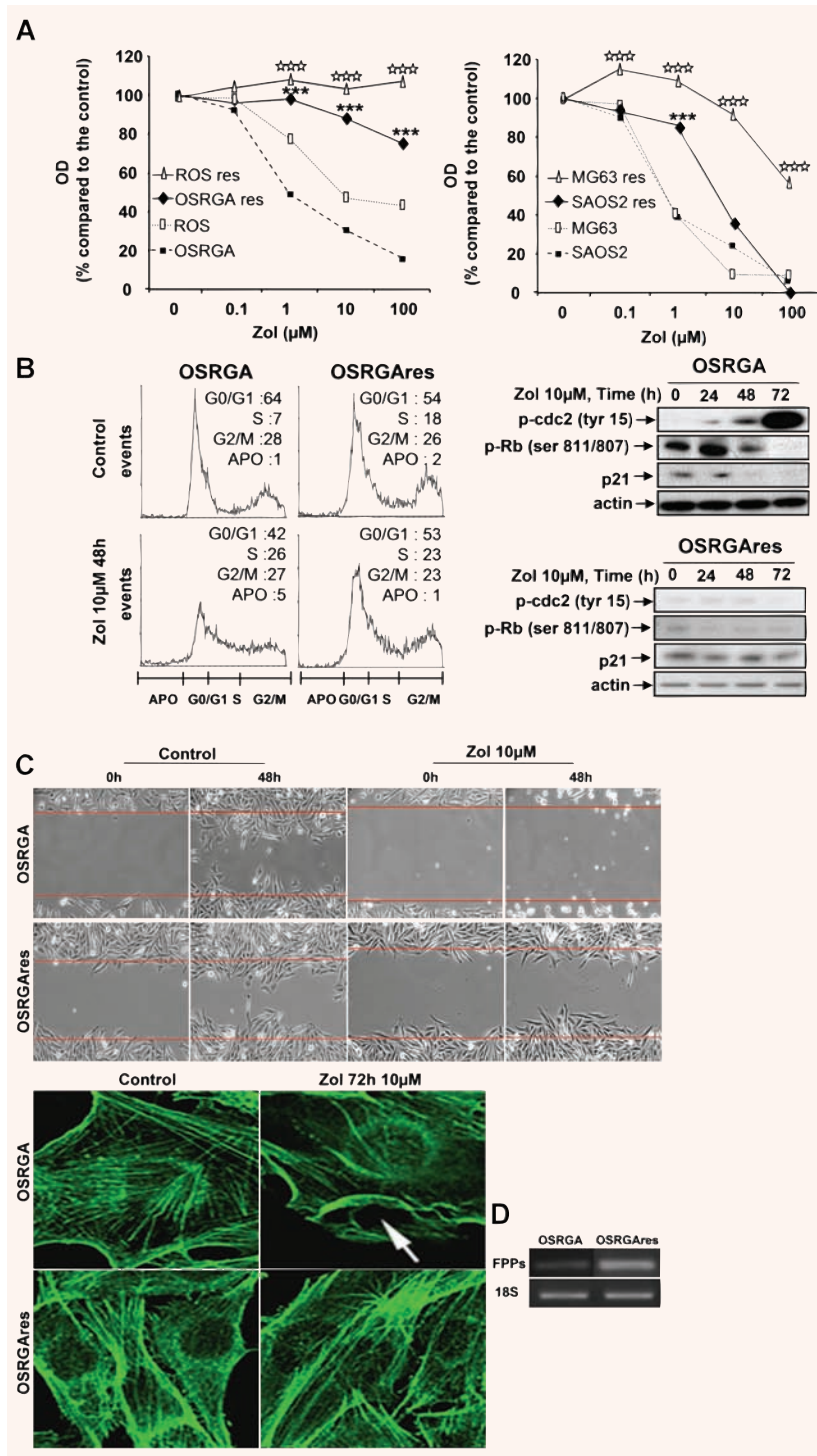


Fig. 1 Osteosarcoma cell lines develop Zol-resistance after long-term of continuous treatment with low doses of Zol. **(A)** rat (OSRGA, ROS) and human (MG63, SAOS2) sensitive and resistant (corresponding cell Name-res) osteosarcoma cell lines were treated with increasing concentrations of Zol (0.1–100 μ M) for 72 hrs. The number of viable cells was then measured using the XTT assay. Graphs represent the mean values of three independent experiments performed in triplicate. *** $P < 0.001$. Statistical evaluation of the data was performed using the ANOVA test. **(B)** Cell cycle distribution of OSRGA and OSRGAres, treated or not with 10 μ M Zol for 48 hrs was analyzed by propidium iodide staining and FACS analysis. G1/S and G2/M DNA checkpoints were analyzed by western blot and compared between sensitive and resistant OSRGA osteosarcoma cell lines in the presence or absence of 10 μ M Zol for 24, 48 and 72 hrs. All experiments were repeated three times and a representative blot is shown. **(C)** Zol effects on organization of actin stress fibres were observed by confocal microscopy after phalloïdine staining. The actin network reorganization was associated with membrane ruffling (white arrow) in Zol-sensitive OSRGA cell line (Original magnification: $\times 1000$). Zol effects on cell migration were also analyzed by time-lapse microscopy. The horizontal bars represent the limit of the slit cut performed on the cell monolayer at the start of the experiment (Original magnification: $\times 100$). **(D)** Farnesyl diphosphate synthase (FPPs) transcription level was determined by semi quantitative RT-PCR in OSRGA sensitive and resistant cell lines. The 18S was used as a control.

in OSRGAres cells regardless of the duration of Zol treatment (Fig. 1B).

As Zol has been shown to disturb cytoskeletal organization and to inhibit cell migration [13], we wondered

whether Zol could alter such parameters in OSRGAres cells. Confocal microscopy revealed a major disorganization of the actin stress fibres associated with membrane ruffling in sensitive OSRGA cells treated with

10 μm Zol for 72 hrs, this was never observed in OSRGARes cells (Fig. 1C). Moreover, as shown by the time-lapse assay, 10 μm Zol totally blocked the migration of sensitive OSRGA cells but was not able to abolish migration of OSRGARes cells (Fig. 1C).

The molecular mechanism involved in the reduced-Zol sensitivity is not associated with a multidrug resistance (MDR) phenotype and is restricted to the nitrogen-containing bisphosphonates

The potential role of the MDR phenotype in the Zol resistance phenomenon was assessed by XTT assays. The MDR phenotype is conventionally defined as the resistance of cells to conventional chemotherapeutic agents such as mafosfamide, methotrexate and doxorubicin [20, 21]. The XTT assays revealed that OSRGARes cells were still always sensitive to increasing doses of mafosfamide, methotrexate and doxorubicin (Fig. 2). Furthermore, 5 μm verapamil, a P-gp pump inhibitor [22] was not able to abolish the Zol resistance (Fig. 2). Overall, these data demonstrate that the Zol resistance was not associated with MDR phenotype. In addition, similar experiments performed in the presence of clodronate, a non-nitrogen containing-BP [4], revealed that OSRGARes are as sensitive to clodronate as they are to lower concentrations of Zol (Fig. 2). When, osteosarcoma cells were treated with another nitrogen-containing BP, pamidronate that also targets FPPS, it significantly reduced Zol-sensitive OSRGA proliferation in contrast to OSRGARes cells, which are also resistant to pamidronate (Fig. 2). Similar results have been obtained with the osteosarcoma cell lines MG63 and SAOS2 (data not shown). These experiments demonstrated that the Zol-resistance phenomenon in osteosarcoma cells appears to be MDR-independent and is apparently restricted to nitrogen-containing BPs.

Farnesyl diphosphate synthase (FPPS) is implicated in the Zol-resistance mechanism of osteosarcoma cell lines

FPPS being the main molecular target of nitrogen containing BPs [23], the FPPS transcript expression

was analyzed by RT-PCR and compared in sensitive OSRGA and OSRGARes cells (Fig. 1D). Thus, the Zol-resistant cells expressed a higher level of FPPS mRNA than the sensitive cells. To further determine the involvement of FPPS in the Zol-resistance mechanism of human and rat osteosarcoma cells, the effect of Zol on OSRGA, OSRGARes, MG63 and SAOS2 was analyzed after transfection with FPPS siRNA. Semi-quantitative RT-PCR analysis was used to evaluate the efficacy of FPPS siRNA on FPPS mRNA expression. In all experiments, FPPS mRNA levels were significantly decreased in FPPS siRNA-transfected cell lines compared to the siRNA control (Fig. 3A). Inhibition of FPPS activity was then assessed indirectly by the expression of the unprenylated form of the small GTPase Rap1A (unRAP1A) that is expressed after inhibition of FPPS [24, 25] (Fig. 3B). The transfection of Zol-sensitive cells with FPPS siRNA strongly increased their sensitivity to Zol in all osteosarcoma cell lines studied. Indeed, FPPS siRNA transfection modified the unRAP1A expression kinetic in OSRGA, MG63 and SAOS2 cells. In the presence of FPPS siRNA, unRAP1A expression was strongly induced by 1 μm Zol treatment for 24 hrs whereas its expression was only observed with 10 μm Zol treatment for 48 hrs in control siRNA transfected cells (Fig. 3B). In OSRGARes cells, a very weak expression of unRAP1A was observed after Zol treatment. Interestingly, FPPS siRNA re-induced the sensitivity to Zol treatment in these resistant cells to a level comparable to parental OSRGA cells transfected with FPPS siRNA. Thus, the unRAP1A expression was observed after 24 hrs treatment with 1 μm Zol in FPPS siRNA-OSRGARes transfected (Fig. 3B). Similarly, microscopic observations confirmed the FPPS siRNA effects on the sensitization of osteosarcoma cells to Zol treatment (Fig. 3C). Thus, an increase of floating cell number associated with an inhibition of cell proliferation was observed after transfection of all osteosarcoma cell lines with FPPS siRNA (Fig. 3C).

XTT analyses were performed to determine the impact of FPPS siRNA on Zol activity (Fig. 3D). Transfection with FPPS siRNA significantly increased the sensitivity to Zol treatment of all osteosarcoma cell lines analyzed (Fig. 3D). The sensitivity to 10 μm Zol was up-modulated by 22%, 31%, 53% and 42% in OSRGA, OSRGARes MG63 and SAOS2, respectively, in the presence of FPPS siRNA compared to the control siRNA (Fig. 3D). Furthermore, the efficacy of FPPS siRNA occurred for

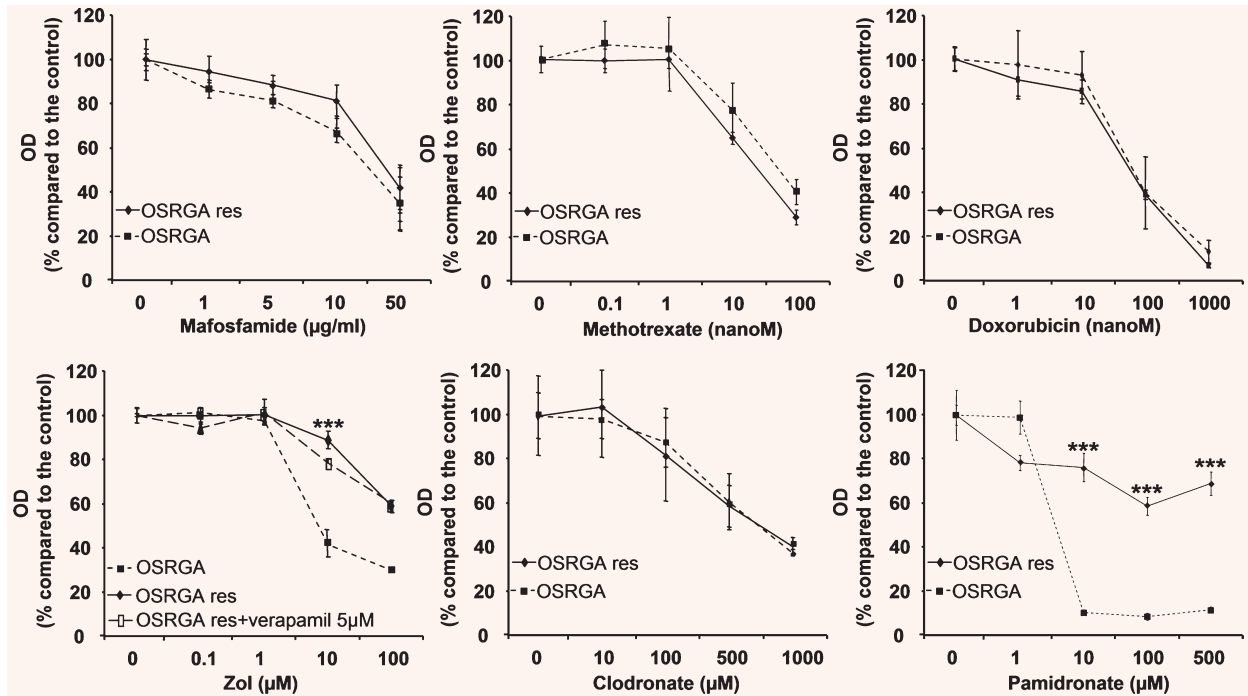


Fig. 2 The molecular mechanism involved in the reduced-Zol sensitivity is not associated with a multidrug resistance (MDR) phenotype and is restricted to the nitrogen-containing bisphosphonates. OSRGA and OSRGAres sensitivity to conventional anti-cancer agents mafosfamide, methotrexate, doxorubicin and sensitivity to Zol in the presence or absence of a P-gp pump inhibitor (5 µM verapamil) was analyzed by the XTT assay. Similar experiments were performed in the presence of clodronate and pamidronate. Graphs represent the mean values of three independent experiments performed in triplicate. Error bars represent the standard deviation. *** $P < 0.001$. Statistical evaluation of the data was performed using the ANOVA test.

lower doses of Zol in OSRGAres compared to OSRGA cells (respectively 22% and 1% increase of sensitivity in the presence of 0.1 µM Zol) (Fig. 3D).

siRNA FPPS increases the Zol-induced blockade of the cell cycle in S, G2/M phases in osteosarcoma cell lines

We previously demonstrated that Zol induces osteosarcoma cell cycle arrest in S, G2/M phases in OSRGA sensitive cells [13]. To determine whether FPPS siRNA could modulate this sensitivity, the cell cycle of FPPS siRNA-transfected osteosarcoma cells was analyzed by flow cytometry. Figure 4 reveals that FPPS siRNA accentuates the Zol-induced effects observed on cell-cycle distribution, leading to a significant increase of cells blocked in S phase compared to the control siRNA. Indeed, the number of cells in S

phase increased from 26% to 30% for OSRGA, from 20% to 26% for MG63, from 34% to 46% for SAOS2 and from 23% to 38% for OSRGAres cells in the presence of FPPS siRNA compared to the control siRNA after 48 hrs of treatment with 10 µM Zol (Fig. 4). Furthermore, these observations were concomitant with a significant reduction of the cell number in G₀/G₁ phase: 35% versus 42% for OSRGA, 61% versus 69% for MG63, 36% versus 57% for SAOS2 and 41% versus 53% for OSRGAres.

Geranyl geraniol (GGO) reversed the FPPS siRNA effects in osteosarcoma cell lines

To determine whether the effects previously demonstrated for the FPPS siRNA in osteosarcoma cells are reversible, FPPS siRNA transfected cells treated with

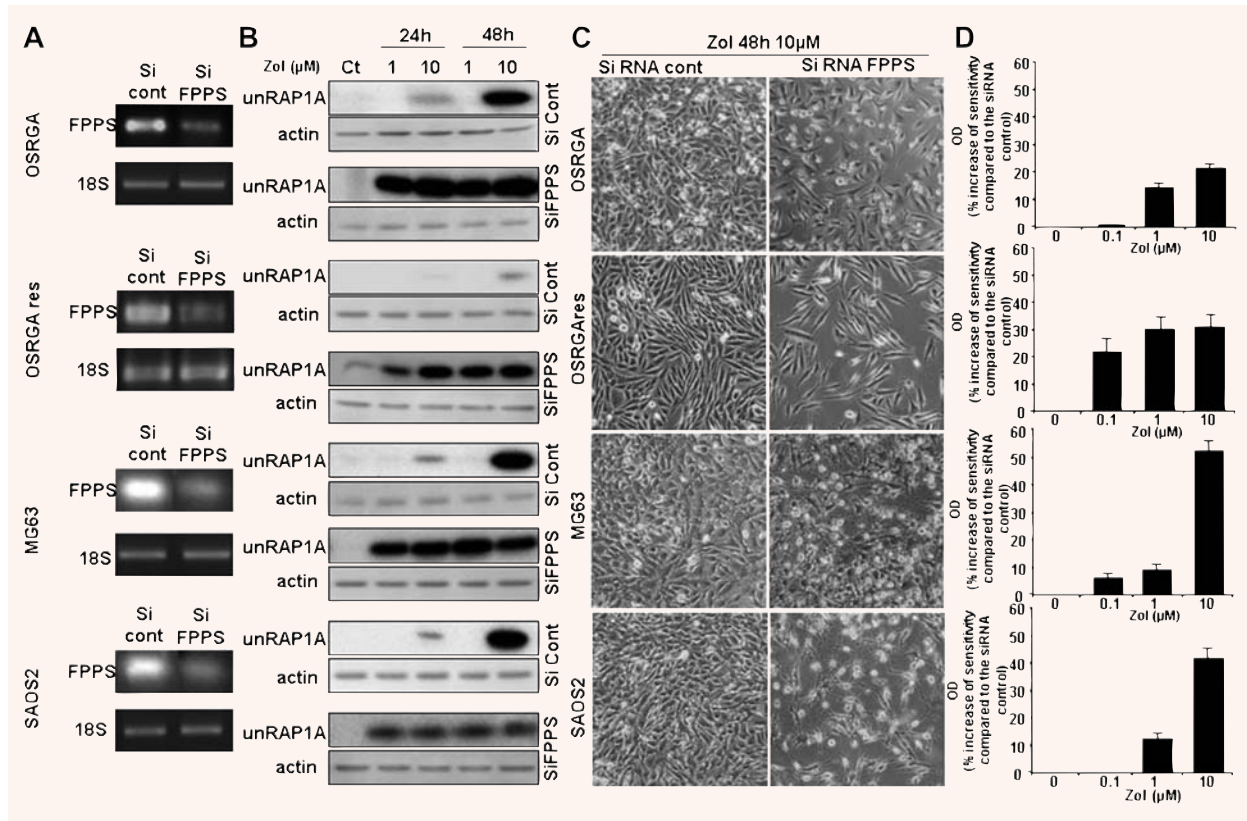


Fig. 3 Involvement of farnesyl diphosphate synthase (FPPS) in the Zol-induced resistance mechanism in osteosarcoma. **(A)** Farnesyl diphosphate synthase (FPPS) transcription level was determined by semi quantitative RT-PCR in FPPS siRNA transfected cell lines compared to the siRNA control cells. The 18S was used as a control. **(B)** Western blot analysis of unpreylated RAP1A (unRAP1A) from OSRGA cell lines transfected with FPPS siRNA and control siRNA, treated 24 and 48 hrs with 1 and 10 μm Zol. All experiments were repeated three times, and a representative blot is shown. **(C)** Photomicrographs of FPPS siRNA transfected cells after 48 hrs with 10 μm Zol compared to control siRNA. Original magnification: ×100. **(D)** Rat (OSRGA, OSRGAres) and human (MG63, SAOS2) osteosarcoma cell lines were transfected with FPPS siRNA and treated after 24 hrs of culture by increasing concentrations of Zol (0.1–10 μm) for 72 hrs. The number of viable cells was then determined using the XTT assay. Histograms represent the percentage of the increased sensitivity to Zol in the presence of FPPS siRNA compared to control siRNA. Values are mean of three independent experiments performed in triplicate. Error bars represent the standard deviation.

increasing doses of Zol were cultured in the presence of 25 μm geranylgeraniol, the FPPS metabolic product (Fig. 5). GGO protected rat and human osteosarcoma cell lines from the effects of Zol in the FPPS siRNA-transfected cells and totally reversed FPPS siRNA effects (Fig. 5A). We therefore investigated by western blot the expression kinetic of unRAP1A in the presence of 25 μm GGO in FPPS siRNA-transfected cells (Fig. 5B). GGO totally abolished unRAP1A expression similar to what had been observed in Zol-resistant cell lines (Fig. 3B). Overall, these data then strengthen our conclusion that FPPS is involved in the Zol-resistance mechanism.

Dual origin of Zol resistance: innate and/or acquired

To explain the origin of the Zol-resistance observed in osteosarcoma cell lines, two hypotheses can be proposed: (i) an innate resistance mechanism linked to differential levels of FPPS expression and associated with selection of a sub-population of cells expressing a higher FPPS activity, (ii) an acquired resistance mechanism linked to an increased FPPS transcription level as a feedback response to long-term, low-dose Zol treatment. To distinguish between these two hypotheses, OSRGA osteosarcoma cell

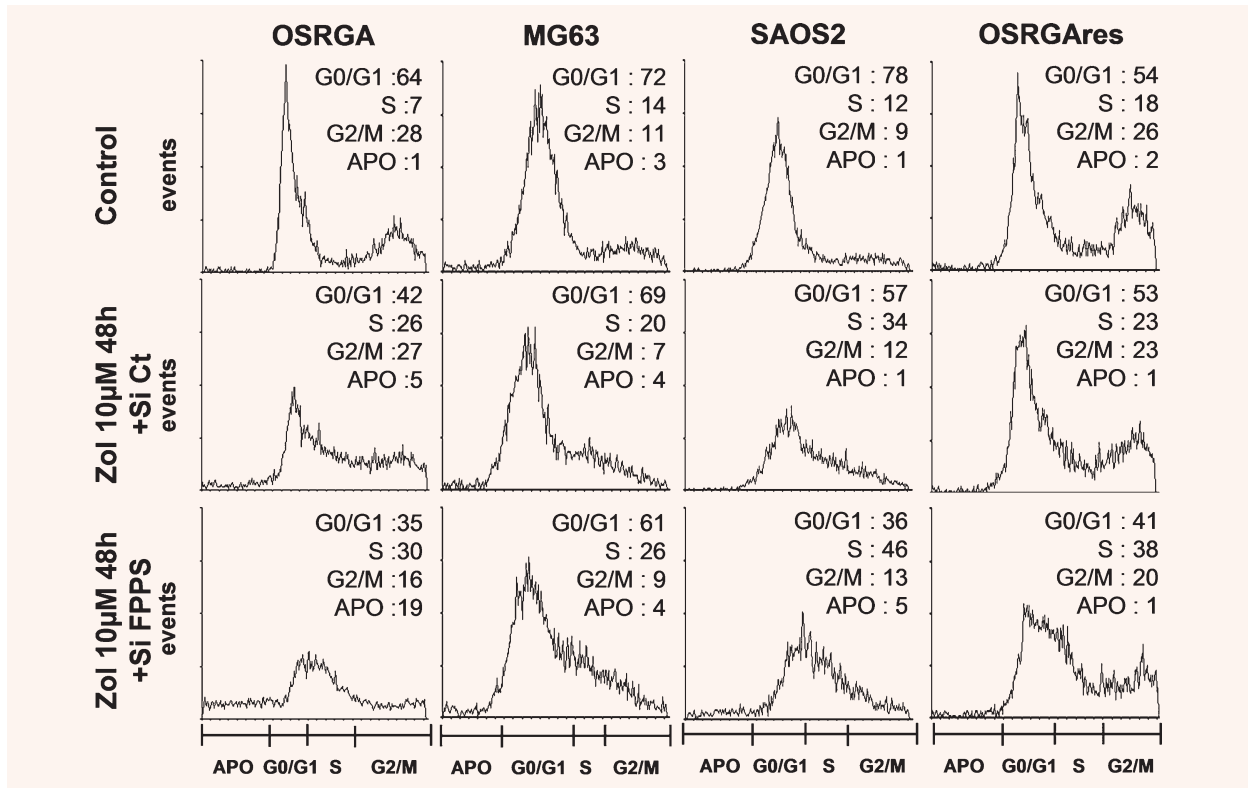


Fig. 4 FPPS siRNA increases the Zol-induced blockade of the cell cycle in S phases in osteosarcoma cell lines. Cell cycle distribution of osteosarcoma cell lines (FPPS siRNA versus control siRNA) treated or not treated with 10 µm Zol for 48 hrs were analyzed by propidium iodide staining and FACS analysis.

lines were treated with low Zol concentrations (1–10⁴ pM) for 72 hrs (Fig. 6A). Low concentrations of Zol induced a 60% increase of viable cells and up-modulated the expression of FPPS mRNA in a dose-dependent manner (Fig. 6A), these results support acquired resistance to Zol. Since a potential mechanism of innate resistance could be also envisaged, OSRGA cell line was cloned by limiting dilution and the expression of FPPS was analyzed by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 6B). Several clones were isolated with heterogeneous sensitivity to Zol treatment (Fig. 6B). Furthermore, the isolated clones expressed differential levels of FPPS related to their sensitivity to Zol treatment, these results support innate resistance to Zol (Fig. 6B). Similarly, we analyzed the transcriptional expression of FPPS in seven human osteosarcoma samples analyzed by semi-quantitative RT-PCR before any chemotherapy (Fig. 6C). The results revealed that a very high heterogeneity of FPPS expression in these patients strengthening the hypothesis of innate resistance to Zol.

Discussion

The first effects of BPs on calcium metabolism were discovered over 30 years ago, and these drugs have become the most widely used agents in the treatment of bone diseases associated with excessive resorption (osteoporosis, malignant osteolysis, etc). The recent evidences of an anti-tumor effect of nitrogen-containing BPs have led to investigation of the potential-acquired resistance mechanism. Indeed, failure of anti-cancer therapies often occur from innate or acquired drug resistance of the tumor cells to the chemotherapeutic agents [26]. In this context, the elucidation of potential resistance mechanisms to the Zol will allow adaptation of the treatment regimen in terms of duration and dose to avoid the development of drug resistance. The present study demonstrated that after 3 months of continuous treatment with 1 µm Zol, osteosarcoma cell lines became less sensitive to Zol inhibition and resistant cell lines were then progressively established. Furthermore, this

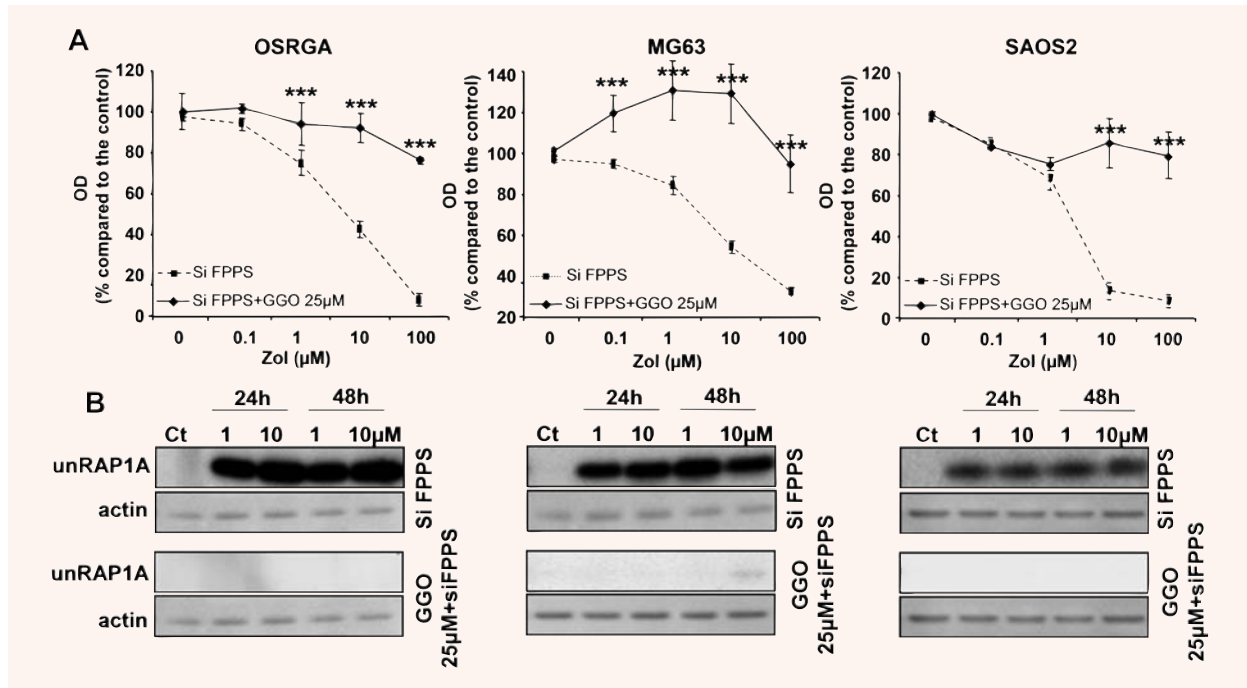


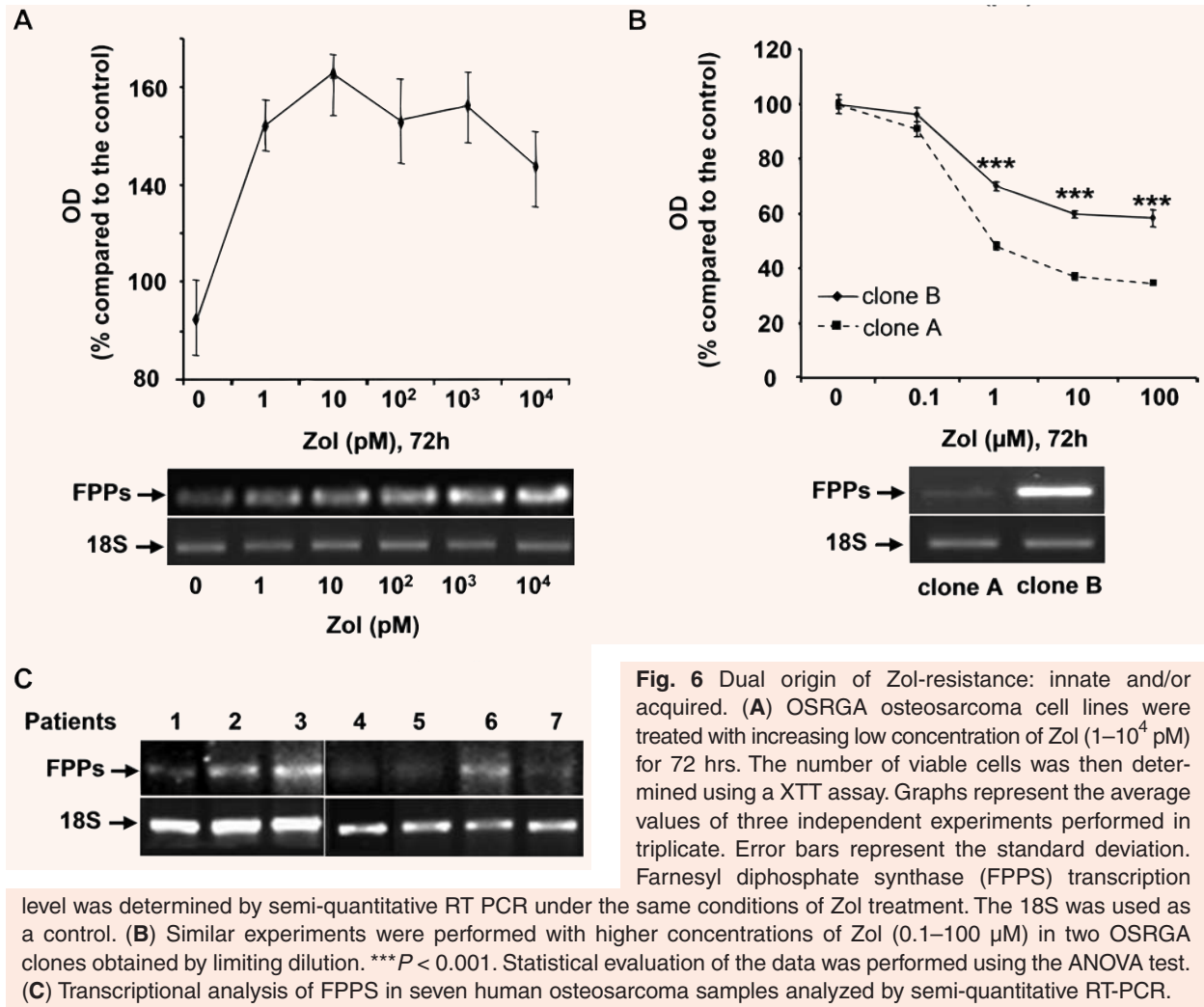
Fig. 5 Geranylgeraniol (GGO) reverses FPPS siRNA effects in osteosarcoma cell lines. **(A)** Rat (OSRGA) and human (MG63, SAOS2) osteosarcoma cell lines were transfected with FPPS siRNA and treated 24 hrs after with increasing concentrations of Zol (0.1–100 μM) for 72 hrs in the presence or not of 25 μM GGO. The number of viable cells was then determined using the XTT assay. Graphs represent the mean values of three independent experiments performed in triplicate. Error bars represent the standard deviation. ****P* < 0.001. Statistical evaluation of the data was performed using the ANOVA test. **(B)** Western blot analysis of unprenylated RAP1A (unRAP1A) form. Cells transfected with control siRNA or with FPPS siRNA combined with 25 μM GGO were treated with 1 and 10 μM Zol for 24 and 48 hrs. All experiments were repeated three times, and a representative blot is shown.

resistance appeared to be independent of the MDR phenotype and was clearly related to a differential expression of FPPS.

To exert its activities, Zol must be internalized by cells. Although the mode of Zol internalization is still controversial, two mechanisms have been proposed: first, cellular uptake of Zol may require fluid-phase endocytosis in osteoclasts [27]; in the second case, integrins located at the cell membrane could represent a binding site for Zol which could explain why Zol is able to inhibit cell adhesion and that RGD peptide prevents the Zol effects on osteosarcoma cell lines [13]. However, it remains unclear whether cell types other than osteoclasts can internalize BPs [27]. Recently, Notarnicola *et al.* demonstrated that high FPPS activity level correlates to a stronger inhibition of cellular apoptosis in colorectal cancer cells [28]. Similarly, Ortiz-Gomez *et al.* demonstrated that over-expression of FPPS confers resistance to ris-dronate in *Leishmania major* and that the degree of

resistance was correlated with an increase in this enzymatic activity [29]. These data strongly support our present results and strengthen the pivotal function of FPPS in the Zol-resistance mechanism. Although FPPS is considered as the main target of nitrogen-containing-BPs, the inhibition of prenylation being the most likely explanation for their biological effects, van Beek *et al.* evidenced that undetermined additional mechanisms could be involved which may be also proposed for specific resistance mechanisms in certain specific cell types [30].

In the present study, we wondered what could be the origin of the Zol-induced resistance mechanism: an innate or an acquired resistance mechanism? In fact, the results did not allow us to distinguish between these two hypotheses. The main argument in favor of an innate resistance mechanism is the differential FPPS expression of OSRGA osteosarcoma sub-clones composing the heterogenous 'parental' OSRGA cell line. Indeed, Zol treatment exerts a



selective inhibitory effect on cancer cells expressing less FPPS and after several weeks of culture, FPPS overexpressing cells become predominant and emerge from the parental population (Fig. 6B) [28]. Interestingly, we observe the same kind of heterogeneity in patients. We haven't yet correlated this with sensitivity to Zol treatment but it will be performed in a clinical trial and we could expect using FPPs expression level as a prognosis factor of Zol efficacy. On the other hand, the effect of Zol treatment on FPPS expression is in favor of an acquired resistance mechanism. Indeed, 72 hrs treatment with low doses of Zol (1–10⁴ pM) increased FPPS expression in OSRGA cells (Fig. 6A) inducing the development of FPPS overexpressing tumor cells

(Fig. 1D). Similar involvement has been envisaged in myeloma cells [31]. This hypothesis was also strengthened by Ortiz-Gomez *et al.* who obtained resistant cell lines by stepwise selection in the presence of risedronate, resulting in the development of resistant promastigotes exhibiting increased levels of FPPS at the transcriptional and the translational levels [29]. These authors considered that as a result of drug pressure, cells overcame the effects of risedronate by overexpressing the target protein. Such modification has been already observed in osteosarcoma patients treated with chemotherapy. Indeed, after comparison of primary biopsy tissue with that removed after metastasectomy, genetic changes acquired by the tumors have been demonstrated [32, 33].

An acquired resistance to BPs was also reported by Papapoulos *et al.* in Paget's disease [34]. These authors argued that resistance to the action of BPs in Paget's disease is caused by disease-related factors rather than decreased responsiveness of the molecular target in contrast to the present data. They supported this hypothesis with studies using statins that target the same intracellular biochemical pathway upstream of FPPS, these studies showed no evidence of development of resistance to their action [35, 36]. They also presented data suggesting that acquired resistance is specific for pamidronate and does not extend to other nitrogen-containing BPs. In summary, various and concomitant resistance mechanisms cannot be excluded: direct or indirect effects on FPPS, innate and/or acquired mechanisms.

Chemotherapy resistance in osteosarcoma is well documented [37]. Osteosarcoma cells are subjected to genetic disturbances such as alterations in the tumor suppressor pathways centered on p53 and Rb [38, 39], changes in oncogenes/anti-oncogenes such as deletions in p16^{INK4A} (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), c-fos overexpression and amplification of cyclin-dependent kinase 4 [40–42]. These genetic instabilities lead to heterogenic cell populations within the same tumor and to the emergence of resistant tumor cells. The most described resistance phenomena concern widely used chemotherapeutic agents such as cisplatin, doxorubicin or methotrexate. In these cases, the resistance mechanisms involved are mutation of the drug target, up- or down-regulation of the drug target, decreased drug uptake, drug inactivation, increased drug elimination and increased DNA repair [43–45]. Multidrug resistance phenotype (MDR), due to P-gp or related protein overexpression is the most reported resistance mechanism. In osteosarcoma, MDR1 [46] or P-gp [47] expression could be used as a prognostic marker for sensitivity to chemotherapy, allowing the selection of patients for whom alternative treatments may be considered. Recently, other prognostic factors have been described, such as the expression level of clusterin/apolipoprotein J [48] or expression of a pregnane xenobiotic receptor (PXR), a major inducer of cytochrome P450 3A4 [49]. Therefore, these factors may also represent predictive markers correlating with the response of cancer cells to chemotherapy.

We described in osteosarcoma a Zol-resistance mechanism specific to nitrogen-containing BPs which did not confer simultaneous resistance to other

unrelated drugs. In this context, drug resistance could be circumvented using multiple drugs with different cellular targets and different mechanisms of action. For instance, when Zol is associated with ifosfamide in rat osteosarcoma, enhanced tumor regression and tissue repair have been observed [11]. In the future, Zol could be combined with other chemotherapeutic agent to increase therapeutic efficacy and avoid the emergence of resistance mechanism [50].

Acknowledgements

Zoledronic acid was kindly provided by Novartis Pharma AG and masfosamide by Baxter Oncology (Dr Martinez, France). We thank Dr. Jonathan Green for helpful discussions, Caroline Colombeix from the confocal microscopy platform (Institut Fédératif de Recherche 26, Nantes) and Dr Philippe Juin (INSERM U601, Nantes) for help in time-lapse microscopy. This work was supported by INSERM and the Région des Pays de la Loire. Benjamin ORY received a fellowship from INSERM and the Région des Pays de la Loire.

References

1. **Link MP, Goorin AM, Horowitz M, Meyer WH, Belasco J, Baker A, Ayala A, Shuster J.** Adjuvant chemotherapy of high-grade osteosarcoma of the extremity. Updated results of the Multi-Institutional Osteosarcoma Study. *Clin Orthop Relat Res.* 1991; 8–14.
2. **Rosen G, Murphy ML, Huvos AG, Gutierrez M, Marcove RC.** Chemotherapy, en bloc resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer.* 1976; 37: 1–11.
3. **Provisor AJ, Ettinger LJ, Nachman JB, Krailo MD, Makley JT, Yunis EJ, Huvos AG, Betcher DL, Baum ES, Kisker CT, Miser JS.** Treatment of nonmetastatic osteosarcoma of the extremity with preoperative and postoperative chemotherapy: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol.* 1997; 15: 76–84.
4. **Heymann D, Ory B, Gouin F, Green JR, Redini F.** Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors. *Trends Mol Med.* 2004; 10: 337–43.
5. **Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC.** Cellular and

- molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*. 2000; 88: 2961–78.
6. **Rogers MJ.** New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des*. 2003; 9: 2643–58.
 7. **Russell RG.** Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics*. 2007; 119: S150–62.
 8. **Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R, Sebti S, Ralston SH, Hamilton A, Rogers MJ.** Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res*. 2000; 15: 1467–76.
 9. **Mackie PS, Fisher JL, Zhou H, Choong PF.** Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *Br J Cancer*. 2001; 84: 951–8.
 10. **Sonnemann J, Eckervogt V, Truckenbrod B, Boos J, Winkelmann W van Valen F.** The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of human osteosarcoma cell growth *in vitro*. *Anticancer Drugs*. 2001; 12: 459–65.
 11. **Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann MF, Coipeau P, Charrier C, Couillaud S, Thiery JP, 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.
 12. **Ory B, Heymann MF, Kamijo A, Gouin F, Heymann D, Redini F.** Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer*. 2005; 104: 2522–9.
 13. **Ory B, Blanchard F, Battaglia S, Gouin F, Redini F, Heymann D.** Zoledronic acid activates the DNA S-phase checkpoint and induces osteosarcoma cell death characterized by apoptosis-inducing factor and endonuclease-G translocation independently of p53 and retinoblastoma status. *Mol Pharmacol*. 2007; 71: 333–43.
 14. **Gottesman MM.** Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med*. 2002; 53: 615–27.
 15. **Gottesman MM, Ambudkar SV, Ni B, Aran JM, Sugimoto Y, Cardarelli CO, Pastan I.** Exploiting multidrug resistance to treat cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994; 59: 677–83.
 16. **Ozben T.** Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett*. 2006; 580: 2903–9.
 17. **Jasmin C, Allouche M, Jude JG, Klein B, Thiery JP, Perdereau B, Gongora R, Gongora G, Mazabraud A.** An experimental model of osteosarcomas in rats. *Sem Hop*. 1982; 58: 1684–9.
 18. **Klein B, Pals S, Masse R, Lafuma J, Morin M, Binart N, Jasmin JR, Jasmin C.** Studies of bone and soft-tissue tumours induced in rats with radioactive cerium chloride. *Int J Cancer*. 1977; 20: 112–9.
 19. **Evdokiou A, Labrinidis A, Bouralexis S, Hay S, Findlay DM.** Induction of cell death of human osteogenic sarcoma cells by zoledronic acid resembles anoikis. *Bone*. 2003; 33: 216–28.
 20. **Biedler JL, Riehm H.** Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro*: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res*. 1970; 30: 1174–84.
 21. **Gottesman MM, Pastan I.** Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*. 1993; 62: 385–427.
 22. **Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y.** Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res*. 1981; 41: 1967–72.
 23. **Gibbs JB, Oliff A.** The potential of farnesyltransferase inhibitors as cancer chemotherapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997; 37: 143–66.
 24. **Suri S, Monkkonen J, Taskinen M, Pesonen J, Blank MA, Phipps RJ, Rogers MJ.** Nitrogen-containing bisphosphonates induce apoptosis of Caco-2 cells *in vitro* by inhibiting the mevalonate pathway: a model of bisphosphonate-induced gastrointestinal toxicity. *Bone*. 2001; 29: 336–43.
 25. **Reszka AA, Halasy-Nagy J, Rodan GA.** Nitrogen-bisphosphonates block retinoblastoma phosphorylation and cell growth by inhibiting the cholesterol biosynthetic pathway in a keratinocyte model for esophageal irritation. *Mol Pharmacol*. 2001; 59: 193–202.
 26. **Kruh GD.** Introduction to resistance to anticancer agents. *Oncogene*. 2003; 22: 7262–4.
 27. **Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ.** Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol*. 2006; 6: 307–12.
 28. **Notarnicola M, Messa C, Cavallini A, Bifulco M, Tecce MF, Eletto D, Di Leo A, Montemurro S, Laezza C, Caruso MG.** Higher farnesyl diphosphate synthase activity in human colorectal cancer inhibition of cellular apoptosis. *Oncology*. 2004; 67: 351–8.
 29. **Ortiz-Gomez A, Jimenez C, Estevez AM, Carrero-Lerida J, Ruiz-Perez LM, Gonzalez-Pacanowska D.** Farnesyl diphosphate synthase is a cytosolic enzyme in *Leishmania major* promastigotes and its overexpression confers resistance to risedronate. *Eukaryot Cell*. 2006; 5: 1057–64.
 30. **van Beek ER, Cohen LH, Leroy IM, Ebetino FH, Lowik CW, Papapoulos SE.** Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen-containing bisphosphonates. *Bone*. 2003; 33: 805–11.

31. **Salomo M, Jurlander J, Nielsen LB, Gimsing P.** How myeloma cells escape bisphosphonate-mediated killing: development of specific resistance with preserved sensitivity to conventional chemotherapeutics. *Br J Haematol.* 2003; 122: 202–10.
32. **Ifergan I, Meller I, Issakov J, Assaraf YG.** Reduced folate carrier protein expression in osteosarcoma: implications for the prediction of tumor chemosensitivity. *Cancer.* 2003; 98: 1958–66.
33. **Zhou H, Randall RL, Brothman AR, Maxwell T, Coffin CM, Goldsby RE.** Her-2/neu expression in osteosarcoma increases risk of lung metastasis and can be associated with gene amplification. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003; 25: 27–32.
34. **Papapoulos SE, Eekhoff EM, Zwinderman AH.** Acquired Resistance to Bisphosphonates in Paget's Disease of Bone. *J Bone Miner Res.* 2006; 21: P88–91.
35. **Endo A.** The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res.* 1992; 33: 1569–82.
36. **Doggrell SA.** Statins in the 21st century: end of the simple story? *Expert Opin Investig Drugs.* 2001; 10: 1755–66.
37. **Chou AJ, Gorlick R.** Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006; 6: 1075–85.
38. **Arndt CA, Crist WM.** Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. *N Engl J Med.* 1999; 341: 342–52.
39. **Sandberg AA, Bridge JA.** Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003; 145: 1–30.
40. **Benassi MS, Molendini L, Gamberi G, Ragazzini P, Sollazzo MR, Merli M, Asp J, Magagnoli G, Ballardelli A, Bertoni F, Picci P.** Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma. *Int J Cancer.* 1999; 84: 489–93.
41. **David JP, Mehic D, Bakiri L, Schilling AF, Mandic V, Priemel M, Idarraga MH, Reschke MO, Hoffmann O, Amling M, Wagner EF.** Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. *J Clin Invest.* 2005; 115: 664–72.
42. **Wei G, Lonardo F, Ueda T, Kim T, Huvos AG, Healey JH, Ladanyi M.** CDK4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of 12q13 amplicons. *Int J Cancer.* 1999; 80: 199–204.
43. **Grem JL, King SA, Wittes RE, Leyland-Jones B.** The role of methotrexate in osteosarcoma. *J Natl Cancer Inst.* 1988; 80: 626–55.
44. **Siddik ZH.** Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003; 22: 7265–79.
45. **Beretta GL, Gatti L, Tinelli S, Corna E, Colangelo D, Zunino F, Perego P.** Cellular pharmacology of cisplatin in relation to the expression of human copper transporter CTR1 in different pairs of cisplatin-sensitive and -resistant cells. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68: 283–91.
46. **Gomes CM, van Paassen H, Romeo S, Welling MM, Feitsma RI, Abrunhosa AJ, Botelho MF, Hogendoorn PC, Pauwels E, Cleton-Jansen AM.** Multidrug resistance mediated by ABC transporters in osteosarcoma cell lines: mRNA analysis and functional radiotracer studies. *Nucl Med Biol.* 2006; 33: 831–40.
47. **Serra M, Pasello M, Manara MC, Scotlandi K, Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, Alvegard TA, Picci P, Bacci G, Smeland S.** May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol. *Int J Oncol.* 2006; 29: 1459–68.
48. **Lourda M, Trougakos IP, Gonos ES.** Development of resistance to chemotherapeutic drugs in human osteosarcoma cell lines largely depends on up-regulation of Clusterin/Apolipoprotein J. *Int J Cancer.* 2007; 120: 611–22.
49. **Mensah-Osman EJ, Thomas DG, Tabb MM, Larios JM, Hughes DP, Giordano TJ, Lizyness ML, Rae JM, Blumberg B, Hollenberg PF, Baker LH.** Expression levels and activation of a PXR variant are directly related to drug resistance in osteosarcoma cell lines. *Cancer.* 2007; 109: 957–65.
50. **Ory B, Moriceau G, Redini F, Heymann D.** mTOR inhibitors (rapamycin and their derivatives) and nitrogen bisphosphonates: bi-functional compounds for the treatment of bone tumors. *Curr Med Chem.* 2007; 14: 1381–7.

Complément de discussion et perspectives de l'article 1

Les premiers effets des bisphosphonates (BPs) sur le métabolisme calcique ont été découverts il y a une trentaine d'année et ils sont devenus les agents les plus utilisés dans le traitement des pathologies osseuses associées à une forte résorption (ostéoporose, ostéolyse maligne etc...). Les effets anti-tumoraux des BPs contenant un atome d'azote (N-BPs) ont récemment été montrés mais ne sont pas encore bien compris. En effet, les données de la littérature révèlent que les N-BPs tel le Zol induit une mort cellulaire, un blocage de la répartition des cellules en phase S-G2/M du cycle cellulaire et modifie l'expression de certaines cyclines (Kubista et al, 2006; Ory et al, 2007). De plus, il a été montré que le Zol induisait une apoptose atypique des cellules d'ostéosarcome caractérisée par des altérations nucléaires et des modifications de la balance Bax/Bcl2 en faveur de Bax (Kuroda et al, 2004 ; Ory et al, 2007). La mort cellulaire induit par le Zol est aussi associée à une augmentation de la perméabilité mitochondriale et une translocation des facteurs AIF (Apoptosis Inducing Factor) et Endo-G (Endonucléase-G) sans activation apparente de caspases (Ory et al, 2007). La mort cellulaire associée au Zol contourne la mutation p53 et Rb, deux gènes clés fréquemment mutés dans les cellules tumorales (Kuroda et al, 2004 ; Diel et al, 1998). La récente démonstration des effets anti tumoraux du Zol a conduit à l'étude des potentiels mécanismes de résistances associés au traitement. En effet, l'échec des traitements anti tumoraux résulte fréquemment d'une résistance innée ou acquise des cellules tumorales aux agents de chimiothérapies (Kruh et al, 2003).

Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes de résistance au Zol permettrait d'adapter un traitement en termes de durée et de dose et éviter le développement d'une résistance métabolique à cet agent.

Pour exercer son activité, le Zol doit être internalisé par les cellules. Bien que le mode d'internalisation du Zol soit toujours controversé, deux mécanismes ont été proposés : le premier ferait intervenir une endocytose en phase liquide des ostéoclastes où des effets directs ont été observés sur le recrutement et la formation des ostéoclastes, leur différenciation mais aussi sur leur activité de résorption (Coxon et al, 2006). Ory et al, suggèrent quant à eux que l'acide Zolédronique interagit avec les intégrines, ou tout du moins que les mécanismes d'action de l'acide Zolédronique sont associés à une voie de transduction associée aux intégrines (Ory et al, 2007). Ceci est en accord avec les travaux de Bezzi et al qui démontrent

l'inhibition de l'adhérence et de la migration des cellules endothéliales en présence de bisphosphonates sur la vitronectine (Bezzi et al, 2003). Afin d'approfondir le mécanisme et la cinétique de pénétration des bisphosphonates dans les cellules d'ostéosarcomes, du risédronate fluorescent (risédronate-FAM) a été utilisé en co-traitement avec différents marqueurs endocytaires : l'agglutinin-633 (marqueur de l'endocytose d'adsorption, non spécifique), la transferrine-633 (marqueur de l'endocytose médiée par un récepteur) et le TAMRA-dextran (marqueur de l'endocytose en phase liquide) sur nos cellules (figure 21).

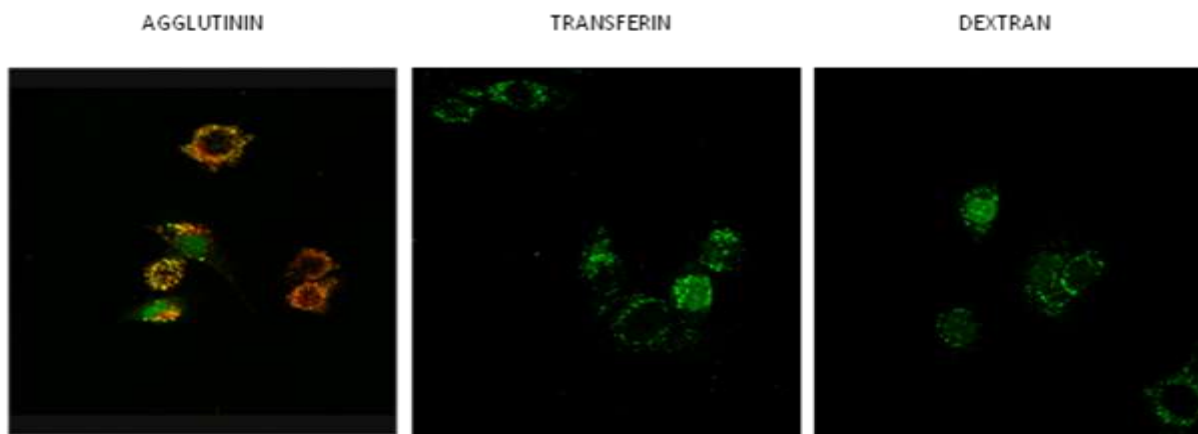


Figure 21 : Co-localisation du FAM-Ris (vert) avec les différents marqueurs endocytaires (rouge).

Ces premiers résultats sont en faveur d'une endocytose adsorptive où une colocalisation entre le FAM-Ris et l'agglutinin est visible mais d'autres expérimentations devront confirmer ce résultat.

Nous avons démontré, *in vitro*, l'activité directe de l'acide Zolédronique sur les cellules d'ostéosarcome, en effet, il est possible par Western blot, après traitement au Zol, d'observer l'apparition de la forme non prénylée de RAP1A témoignant de l'inhibition de la FPPs. Afin de démontrer l'activité directe du Zol *in vivo* nous utiliserons notre modèle de rat (Heymann et al, 2005) réalisé à partir de cellules tumorales contrôles ou transfectées stablement avec le plasmide PCMV-TAG2B-flag-Rap1A. Ce plasmide code pour une forme de RAP1A ayant un poids moléculaire plus élevé que le RAP1A physiologique. Ainsi, après traitement des rats par le Zol, il sera possible par Western Blot de distinguer l'apparition de la forme non prénylée de RAP1A présente dans toutes les cellules du rat de celle présente uniquement dans les cellules d'ostéosarcome. De cette façon nous serons en mesure de démontrer l'effet direct *in vivo* du Zol sur les cellules d'ostéosarcomes.

Les résistances des cellules d'ostéosarcome au Zol mettent en évidence la surexpression de la FPPs. Récemment Notarnicola et al (2004) ont démontré qu'un haut taux d'activité de la FPPs induit une forte inhibition de l'apoptose dans le cancer colorectal. De la même façon, Ortiz-Gomez et al (2006) mettent en évidence que la surexpression de la FPPs confère une résistance au risédronate dans *leishmania major* et que le degré de résistance est corrélé avec une augmentation de l'activité de cette enzyme. L'ensemble de ces données met en évidence le rôle essentiel de la FPPs dans les mécanismes de résistance au Zol.

Dans cette optique, après clonage puis infection dans des cellules d'ostéosarcome de différentes formes de la FPPs, l'effet du Zol sera analysé afin de savoir si l'efficacité du Zol dépend de la localisation de sa cible. En effet, une des deux formes clonées ne possèdera pas sa séquence d'adressage lui permettant d'aller dans le péroxysome et une des hypothèses actuelles serait que le Zol ne serait efficace que sur une FPPs péroxysomale mais les premiers résultats préliminaires trouvés au laboratoire ne permettent pas d'affirmer cela. Des études complémentaires sont en cours afin de démontrer l'impact de la localisation de cette enzyme sur l'activité du Zol. Enfin, si cette hypothèse est validée, un modèle d'ostéosarcome murin utilisant des cellules modifiées avec les deux formes nous permettrait d'étayer ce mécanisme.

Bien que la FPPs soit considérée comme la principale cible des N-BPs, l'inhibition de la prénylation étant la plus probable explication des effets biologiques observés, Van Beek et al (2003) ont mis en évidence que des mécanismes encore inconnus (inhibition de certaines protéines : tyrosine phosphatase, géranylgeranyl transférase etc...) seraient impliqués et responsable de cette résistance spécifique dans certains types cellulaires. Ainsi Evdokiou et ces collaborateurs (2009) ont montré que le Zol améliorait la microarchitecture osseuse mais ne permettait pas de réduire le volume tumoral probablement du à l'activité du Zol sur le microenvironnement osseux et que l'effet du Zol sur les cellules tumorales ne les empêchaient pas de métastaser en site pulmonaire mais aucune explication concrète n'est avancée.

Une des questions posées par ces observations est : quelle peut être l'origine des mécanismes de résistance observés : innée ou acquise ? Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de trancher entre ces deux hypothèses. Le principal argument en faveur d'une résistance innée est la différence de niveau d'expression de la FPPs entre les différents sous clones cellulaires composant la population parentale OSRGA. En effet, le traitement par le Zol exercerait une pression de sélection sur la population cellulaire, les clones exprimant le

plus faiblement la FPPs étant affectés les premiers. Après plusieurs semaines de culture dans ces conditions, les clones surexprimant la FPPs deviennent prédominants et émergent de la population parentale (Notarnicola et al, 2004). Il est intéressant de constater que les patients atteints d'ostéosarcome présentent eux aussi une forte hétérogénéité inter-individuelle de l'expression de la FPPs au sein de leur tumeur. Dans le protocole OS2006, le taux de FPPs des patients sera analysé à partir des leucocytes du sang circulant afin de corrélérer la réponse au Zol. D'autres expériences quant à elles laissent envisager un mécanisme de résistance acquis. En effet, après 72h de traitement par le Zol à faible concentration, on observe une augmentation de la prolifération des cellules tumorales liée à une augmentation du niveau d'expression de la FPPs. Cette hypothèse est également avancée par Ortiz-Gomez et al ; en effet ces auteurs obtiennent des lignées cellulaires résistantes par le même protocole de traitement au risédronate sur des cellules promastigotes (Ortiz-Gomez et al, 2006), et considèrent ce résultat comme un mécanisme de pression de sélection, les cellules s'opposant au risédronate en surexprimant sa protéine cible. Un tel phénomène a déjà été décrit chez des patients atteints d'ostéosarcome à la suite d'un traitement chimiothérapeutique. En effet, en comparant les biopsies effectuées avant et après le traitement chimiothérapeutique, des modifications génétiques acquises par les tumeurs ont pu être démontrées (Ifergan et al, 2003; Zhou et al, 2003). Une résistance acquise aux bisphosphonates a également été rapportée par Papapoulos et al dans la maladie de Paget (Papapoulos et al, 2006) ; les auteurs pensent que la résistance observée n'est due qu'à des facteurs liés à la maladie et non à une diminution de la réponse de la cible moléculaire. En résumé, le mécanisme de résistance des cellules d'ostéosarcomes à l'encontre du Zol est lié au niveau d'expression de la FPPs mais aucune hypothèse ne peut être exclue concernant le caractère inné ou acquis de la résistance.

La résistance à la chimiothérapie dans les ostéosarcomes est un sujet bien documenté (Chou et al, 2006). Les cellules d'ostéosarcome sont sujettes à des altérations génétiques de gènes clefs de la prolifération cellulaire tels que p53 et Rb (Arndt et al, 1999; Sandberg et al, 2003), de modifications d'oncogènes et d'anti-oncogènes telles qu'une délétion du gène p16^{INK4} (inhibiteur de kinase dépendante des cyclines), une surexpression de c-fos et une amplification de la kinase dépendante des cyclines 4 (Benassi et al, 1999; Wei et al, 1999; David et al, 2005). Cette instabilité génétique est responsable du développement de populations cellulaires hétérogènes au sein d'une seule et même tumeur ainsi que de l'émergence de cellules tumorales résistantes. Les cas de résistance les plus décrits concernent les agents de chimiothérapie les plus employés tels que le cisplatine, la doxorubicine ou le

métotrexate. Le phénotype MDR (multidrug resistance) est le mécanisme de résistance le plus décrit pour les ostéosarcomes, à tel point que les niveaux d'expression des gènes MDR1 et P-gp peuvent être utilisés à des fins diagnostiques pour présager de l'efficacité du traitement chimiothérapeutique (Serra et al, 2006). Ces facteurs pronostiques permettent la sélection des patients pour qui un traitement alternatif devra être considéré.

Cette étude fait état d'un mécanisme de résistance au Zol de la part des cellules d'ostéosarcome spécifique des N-BPs. Ce mécanisme ne conférant pas de résistances croisées à d'autres molécules n'ayant aucun point commun, structurel ou fonctionnel avec le Zol, il pourrait être contourné en utilisant plusieurs molécules ayant des cibles moléculaires et des mécanismes d'action différents. Par exemple, lorsque le Zol est associé à l'ifosfamide dans un modèle d'ostéosarcome de rat, une augmentation de la régression tumorale et de la réparation tissulaire peut être observée (Heymann et al, 2005). Dans le futur, le Zol pourra être combiné avec d'autres agents chimiothérapeutiques afin d'accroître l'efficacité thérapeutique et éviter l'émergence de mécanismes de résistance (Ory et al, 2007).

PARTIE II :

**L'acide Zolédronique potentialise
l'effet du RAd001 en termes de
prolifération cellulaire, d'activité
métabolique, diminue le volume et
la progression tumorale et améliore
la réparation tissulaire**

Cette approche thérapeutique des ostéosarcomes repose sur une combinaison médicamenteuse ciblée horizontale, c'est-à-dire que les deux molécules utilisées, à savoir le Zol qui cible la FFPs, enzyme clé de la voie du mévalonate et RAD001, inhibiteur spécifique de mTOR vont agir sur des protéines cibles différentes et qui appartiennent à des voies métaboliques différentes. Cette nouvelle approche des ostéosarcomes a pour objectif de potentialiser l'effet d'une des deux molécules et d'éviter l'émergence de résistance métabolique acquise.

I. RAD001 dérivé de la rapamycine, inhibiteur spécifique de la protéine mTOR

La rapamycine ou sirolimus est un antibiotique macrolide découverte dans un échantillon de sol de l'île Rapa Nui mieux connue sous le nom de l'île de Pâques comme produit de la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*. Initialement développé comme agent antifongique, il a rapidement été utilisé comme agent immunosuppresseur et a montré des propriétés antiprolifératives puissantes. La rapamycine et ses dérivés : temserolimus (CCI-779, Wyeth Ayerts, PA, USA), everolimus (RAD001, Novartis, Switzerland), AP23573 (Ariad, Pharmaceuticals, MA, USA) et tacrolimus (FK506, Prograf®, Fujisawa, Japan)(figure 22) sont des inhibiteurs de TOR (Target Of Rapamycin) ayant comme orthologue mammalien mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) mais doivent se lier à la protéine cytosolique FK-binding protein 12 (FKBP12) pour former un complexe pouvant l'inhiber.

mTOR est une protéine conservée à activité ser/thr kinase appartenant à la famille PI3K (phosphoinositide-3-kinase-related) comme ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated protein) et ATR (Ataxia Telangiectasia Related protein) qui sont tous deux impliquées dans les réparations de l'ADN. Cette kinase est une protéine carrefour qui gouverne un large panel de fonctions cellulaires : elle contrôle la croissance cellulaire, l'organisation du cytosquelette, l'autophagie, les activités de transcription et de l'initiation et la régulation de la traduction (Ory et al, 2008 ; Foster et al, 2010). Pour réguler ces mécanismes cellulaires physiologiques, mTOR intègre de nombreux paramètres environnementaux tels que des facteurs de croissance, hormones, cytokines, acides aminés, disponibilité en énergie et stress cellulaire (Ory et al, 2008 ; Foster et al, 2010) sous forme de deux complexes : mTORC1 (mTOR Complex 1) et mTORC2 (mTOR Complex 2).

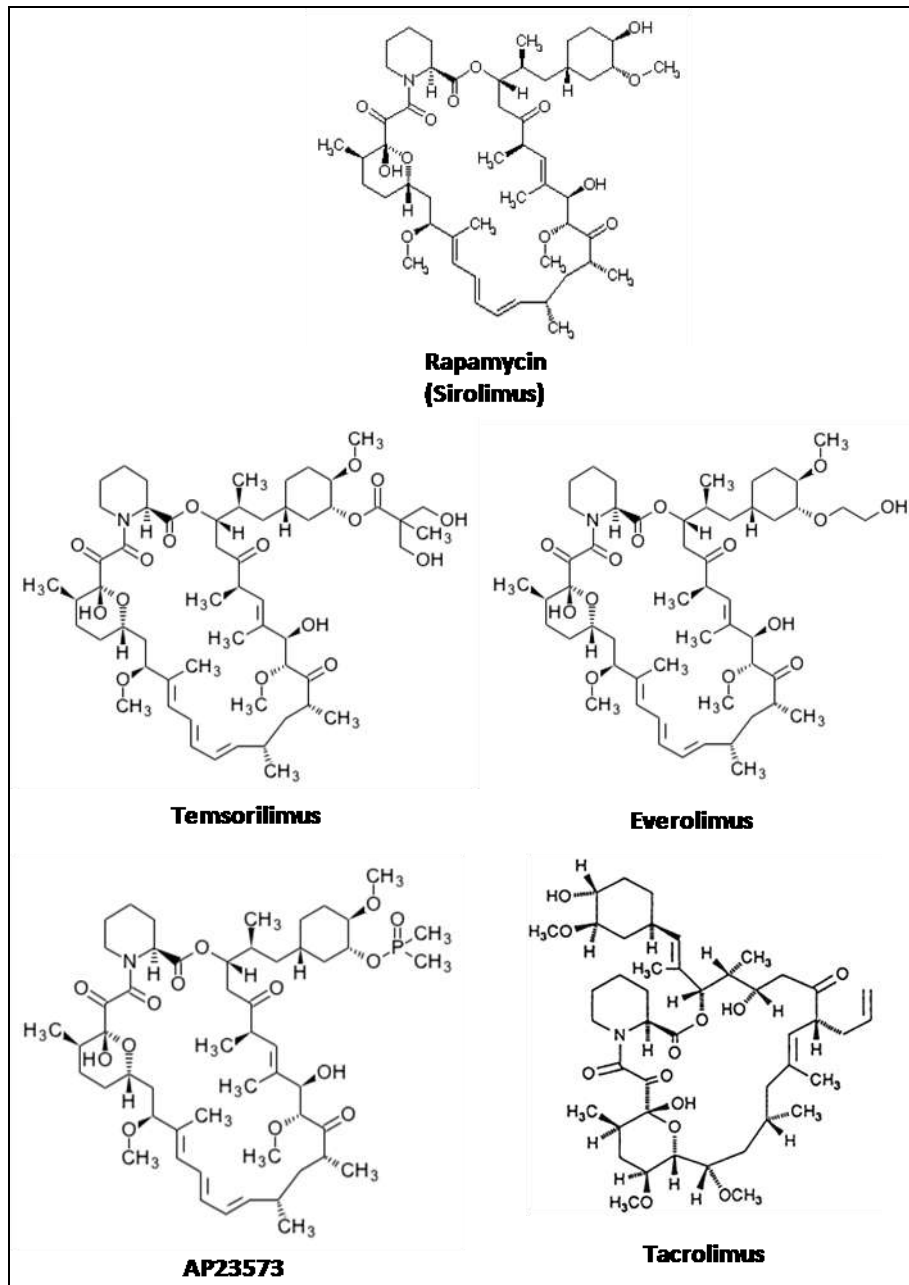


Figure 22 : Rapamycine et ses dérivés.

Ces deux complexes contiennent des protéines communes et distinctes mais leurs fonctions cellulaires restent à ce jour encore mal comprises (Foster et al, 2010). Chaque complexe comporte mTOR, mLST8/GβL et Deptor. mLST8/GβL lie le domaine kinase mTOR dans les deux complexes mais il semble moins affin pour se fixer sur mTORC2 (Guertin et al, 2006). Deptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) apparait comme fonction inhibitrice de mTOR (Peterson et al, 2009). D'autres partenaires protéiques distinguent ces deux complexes. mTORC1 contient exclusivement raptor (regulatory associated protein of

mTOR) et PRAS40. Raptor se lie à mTOR et jouerait le rôle de protéine d'échafaudage et permettrait à mTOR d'être lié au complexe mTORC1. La fonction de PRAS40 est discutée et controversée, elle agirait comme inhibiteur de mTORC1 ou comme substrat ou les deux (Foster et al, 2010 ; Dunlop et al, 2009). mTORC2 contient quant à lui rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 et PRR5/protor. Rictor et mSin1 permettent l'assemblage du complexe mTORC2 et sa signalisation alors que la fonction de PRR5 reste encore à définir (figure 23) (Bhaskar et al, 2007).

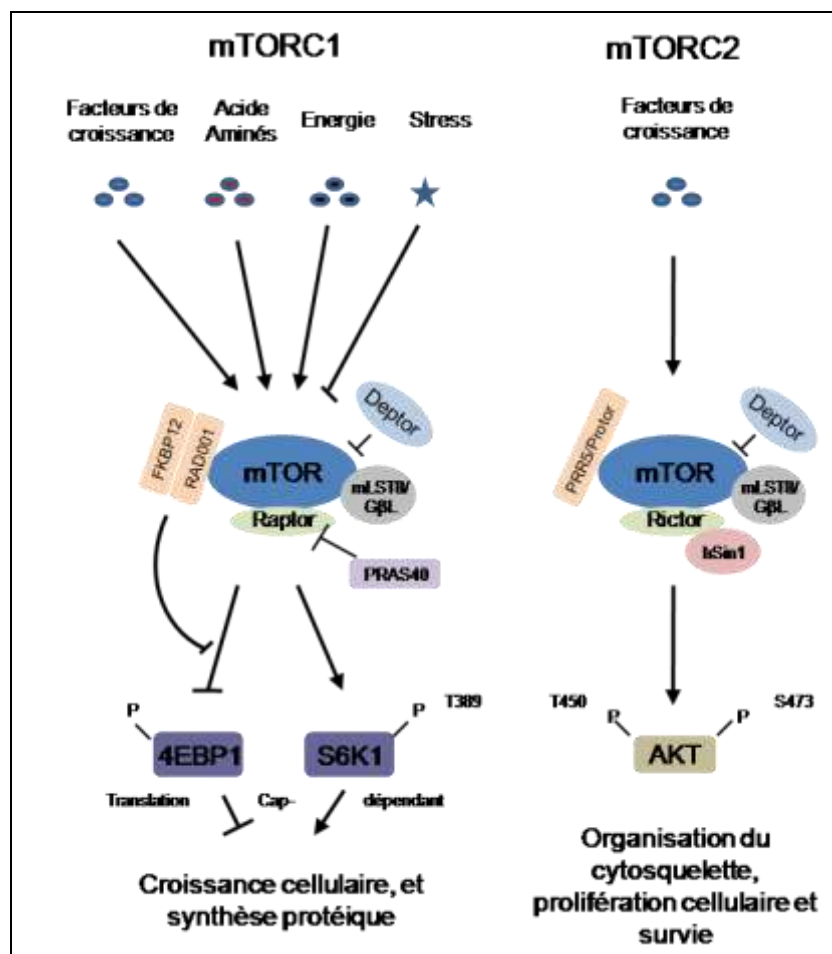


Figure 23 : mTORC1 versus mTORC2 (adapté d'après Ory et al, 2008).

mTORC1 intègre divers signaux extra et intracellulaires, activant ainsi des processus cellulaires anaboliques et inhibant des processus cellulaires cataboliques. Les facteurs de croissance ainsi que les nutriments (énergie et acides aminés) induisent la synthèse protéique, la croissance cellulaire (augmentation de la taille et masse de la cellule), la prolifération cellulaire et le métabolisme cellulaire via le complexe mTORC1 (Ma et al, 2009). Cependant

de faibles taux de ces facteurs n'activent pas mTORC1 et maintiennent donc les taux de synthèse protéique à des taux appropriés. Les interactions mTOR-Raptor sont indispensables pour les phosphorylations de S6K1 et 4EBP1 qui gouvernent l'initiation et la régulation de la traduction.

mTORC2 a comme premier substrat AKT (aussi connu sous le nom de protéine kinase B). AKT gouverne la prolifération cellulaire, la survie, la migration cellulaire et contrôle des processus métaboliques variés (Sarbasov et al, 2005). L'activation totale d'AKT en réponse à l'activation de la voie PI3K par des facteurs de croissance nécessite une double phosphorylation, une sur son résidu thréonine 308 par PDK1 et l'autre sur un motif hydrophobe (HM) (sérine 473) par mTORC2. mTORC2 peut aussi phosphoryler des sites HM de la protéine SGK1 (ser 422) et de la protéine kinase C α (ser 657) (Garcia-Martinez et al, 2008). La principale fonction de mTORC2 est le contrôle de l'organisation du cytosquelette (Jacinto et al, 2004). Récemment un rôle de mTORC2 dans le contrôle de la taille cellulaire et dans la progression du cycle cellulaire a été rapporté (Rosner et al, 2009). Des récentes données suggèrent que les phosphorylations induites par mTORC2 sur les sites HM d'AKT moduleraient différents substrats spécifiques. Ainsi des fibroblastes embryonnaires murins déficient pour rictor, mSin1 ou mLST8/G β L abolissent la phosphorylation d'AKT sur son résidu sérine 473 mais pas sur son résidu thréonine 308. Par conséquence, les phosphorylations induites par AKT sur Fox01/3a sont fortement réduites alors que celles gouvernant TSC2 ou GSK3 subsistent (Jacinto et al, 2006 ; Guertin et al, 2006).

D'une façon générale, les facteurs de croissance activant la voie PI3K et celle des MAPKs inhibent la fonction de TSC et active mTORC1 via différentes voies distinctes de signalisation. L'insuline ou l'insuline-like growth factor induisent l'activation de PI3K de classe I qui conduit à la production de PIP3 (phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate au niveau de la partie intracellulaire de la membrane plasmique. Cette activation est suivie du recrutement et de l'activation d'AKT *via* une phosphorylation coopérative induite par PDK1 sur la thréonine 308 et de mTORC2 sur la sérine 473 (Manning et al, 2007). Actuellement, il est suggéré, que AKT activé, phosphoryle TSC2 sur plusieurs résidus (ser 939 et thr 1462) pour inhiber l'activité TSC2 GTPase-activating. De plus l'activation de Ras par l'intermédiaire de l'EGF conduit à l'activation de MEK et MAPK, substrat de RSK. MAPK et RSK phosphorylent également TSC2 conduisant à l'inhibition des fonctions de TSC2. Les facteurs de croissance activent donc la signalisation de mTORC1 par suppression de la fonction de TSC2 *via* des voies de signalisation PI3K dépendant ou PI3K indépendant.

D'autres molécules peuvent activer mTORC1 tels l'acide phosphatidique ou encore Wnt par l'intermédiaire de GSK3 qui interagissent avec mTORC1 de manière différente. De plus un taux énergétique intracellulaire faible conduira à un ralentissement de l'activité de mTORC1. L'élévation du ratio AMP/ATP associée à une phosphorylation induite par LKB1 conduit à l'activation de l'AMPK, régulateur principal du métabolisme énergétique cellulaire. AMPK phosphoryle TSC2 (ser 1345 et sûrement d'autres résidus) afin d'augmenter l'activité de TSC2 supprimant ainsi l'activité de mTORC1 (Huang et al, 2008).

Les acides aminés représentent le plus ancestral activateur de mTORC1 mais aussi le moins compris. En effet, le retrait d'acides aminés et en particulier des chaînes ramifiées des acides aminés leucine et isoleucine inhibent rapidement la signalisation de mTORC1 même face à une concentration abondante de facteurs de croissance. mTORC1 restant sensible au taux d'acide aminé dans des cellules déficientes pour TSC2, mTORC1 est donc régulé par les signaux médiés par les acides aminés sans intervention de TSC2 (Huang et al, 2008). hVPS34, protéine PI3K de classe III, connu pour fonctionner dans le tri vacuolaire et dans l'autophagie, représente le premier maillon identifié entre la signalisation induite par les acides aminés et mTORC1 (Byfield et al, 2005 ; Nobokini et al, 2005). De nombreuses GTPases (RAGs et Ra1A) ont été montrées capables d'activer mTORC1 en réponse à une signalisation induite par des acides aminés (Kim et al, 2008 ; Sancak et al, 2008 ; Maehama et al, 2008). Un modèle récent a montré que des hétérodimères RAG-GTP se lient à raptor et induisent le recrutement de mTORC1 d'un compartiment cytoplasmique mal défini à un compartiment contenant l'activateur de mTORC1, Rheb. Si mTORC1 est au mauvais endroit (comme lors de la privation d'acides aminés), il ne peut être activé au bon moment par Rheb (Sancak et al, 2008).

Par rapport à mTORC1, les régulations de mTORC2 sont pratiquement inconnues. L'inhibition pharmacologique de PI3K réduit l'activité kinase de mTORC2, PI3K semble donc être en amont de mTORC2. De plus le complexe TSC1/2 peut activer mTORC2 alors qu'il inhibe mTORC1 (Huang et al, 2008). Finalement après activation de mTORC1 par ces différents protagonistes, mTORC1 va phosphoryler 4EBP1 lui permettant ainsi de libérer eIF4E. eIF4E libérée sera ensuite phosphorylée et activée par des protéines de la voie des MAPKs (ERK1/2). S6K1 sera aussi phosphorylée et permettra la libération d'eIF3. eIF3 et eIF4E vont former avec eIF4A, B et G un gros complexe (eIF4F) se fixant sur la coiffe de l'ARN et permettant ainsi l'initiation de la traduction (figure 24).

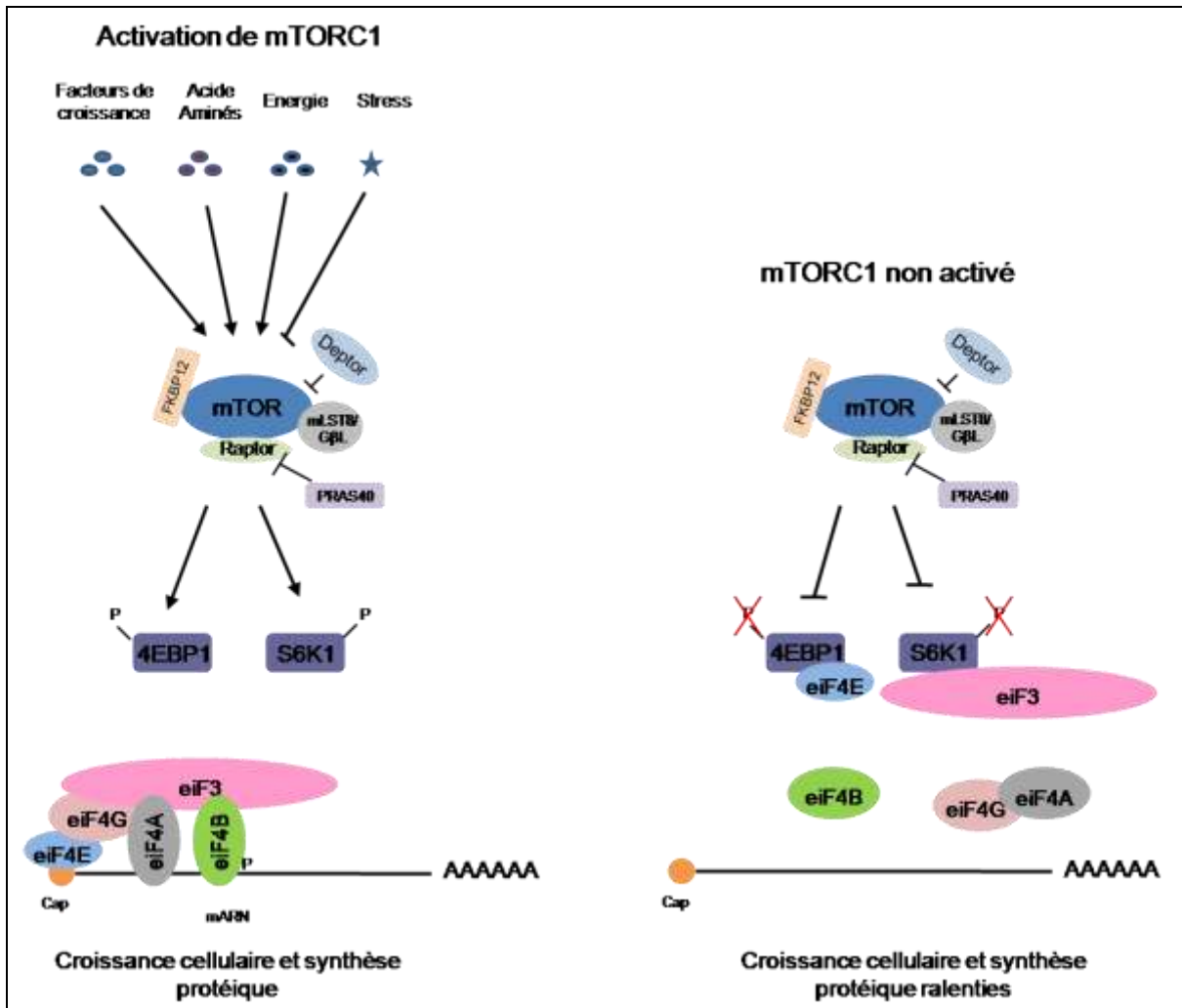


Figure 24 : Initiation de la traduction après activation de mTORC1 (adapté d'après Schaeffer, 2010).

Cependant des boucles de rétrocontrôle compliquent l'étude de la régulation de mTORC1. La signalisation mTORC1/S6K1 induit une phosphorylation (ser/thr) inhibitrice sur IRS qui conduit à la réduction de la signalisation de PI3K (Harrington et al, 2005). De plus S6K1 phosphoryle rictor sur le résidu thréonine 1135 et réduit donc la signalisation de mTORC2 (Polak et, 2009 ; Julien et al, 2010). L'axe mTORC1/S6K1 opère donc avec deux boucles de rétrocontrôle négatives pour réduire la signalisation de PI3K et de mTORC2 (figure 25).

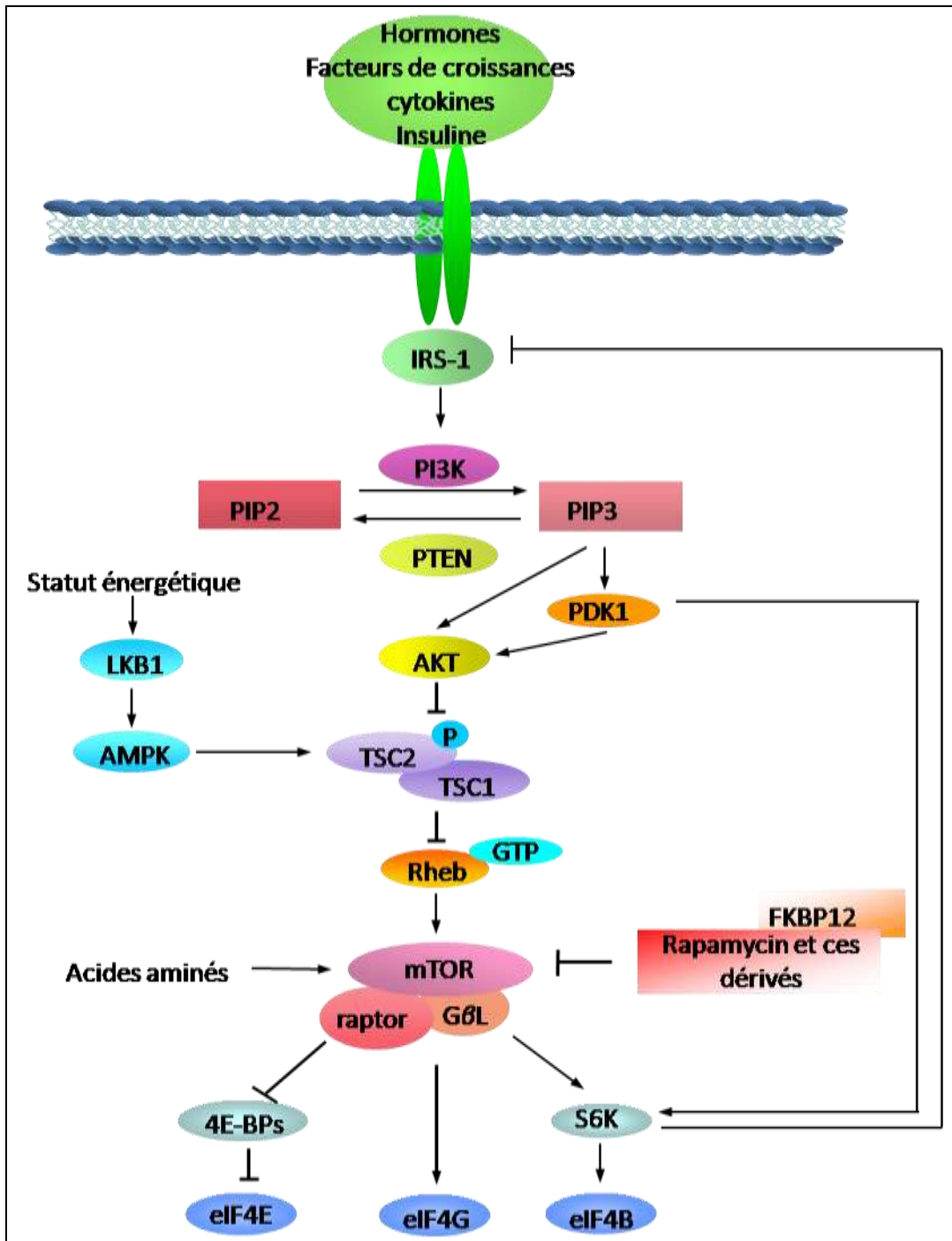


Figure 25 : Voie PI3K/AKT/mTOR et ces boucles de rétrocontrôle (Ory et al, 2008).

mTOR étant une protéine carrefour importante dans la signalisation traductionnelle et proliférative qu'elle est une cible logique dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées. Nous avons donc étudié l'effet d'un dérivé de la rapamycine, everolimus [RAD001 (40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin)] sur les cellules d'ostéosarcome (figure 26).

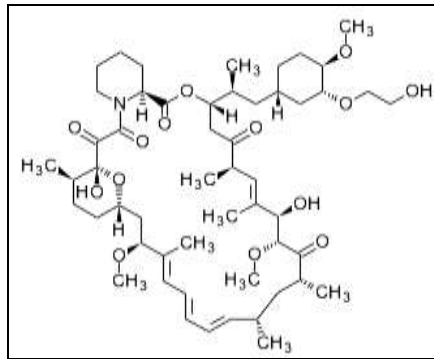


Figure 26 : Everolimus, dérivé de la rapamycine.

Comme la rapamycine, RAD001 se fixe à la protéine FKBP12 pour inhiber le complexe mTORC1 et donc éteindre sa signalisation (figure 27).

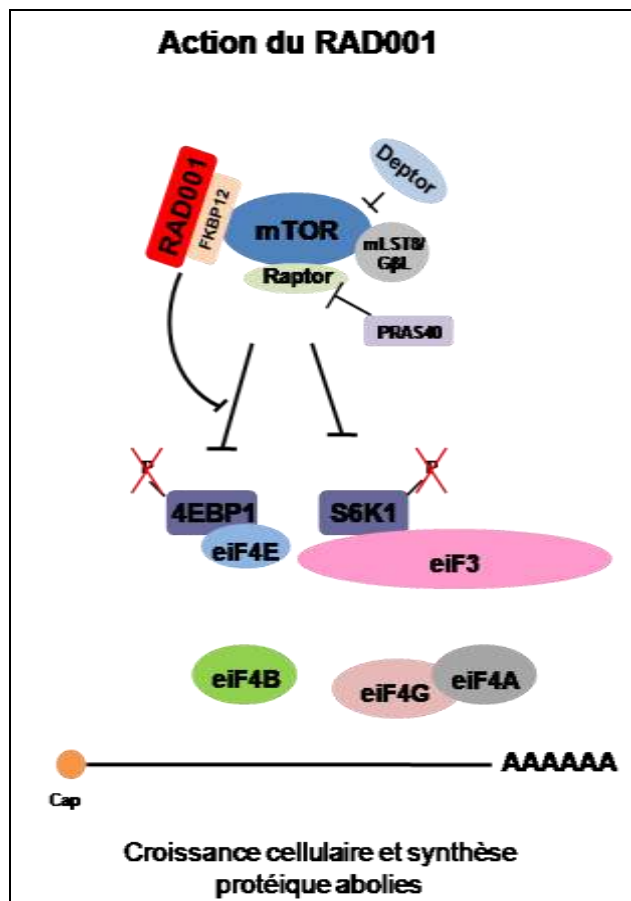


Figure 27 : Effet du RAD001 sur mTORC1 (adapté d'après Schaeffer, 2010).

En inhibant mTORC1, RAD001 induit un blocage d'eiF4E et d'eiF3, ainsi bloquer ces deux protéines ne peuvent plus se fixer sur la coiffe de l'ARN et l'initiation de la traduction

est bloquée. De plus un blocage des cellules en phase G1 est observé dirigeant ainsi les cellules vers une mort cellulaire programmée.

RAD001 inhibe la croissance cellulaire d'au moins 50% dans un grand nombre de lignées tumorales avec des concentrations sub-nanomolaires, inhibe la prolifération des cellules endothéliales du cordon ombilical et réduit l'expression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et de HIF1 α (Hypoxia-inducible factor 1 alpha) (Houghton et al, 2010). RAD001 inhibe également la croissance tumorale d'un modèle de xénogreffe humaine chez la souris nude alors que la lignée était insensible au RAD001 *in vitro*. L'inhibition de la progression tumorale serait due à l'activité anti-angiogénique de RAD001 (Lane et al, 2009). Cependant quelques tumeurs semblent intrinsèquement résistantes avec comme hypothèse une surexpression de la P-gp correspondant à un phénotype MDR.

Chez les adultes présentant des tumeurs malignes hématologiques récurrentes, l'administration quotidienne de 5 à 10 mg d'everolimus par voie orale a été bien tolérée par les patients (Fouladi et al, 2007). Les effets secondaires les plus fréquents du RAD001 ont été hyperglycémie, hypophosphatémie, fatigue, anorexie et la diarrhée. L'analyse des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) des patients a révélé une inhibition significative de l'activité de mTOR ainsi que de 4EBP1, AKT et p70S6K (Yee et al, 2006). Dans un essai clinique de phase 1 chez l'enfant souffrant d'une tumeur solide récurrente ou réfractaire au traitement, la dose maximale tolérée est de 5 mg/m²/jour par voie orale. Les effets secondaires étaient les mêmes que chez l'adulte. Les statuts d'AKT, mTOR analysés à partir des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) ont montré une inhibition significative de leur phosphorylation (fouladi et al, 2007). Une phase II réalisée sur 37 patients atteints d'un carcinome rénal métastatique a montré une augmentation de la survie des patients avec quelques effets secondaires mentionnés précédemment (Amato et al, 2009). Dans un essai clinique de phase III réalisé sur 410 patients atteints de carcinome rénal sous traitement de sunitinib et/ou sorafenib, RAD001 a montré un effet anti-tumoral cytostatique prolongeant ainsi la vie des patients (Blay JY, 2010).

D'autre part, l'utilisation de RAD001 ou des rapalogues (dérivés de la rapamycine) en combinaison avec d'autres agents anticancéreux ouvre des perspectives intéressantes. Ainsi l'association entre RAD001 et l'imatinib a permis d'augmenter les effets de l'imatinib sur des cellules de leucémie myéloïde chronique (Mancini et al, 2010) et dans le traitement des GIST préalablement résistante à l'Imatinib (Schöffski et al, 2010). De plus, cette combinaison

permet de modérer l'acquisition de résistance à l'imatinib (Dengler et al, 2005). Enfin la rapamycine et ses dérivés à l'exception du tacrolimus agissent sur l'environnement osseux. En effet mTOR apparaît comme une voie de signalisation essentielle responsable de la survie des ostéoclastes (Kneissel et al, 2004) et inhibe la différenciation ostéoblastique (Krocker et al, 2006). Le TNF α , RANKL et le M-CSF induisent la survie des ostéoclastes *via* mTOR/S6K1 (Glantschig et al, 2003). De plus, lorsque les intermédiaires PI3K, AKT, ERK et certaines protéines géranylgeranylées sont inhibées, la signalisation mTOR/S6K1 est abolie et l'apoptose des ostéoclastes survient. De part son activité spécifique d'inhibiteur de mTOR, RAD001 en combinaison avec le Zol apparaît comme une stratégie combinatoire ciblée innovante ayant comme objectif un ciblage de la résorption osseuse et de la prolifération tumorale. Par ailleurs, ces deux molécules agissant sur deux cibles différentes, cette stratégie devrait limiter l'émergence de résistance métabolique.

Article 2

« L'acide Zolédronique potentialise l'inhibition de mTOR et abolit la résistance des cellules d'ostéosarcome au RAD001 : Rôle pivot du processus de prénylation »

Gatien Moriceau, Benjamin Ory, Laura Mitrofan, Chiara Riganti, Frédéric Blanchard, Régis Brion, Céline Charrier, Séverine Battaglia, Paul Pilet, Marc Denis, Leonard D. Shultz, Jukka Mönkkönen, Françoise Rédini, Dominique Heymann.

[Zoledronic acid potentiates mTOR inhibition and abolishes the resistance of osteosarcoma cells to RAD001 \(Everolimus\): pivotal role of the prenylation process.](#)

Moriceau G, Ory B, Mitrofan L, Riganti C, Blanchard F, Brion R, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, Denis MG, Shultz LD, Mönkkönen J, Rédini F, Heymann D.

Cancer Res. 2010 Dec 15;70(24):10329-39. Epub 2010 Oct 22

Nous avons pu précédemment montrer que le Zol inhibe la prolifération des cellules d'ostéosarcome et induit une mort cellulaire indépendante des caspases. Afin de contrôler l'émergence de résistance métabolique acquise ou innée des cellules tumorales d'ostéosarcome et d'améliorer l'efficacité des traitements, une stratégie thérapeutique combinatoire ciblée a été réalisée. Cette étude porte sur l'utilisation du RAD001, agent antitumoral en association avec le Zol, bisphosphonate de troisième génération. En effet RAD001 est un inhibiteur spécifique de mTOR et le Zol cible la farnésyl disphosphate synthase (FPPs). Ces deux protéines cibles n'étant pas communes à la même voie de signalisation, cette combinaison médicamenteuse s'intègre dans les thérapies combinatoires ciblées horizontales.

RAD001 et le Zol inhibent la prolifération des cellules d'ostéosarcome (humaine : MG63 ; de rat : OSRGA et de souris : POS-1) de manière dépendants de la dose et du temps sans modification de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire. Cependant, les cellules MOS-J (ostéosarcome murin) sont résistantes aussi bien au RAD001 qu'au Zol. Dans toutes les lignées cellulaires étudiées, l'association RAD001 + Zol exerce un effet synergique sur l'inhibition de la prolifération cellulaire et induit une diminution significative de l'activité de mTOR et de 4EBP1 ainsi qu'une diminution de la prénylation de Ras. La manumycin A, inhibiteur de la farnésylation de Ras, mime l'activité du ZOL en combinaison avec RAD001

mettant ainsi en avant l'hypothèse que Ras serait un des liens entre les deux voies de signalisation. De plus l'utilisation d'autres bisphosphonates de génération autre que celle du Zol a permis de mettre en exergue que la classe des bisphosphonates, à savoir les N-BPs étaient les seuls à synergiser avec RAD001.

Cette association a ensuite été utilisée dans deux modèles d'ostéosarcome induit par l'injection intra-musculaire de cellules MOS-J dans des souris C57BL/6J dans un premier modèle et par transplantation de fragment tumoral POS-1 au contact du tibia dans des souris C3H/HeN dans un second modèle. Dans les deux modèles réalisés, le Zol (100 µg/kg deux fois par semaine) et le RAD001 (5 mg/kg/jour, voie orale) utilisés seuls n'ont aucun effet sur la progression tumorale contrairement à l'association des deux drogues qui diminue significativement la croissance tumorale. Enfin le Zol (seul et en association) augmente fortement la formation osseuse.

Ce travail démontre l'effet synergique *in vitro* et *in vivo* des inhibiteurs des voies de signalisation de mTOR (RAD001) et du mévalonate (Zol) par l'intermédiaire d'une altération du processus de prénylation.

Zoledronic acid potentiates mTOR inhibition and abolishes the resistance of osteosarcoma cells to RAD001 (Everolimus): pivotal role of the prenylation process

Gatien Moriceau^{a, b}, Benjamin Ory^{a, b, c}, Laura Mitrofan^d, Chiara Riganti^e, Frédéric Blanchard^{a, b}, Régis Brion^{a, b}, Céline Charrier^{a, b}, Séverine Battaglia^{a, b}, Paul Pilet^f, Marc Denis^g, Leonard D. Shultz^h, Jukka Mönkkönen^d, Françoise Rédini^{a, b}, Dominique Heymann^{a, b, *}

^a INSERM, UMR 957, Nantes, F-44035 France

^b Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives

^c Massachusetts General Hospital Cancer Center and Harvard Medical School, Boston, USA

^d Department of Pharmaceutics, University of Kuopio, Finland

^e Department of Genetics, Biology and Biochemistry, University of Turin, Italy

^f INSERM, UMR 791, Nantes

^g INSERM, UMR 913, Nantes

^h The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA

***Corresponding author:** dominique.heyman@univ-nantes.fr

Running title: Additive effect of ZOL and mTOR on osteosarcoma development

Key words: osteosarcoma, mTOR, rapamycin, bisphosphonate, drug resistance

Abstract

Despite recent improvements in osteosarcoma therapeutic management, non-response to chemotherapy warrants new strategies to improve the overall survival rate. Because mono-chemotherapies are not efficient in controlling tumor progression, novel multi-drug combinations targeting various molecular pathways are being developed to decrease the emergence of resistance and to potentiate treatment efficacy. We investigated *in vitro* and *in vivo* the effects of RAD001 (Everolimus®), on the growth of human MG63, rat OSRGA, mouse MOS-J and POS-1 osteosarcoma cells, both alone and in combination with Zoledronic acid (ZOL). *In vitro* data revealed that RAD001 exerts cytostatic effects on MG63, OSRGA and POS-1 osteosarcoma cells, inhibiting their proliferation in a dose- and time-dependent manner with no modification of cell cycle distribution. Furthermore, its combination with ZOL induced an additive effect on cell proliferation and decreased the PI3K/mTOR signaling pathway compared to single treatments. Interestingly, in contrast to RAD001, ZOL downregulated isoprenylated membrane-bound Ras concomitantly to an increase of non-isoprenylated cytosolic Ras in sensitive- and resistant-osteosarcoma cell lines. ZOL and RAD001 synergized to decrease Ras isoprenylation and the amount of Ras bound to

GTP. RAD001 and ZOL combination significantly reduced tumor development in two murine models of osteoblastic-MOS-J and osteolytic-POS-1 osteosarcoma. Using RAD001-resistant MOS-J cells, we demonstrated that ZOL abolished this resistance *in vivo* and induced inhibition of osteosarcoma cell growth in combination with RAD001. The present work demonstrated the *in vitro* and *in vivo* additive effect of mTOR and mevalonate pathway inhibitors through a lateration of the prenylation process.

Introduction

Current therapeutic strategies of osteosarcoma are based on tumor resection associated with highly toxic chemotherapy and fail to improve prognosis (1, 2) due to an absence of response to anti-tumor drugs observed in many cases. Failure of anti-cancer therapies often occurs from innate or/and acquired drug resistances of tumor cells to chemotherapies (3). In this context, therapies based on combinatorial drug approaches (4) appear as adapted clinical strategies for improving therapy and overcoming the multi-faceted characteristics of cancer cells.

Osteoclasts are the main target in bone of nitrogen-containing bisphosphonates (N-BP) including such as ZOL on which

they induce apoptosis by inhibiting enzymes of the mevalonate pathway (5-7). Thus, the most common clinical application is osteoporosis, but bisphosphonate application has been extended to the treatment of malignant hypercalcemia. In addition, recent *in vitro* studies demonstrated an anti-tumor activity exerted by ZOL on cancer cells (8-10). Result of *in vivo* experiments also highlighted the therapeutic interest of ZOL alone or in combination with conventional chemotherapy on the growth of carcinoma (11) and sarcoma (12).

mTOR plays a key role in regulating protein metabolism, and dysregulations in mTOR signaling are frequently associated with cancer progression (13). Indeed, mTOR is a member of the PI3K family such as ATM and ATR proteins involved in DNA repair (14). mTOR functions encompass in two signaling complexes, mTORC-1 and -2, which are sensitive to rapamycin at very different concentrations (15). Thus, mTOR inhibition revealed its impact on cellular function and cell growth (16-19). Rapamycin and its analogues (RAD001, CCI-779, AP23573) (13) have shown promise in preclinical models and in clinical trials including patients suffering from neoplastic diseases (20-26). Houghton et al reported that rapamycin extents anti-tumor

activity in paediatrics tumors *in vitro* and *in vivo* including osteosarcoma (27, 28). In this context, a phase II clinical trial in patients with advanced soft tissue or bone sarcomas revealed that AP23573 exhibits single-agent activity in patients as shown by the prolonged overall survival (29) pointing out the pivotal role of the mTOR pathway in the pathogenesis of osteosarcoma. However, resistance to rapamycin has been identified and was associated with a decreased binding to it, altered mTOR up- or down-stream signaling or feedback loop associated with mTOR pathway (30).

Because RAD001 appears to be a promising agent for the treatment of neoplastic diseases, the effects of RAD001 was investigated on the growth of osteosarcoma cells, both alone and in combination with ZOL. We also investigated the mechanisms involved in the RAD001-sensitivity and resistance of osteosarcoma cells and assessed a method to abolish RAD001 resistance *in vitro* and *in vivo*.

Materials and Methods

Cells and culture conditions

The rat osteosarcoma OSRGA cell line established from a radio-induced osteosarcoma (31) and human MG63 cells

purchased from ATCC (Promochem, France) were cultured in DMEM (Lonza, Belgium) supplemented with 10% FCS (Hyclone, USA). Murine osteosarcoma POS-1 and MOS-J cells were provided respectively by Dr Kamijo (32) and by Dr Shultz (33) and were cultured in RPMI with 10% FCS

Cell Growth and viability

Cell growth and viability were determined by XTT reagent assay kit (Roche Molecular Biomedicals, Germany). Two thousand cells were cultured for 72 h in the presence or absence of RAD001 (0.1-100 nM), ZOL (0.1-100 μ M) or in combination of 1 or 10 nM RAD001 with 1 μ M ZOL. ZOL and RAD001 were provided by Pharma Novartis AG (Switzerland). Similar experiments were performed in the presence or absence of Clodronate (100-300 μ M, Sigma), Risedronate (2-100 μ M, Procter&Gamble, USA) or Manumycin A (2 or 3 μ M, Sigma) combined or not with 1 nM RAD001. After the culture period and addition of XTT reagent, the absorbance was then determined at 490 nm. Cell viability was also assessed by Trypan blue exclusion, viable and non-viable cells were manually counted.

Caspase Activity

Twenty thousand cells were treated for 72 h with or without RAD001 (0.1-100 nM), ZOL (0.1-100 μ M) or a combination of 1 or 10 nM RAD001 with 1 μ M ZOL. Caspase-3 activity was assessed on 10 μ l of total cell lysates using the kit CaspACE Assay System (Promega, USA), following the manufacturer's recommendations. Results were expressed in arbitrary units and corrected for protein content quantified using the BCA test (Pierce Chemical Co.). Cells treated with 100 nM Staurosporin for 24 h were used as a positive control.

Time-lapse microscopy

Cells were cultured at 5×10^3 cells/mm² in the presence or absence of 10 nM RAD001. Time-lapse experiments were started just after adding the pharmaceutical agent. Phase-contrast photos were taken every 10 min for 72 h through a Leica DMI 6000B microscope (Germany) using X10 objective. Cell divisions in each field of observation were then manually scored in a time-dependent manner. Each condition was performed twice in duplicate.

Cell cycle Analysis

Sub-confluent OSRGA, MG63, POS-1 or MOS-J cells were incubated with or without

1 μ M ZOL and/or 1-10 nM of RAD001 for 24 h to 72 h. After the treatment period, trypsinized cells were incubated in PBS containing 0.12% Triton X-100, 0.12 mmol/L EDTA, and 100 μ g/mL DNase-free RNase A (Sigma). Then, 50 μ g/ml propidium iodide were added for 20 min at 4°C in the dark. Cell cycle distribution was studied by flow cytometry (Cytomics FC500, Beckman Coulter, France), based on 2N and 4N DNA content, and analyzed by DNA Cell Cycle Analysis Software (Phoenix Flow System, USA).

Cell signaling analysis

Two hundred thousand cells were treated with 1 μ M ZOL or/and 1-10 nM RAD001 for 72 h and then lysed in radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 5% Tris, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1mM Na₃VO₄, 0.5 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin). Lysates were cleared of debris by centrifugation at 12,000 g for 15 min. Twenty microgram of total cell lysate, determined by the BCA kit, were run on 10% SDS-PAGE and electrophoretically transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, USA). The membrane was blotted with antibodies to p-mTOR, p-p70S6K, p-4E-BP1, p-AKT, p-PI3K, p-

PTEN, actin (supplemental data 1) in PBS, 0.05% Tween 20, and 3% BSA. Similarly, an unprenylated form of Rap1A was detected by western blot to indirectly quantified farnesyl di-phosphate synthase (FPPS) activity (10). The membrane was washed and probed with the secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. Antibody binding was visualized with the enhanced chemiluminescence system (Roche Molecular Biomedicals). For quantification, the emitted glow was acquired with a CCD camera and analysed with the GeneTools program (Syngene, UK).

Ras isoprenylation and GTP-binding activity

To measure isoprenylated membrane-bound Ras and non-isoprenylated cytosolic Ras, cells were lysed in 1 ml of lysis buffer (50 mM Hepes, 750 mM KCl, 200 mM sucrose, 10 mM NaHCO₃, pH 7.4), supplemented with: protease inhibitor cocktail set III (100 mM AEBSF, 80 mM aprotinin, 5 mM bestatin, 1.5 mM E-64, 2 mM leupeptin and 1 mM pepstatin; Calbiochem, USA), 1 mM NaVO₄, 1 mM NaF, 1 mM 4-(2-Aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride (PMSF), 10 mM aprotinin and 10 mM dithiothreitol), then sonicated (Labsonic

sonicator; Germany) and centrifuged at 13,000 x g for 5 min at 4°C. Supernatants were collected and centrifuged at 100,000 x g for 1 h at 4°C; the cytosolic fraction contained in the new supernatants were collected, whereas the pellets (membrane fraction) were re-suspended in 100 µl of lysis buffer. Thirty microgram of cytosolic fraction and 60 µg of membrane fraction were subjected to 15% SDS-PAGE and western blot analysis, using an anti-Ras antibody (supplemental data 1). The Ras-GTP binding assay was performed as previously described (34). Briefly, cells were lysed in MLB buffer (125 mM Tris-HCl, pH 7.4, 750 mM NaCl, 1% NP40, 10% glycerol, 50 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 25 mM NaF, 1 mM NaVO₄, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml aprotinin and 1 mM PMSF) and centrifuged at 13,000 x g for 10 min at 4°C. An aliquot of supernatant was taken out for determination of protein content (BCA kit). 30 µg of cell lysate were incubated for 45 min at 4°C with the Ras Assay Reagent (Raf-1 RBD, GST-tagged Agarose beads, Millipore), then the beads were washed and re-suspended in 20 µl Laemmli buffer (125 mM Tris, 4% w/v SDS, 20% v/v glycerol and 1% β-mercaptoethanol). The amount of active GTP-bound Ras was detected by

SDS-PAGE and western blotting as reported above.

***In vivo* experiments**

Mice (Elevages Janvier, France) were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators.

Osteoblastic osteosarcoma model:

Four-week-old male C57BL/6J mice were anesthetized by inhalation of a combination Isoflurane/air associated with an i.m. injection of Buprenorphine (Temgésic®, Schering-Plough) before i.m. injection of 2 x 10⁶ MOS-J cells. Tumors appeared in contact with the tibia approximately 8 days later and lead to osteoblastic lesions reproducing the osteoblastic form of human osteosarcoma (33).

Osteolytic osteosarcoma model:

Four-week-old male C3H/He mice were anesthetized as previously described before s.c. inoculation of POS-1 cell suspension (containing 2 x 10⁶ cells) in the hind footpad of the mice. Under these conditions, mice develop a primary tumor at the site of injection in 3 weeks that can be transplanted to mice of the same strain as a small

fragment (2 x 2 x 2 mm) in close contact with the tibia. For this purpose, the periostum of the diaphysis was opened and resected along a length of 5 mm, and the underlying bone was intact. The osteosarcoma fragment was placed contiguous to the exposed bone surface without the periostum, and the cutaneous and muscular wounds were sutured. Tumors appeared at the graft site approximately 8 days later associated with the development of pulmonary metastases in a 3-week period. The tumors that develop in contact to the femora lead to osteolytic lesions that reproduce the osteolytic form of human osteosarcoma (35).

For both models, the tumor volumes (V) were calculated from the measurement of two perpendicular diameters using a caliper according to the following formula: $V = 0.5 \times L \times S^2$, where L and S represent respectively, the largest and smallest perpendicular tumor diameters. Four groups of eight mice each were assigned as controls (placebo by oral administration and PBS injection subcutaneously twice a week), RAD001 (5 mg/kg, oral administration, twice a week), ZOL (100 µg/kg, s.c, twice a week) and RAD001+ZOL (combined treatment with s.c 100 µg/kg ZOL and 5 mg/kg RAD001 oral administration, twice

weekly) groups. Treatment continued until each animal showed signs of morbidity including cachexia or respiratory distress, at which point they were sacrificed by cervical dislocation. Analysis of architectural parameters was done using high-resolution X-ray micro-computed tomography (CT) (SkyScan-1072). Relative volume (BV/TV) of the tibia [total bone (cortical + trabecular) or trabecular bone] was quantified at necropsy on a 6.4 cm length area located between superior metaphysis and diaphysis. Radiographs were taken at the same time (PLANMED Sophie apparatus, Finland). Each experiment was repeated twice and only one set of experiments was shown.

Statistical analysis

Each experiment was repeated independently three times in triplicate. The mean \pm SD was calculated for all conditions and compared by ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. Differences relative to a probability of two-tailed $p < 0.05$ were considered significant.

Results

RAD001 exerts a cytostatic activity on osteosarcoma cells and synergizes with N-BP *in vitro*

RAD001 significantly reduced MG63, OSRGA and POS-1 osteosarcoma cell number in a dose-dependent manner ($p < 0.01$) (IC₅₀: 0.5 nM, 1.26 nM and 45 nM for OSRGA, MG63 and POS-1 cells respectively) with a maximum effect at 100 nM (concentrations tested up to 1 μ M) (Fig. 1A). ZOL strongly diminished the number of MG63, OSRGA and POS-1 cells assessed in a dose-dependent manner (Fig. 1B). Manual counting of viable cells did not evidence cell death in any condition tested, as confirmed by the absence of caspase activity in (data not shown). Time-lapse microscopy revealed that 10 nM RAD001 clearly induced a marked decrease of mitosis in MG63, OSRGA and POS-1 osteosarcoma cells detectable at early times of the treatment (6-11 h) (Fig. 1C). Moreover, osteosarcoma cells treated with RAD001 were not blocked in any phase of the cell cycle, but the cancer cells passed through the different phases at a slightly inferior rate compared to the untreated control (data not shown). These data demonstrate that RAD001 therefore can be considered as a cytostatic drug for osteosarcoma.

Figure 2 clearly shows a significant additive effect between RAD001 and ZOL for MG63, OSRGA and POS-1 cells (Fig. 2A) ($p < 0.001$). In contrast to the combination RAD001 and risedronate (another N-BP), which induced similar combinatory effect on cell proliferation (Fig. 2B, $p < 0.001$), Clodronate (a non N-BP, 100-500 μ M) did not significantly modulate RAD001 activity. This combinatory effect between RAD001 and ZOL was confirmed by western blot analysis (Fig. 2C) (supplemental data 2). In contrast to treatment with 1 nM RAD001 which had no effect on the mTOR signaling pathway, 10 nM RAD001 significantly inhibited the mTOR signaling pathway in POS-1 and OSRGA cells, as revealed by a decrease of mTOR phosphorylation, but not in MG63 osteosarcoma cells (Fig. 2C). 1 μ M ZOL did not affect mTOR signaling (Fig. 2C). Interestingly, the combination of 10 nM RAD001 and 1 μ M ZOL totally abolished P-mTOR and drastically inhibited its main downstream signaling partners, demonstrating a crosstalk between ZOL and mTOR signaling pathways in all MG63, OSRGA and POS-1 cells (Fig. 2B). Treatment of cells with 1 μ M ZOL did not alter unRAP1A expression, as did treatment with higher doses (data not shown, 10).

Furthermore, the combination of RAD001 with ZOL strongly reduced P-PI3K, down-regulated the phosphorylation of PTEN in MG63, OSRGA and POS-1 cells and also altered AKT phosphorylation in POS-1 cells (Fig. 2C). Consequently, this combination dysregulated the mTOR downstream signaling and decreased the phosphorylation of 4EBP1 in the three cell lines assessed (Fig. 2C). p70S6K was decreased in MG63 and OSRGA and slightly in POS-1 cells (Fig. 2C).

Combined treatment with RAD001 and ZOL is efficient on RAD001 resistant-osteosarcoma cells *in vitro*

Mouse osteosarcoma MOS-J is totally refractory to RAD001 (up to 1 μ M tested) and ZOL (up to 10 μ M, 100 μ M being cytotoxic) (Fig. 3A). Interestingly, combination of RAD and ZOL at low doses induced a synergistic anti-proliferative effect on MOS-J cells (Fig. 3B, $p < 0.001$). The biological activity of RAD001 in MOS-J cells was demonstrated by western blot analyses. Indeed, 10 nM RAD001 decreased the phosphorylation of PI3K, PTEN, Akt, mTOR, P-4EBP1 and P-p70S6K (Fig. 3C) without any effect on MOS-J cell proliferation (Fig. 3B). Although ZOL alone did not also modulate these activities, ZOL

and RAD001 exert an additive effect to strongly inhibit mTOR signaling (Fig. 3C).

Ras-prenylation is strongly decreased by the combined treatment with RAD001 and ZOL

Ras is located at the crossroads between ZOL and mTOR signaling pathways. Indeed, ZOL is a powerful inhibitor of FPPS activity implicated in the prenylation of small GTPases (7, 13), and the PI3K/mTOR pathway belongs to the downstream cascades of Ras activation. In this context, we first analyzed the effects of the ZOL and RAD001 combination on Ras isoprenylation (Fig. 4). 1 μ M ZOL induced a significant decrease of isoprenylated membrane-bound Ras and a concomitant increase of non-isoprenylated cytosolic Ras in all osteosarcoma cell lines tested, in contrast to 1 or 10 nM RAD001 which had no effect on Ras isoprenylation (Fig. 4A). The combined treatment of RAD001 with ZOL induced a marked decrease of Ras isoprenylation (Fig. 4A). Simultaneously, this combination reduced Ras bound to GTP (Fig. 4A). To determine the role of Ras activity in the additive effect of RAD001 and ZOL, the effect of Manumycin A, an inhibitor of Ras farnesylation, was assessed on osteosarcoma cell proliferation in

combination with RAD001 (Fig. 4B). In all osteosarcoma cell lines tested (sensitive and resistant to RAD001), Manumycin A and RAD001 exert an additive effect in inhibiting cell proliferation thus mimicking ZOL activity (Fig. 4B, $p < 0.001$).

The combination of RAD001 and ZOL reduces the growth of osteosarcoma cells in syngeneic murine models

Preliminary dose-response experiments were carried out *in vivo* to determine the sub-optimal efficient doses of RAD001 and ZOL (data not shown). The ZOL dose (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ZOL as research grade disodium salt) used in the present study is equivalent to the clinical dose of 4 mg IV every 3–4 weeks. However, even if dosing frequency of twice a week is greater, these doses are justified by the very aggressive nature of the osteosarcoma models used and the short animal survival. Both drugs did not exert any side-effects on animal body weight loss or any toxic effects in MOS-J and POS-1 osteosarcoma models.

The *in vivo* effects of single- or combinatory treatment on tumor growth were first studied in a MOS-J osteosarcoma model, cells which are resistant to both agents *in vitro*. Doses of 5 mg/kg RAD001 or 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ZOL were chosen for the

subsequent combination experiments because they had no significant effect alone on tumor growth, as compared to the control group (Fig. 5A,B). RAD001 and ZOL combination reduced the tumor volume compared to single treatment (Fig. 5A, $p < 0.001$). The relative tumor progression calculated between day 19 and day 31 confirmed the synergistic action between RAD001 and ZOL (Fig. 5B). Interestingly, combined treatment of RAD001 and ZOL significantly slowed down the tumor progression compared to a single treatment and to the control group (Fig. 5B). Furthermore, radiographs revealed that 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ZOL strongly reduced bone degradation (Fig. 5C) even if it had no effect on the tumor progression (Fig. 5A, B). Indeed, the metaphyses of long bones exhibited high bone density reflecting inhibition of bone resorption and retention of the primary spongiosa in contrast to 5 mg/kg RAD001, which had no protective effect of bone loss (Fig. 5C). The combination of RAD001 with ZOL had no additive inhibitory effect of bone resorption as compared to ZOL alone. By combining micro-CT image registration, the bone remodeling associated with osteosarcoma development has been followed and confirmed the radiographic analysis (Fig.

5D). One hundred $\mu\text{g}/\text{kg}$ ZOL and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ZOL + 5 mg/kg RAD001 significantly increased bone mass in contrast to 5 mg/kg RAD001 alone. This was confirmed by the quantification of relative bone volume (BV/TV). Indeed, BV/TV increased by approximately 40% in the presence of ZOL and ZOL + RAD001 compared to the control group (Fig. 5D, $p < 0.001$). RAD001 and ZOL induce additive effects on tumor development and reduce the growth of resistant- MOS-J osteoblastic osteosarcoma cells in syngeneic mice.

Similar experiments were carried out using an osteolytic-POS-1 osteosarcoma model (35). Five mg/kg RAD001 had no effect on POS-1 tumor growth compared to the control group (Fig. 6B). ZOL slightly but not significantly reduced the tumor volume (Fig. 6A, B) but markedly decreased bone degradation as shown by an increase of bone mineral density of the metaphysis (Fig. 6C). Contrarily, 5 mg/kg RAD001 alone had no effect on tumor-induced osteolysis, and the combination of RAD001 with ZOL had no additive inhibitory effect of bone resorption as compared to ZOL alone (Fig. 6C). Interestingly, RAD001 and ZOL in combination significantly decreased the tumor volume compared to the control, as

well as to single treatments (Fig. 6A). Such combination treatment slowed down the tumor progression (Fig. 6B, $p < 0.001$). Micro-CT analysis confirmed the significant impact of ZOL on osteolysis with an increase in BV/TV (Fig. 6D). The combinatory treatment clearly improved the quality of bone tissue compared to the control group and the single treatments (Fig. 6D).

Discussion

The absence of response of patients suffering from osteosarcoma to chemotherapy and the lack of effectiveness of single-drug therapy led to the development of new therapeutic approaches. Indeed, therapy based on combinatorial drug regimens targeting different metabolic pathways would prevent the emergence of resistance phenomena and increase the effectiveness of treatment while reducing toxicity for patients (36). Dysregulation of the PI3K/mTOR pathway, mainly due to redundant autocrine pathways rather than mutations, is clearly involved in the pathogenesis of sarcomas. mTOR is a central crossroads of many signaling pathways induced by growth factors and nutritional status and this crossroad is deregulated in numerous cancer cells (36). It

directly and indirectly controls many cellular events such as translation, transcription and protein stability and regulates cell growth, proliferation, survival and cell size (37). In this context, its functions have positioned mTOR as a potential target for cancer therapy and have stimulated the development of selective inhibitors of mTOR complexes (13). mTOR inhibitors have been already assessed in numerous malignancies (20) but only few data have been published on osteosarcoma.

The present work demonstrates the therapeutic interest of a rapamycin analogue, RAD001. RAD001 slowed down cell cycle phases in all osteosarcoma cell lines studied, but in absence of a cell cycle arrest or increase of cell death, this effect may be explained by the role exerted by mTOR on protein synthesis. Indeed, protein synthesis is regulated by mTOR complex 1 [composed by mTOR, Regulatory Associated Protein of mTOR (raptor) and G-protein subunit-like (G L)] which phosphorylates several substrates including ribosomal S6 kinase (S6K) and the eukaryote initiation factor 4E binding protein-1 (4EBP-1) (38). Once activated, S6K phosphorylates the ribosomal protein S6, resulting in the translation of a subset of mRNAs encoding for essential ribosome proteins, including eukaryotic

initiation factor-4B (eIF4B) and increasing translation mechanisms. Similar to other immunosuppressive and chemotherapeutic agents, adverse events related to RAD001 are frequent and lead to moderate dropout rates (39). Interestingly, the combination of RAD001 and ZOL clearly synergized to slow down cell proliferation in all osteosarcoma cells studied, with a marked down regulation of mTOR, 4EBP1 and p70S6K phosphorylation. Thus, this combination may be used to limit the side effects of high drug doses. mTOR signaling is controlled by an upstream signal including PI3K, Akt activation (directly on mTOR or indirectly *via* TSC1/TSC2 complex) and complex feedback inhibitions. Such feedback loops could explain that mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling activating Akt as observed in human breast and prostate carcinoma cells (40), and in OSRGA and MG63 osteosarcoma cells.

Unfortunately, resistance phenomena to rapamycin have been described (41). This is the case for mouse osteosarcoma cells used in the present study which are resistant to RAD001 and rapamycin (data not shown). *In vitro* experiments point out the additive effect between ZOL and RAD001 as revealed by the down-regulation of mTOR

downstream signaling (4EBP1, p70S6K) in RAD001-sensitive and -resistant osteosarcoma cells. ZOL strongly affects the mechanism of prenylation of small GTPases leading to its inhibition (7, 13) (Fig. 7). Indeed, farnesyl di-phosphate and geranylgeranyl di-phosphate are required for the posttranslational lipid modification (prenylation) of small GTPases (i.e. Ras, Rho, and Rac). Among small GTPases, Ras activates the PI3K/mTOR cascade and like mTOR, it plays a central role in the regulation of various cellular processes. However, Ras bound to GTP is able to interact strongly with PI3K (42, 43). In the present work, low doses of ZOL alone or combined with RAD001 decreased the isoprenylated-membrane bound form of Ras and increased the non-isoprenylated cytosolic Ras leading to the decrease of Ras bound to GTP and to the inhibition of the PI3K/mTOR signaling pathway. These data were confirmed by the use of manumycin A which mimicked ZOL activity, clearly evidencing the involvement of Ras (Fig. 7). However, if Ras is potentially involved in the additive activity between ZOL and RAD001, the alterations of other prenylated proteins can be excluded.

The additive effect of ZOL and RAD001 was confirmed in two different

murine osteosarcoma models. Combination of ZOL with RAD001 resulted in a significant down-regulation of tumor progression associated with an increase of bone mass. However, no additive effect on bone the inhibition of bone resorption was evident in histomorphometric analysis confirming that ZOL potentiates RAD001 activity and not the contrary. ZOL also contributed to the decrease of tumor mass by inhibiting osteolysis. The interactions between tumor cells, tumor factors and the bone marrow microenvironment are crucial for the initiation and promotion of skeletal malignancies. These observations suggest a vicious cycle driving the formation of osteolytic bone tumors: tumor cells secrete soluble factors in bone (such as hormones, cytokines and growth factors), which stimulate osteoclastic bone resorption through indirect RANKL production by osteoblastic stromal cells (44).

Overall, these data provide new insights in the molecular crosstalk between mTOR and the mevalonate pathway and underline the therapeutic interest of multidrug treatment combining nitrogen bisphosphonate and mTOR inhibitors in osteosarcoma. The significance of this combination opens new areas in the field of therapeutic multidrug strategies for the

treatment of primary bone tumors, especially in osteosarcoma.

Funding and acknowledgements

This work was supported by a grant from Pharma Novartis (Rueil-Malmaison, France) and by a NIH Cancer Core grant CA34196.

References

1. Rosen G MM, Huvos AG, Gutierrez M, Marcove RC. Chemotherapy, en bloc resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer* 1976;37:1–11.
2. Provisor AJ, Ettinger LJ, Nachman JB, et al. Treatment of nonmetastatic osteosarcoma of the extremity with preoperative and postoperative chemotherapy: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 1997;15:76-84.
3. Kruh GD. Introduction to resistance to anticancer agents. *Oncogene* 2003;22(47):7262-4.
4. Liu WM. Enhancing the cytotoxic activity of novel targeted therapies--is there a role for a combinatorial approach? *Curr Clin Pharmacol* 2008;3:108-17.
5. Gibbs JB, Oliff A. The potential of farnesyltransferase inhibitors as cancer chemotherapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:143-66.
6. Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R, et al. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res* 2000;15:1467-76.
7. Heymann D, Ory B, Gouin F, Green JR, Redini F. Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors. *Trends Mol Med* 2004;10:337-43.
8. Mackie PS, Fisher JL, Zhou H, Choong PF. Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *Br J Cancer* 2001;84:951-9.
9. Terpos E, Sezer O, Croucher PI, et al. The use of bisphosphonates in multiple myeloma: recommendations of an expert panel on behalf of the European Myeloma Network. *Ann Oncol* 2009;20:1303-17.
10. Ory B, Blanchard F, Battaglia S, Gouin F, Redini F, Heymann D. Zoledronic acid activates the DNA S-phase checkpoint and induces osteosarcoma cell death characterized by apoptosis-inducing factor and endonuclease-G translocation independently of p53 and retinoblastoma status. *Mol Pharmacol* 2007;71:333-43.
11. Ottewell PD, Monkkonen 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.
12. Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann MF, Coipeau P, Charrier C, et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 2005;37:74-86.
13. Ory B, Moriceau G, Redini F, Heymann D. mTOR inhibitors (rapamycin and its derivatives) and nitrogen containing bisphosphonates: bi-functional compounds for the treatment of bone tumours. *Curr Med Chem* 2007;14:1381-7.
14. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 1975;28:721-6.
15. Foster DA, Toschi A. Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all. *Cell Cycle* 2009;8:1026-9.
16. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006, 124:471-84.
17. Reiling JH, Sabatini DM. Stress and mTOR signaling. *Oncogene* 2006;25:6373-83.
18. Petiot A, Pattingre S, Arico S, Meley D, Codogno P. Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 2002;27:431-41.
19. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 2006;25:6416-22.

20. MacKenzie AR, von Mehren M. Mechanisms of mammalian target of rapamycin inhibition in sarcoma: present and future. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007;7:1145-54.
21. Khariwala SS, Kjaergaard J, Lorenz R, Van Lente F, Shu S, Strome M. Everolimus (RAD) inhibits in vivo growth of murine squamous cell carcinoma (SCC VII). *Laryngoscope* 2006;116:814-20.
22. Wan X, Mendoza A, Khanna C, Helman LJ. Rapamycin inhibits ezrin-mediated metastatic behavior in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Res* 2005;65:2406-11.
23. Cutler C, Antin JH. Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer* 2004;101:1478.
24. Kauffman HM, Cherikh WS, Cheng Y, Hanto DW, Kahan BD. Maintenance immunosuppression with target-of-rapamycin inhibitors is associated with a reduced incidence of de novo malignancies. *Transplantation* 2005;80:883-9.
25. Reddy GK, Mughal TI, Rini BI. Current data with mammalian target of rapamycin inhibitors in advanced-stage renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2006;5:110-3.
26. Haritunians T, Mori A, O'Kelly J, Luong QT, Giles FJ, Koeffler HP. Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 2007;21:333-9.
27. Houghton PJ, Morton CL, Kolb EA, Gorlick R, Lock R, Carol H, et al. Initial testing (stage 1) of the mTOR inhibitor rapamycin by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 2008;50:799-805.
28. Zhou Q, Deng Z, Zhu Y, Long H, Zhang S, Zhao J. mTOR/p70S6K signal transduction pathway contributes to osteosarcoma progression and patient's prognosis. *Med Oncol* 2009; in press.
29. Chawla SP, Tolcher AW, Staddon AP, Schuetze S, D'Amato GZ, Blay JY, Loewy J, Kan R, Demetri GD. Survival results with AP23573, a novel mTOR inhibitor, in patients with advanced soft tissue or bone sarcomas: update of phase II trial. *ASCO Annual Meeting Proceedings. J Clin Oncol* 2007;25 (18S):10076.
30. Jiang BH, Liu LZ. Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment. *Drug Resist Updat* 2008;11:63-76.
31. Klein B, Pals S, Masse R, et al. Studies of bone and soft-tissue tumours induced in rats with radioactive cerium chloride. *Int J Cancer* 1977;20:112-9.
32. Kamijo A, Koshino T, Uesugi M, Nitto H, Saito T. Inhibition of lung metastasis of osteosarcoma cell line POS-1 transplanted into mice by thigh ligation. *Cancer Lett* 2002;188:213-9.
33. 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;16:223-8.
34. Laezza C, Fiorentino L, Pisanti S, Gaggero P, Caraglia M, Portella G, Vitale M, Bifulco M. Lovastatin induces apoptosis of k-ras-transformed thyroid cells via inhibition of ras farnesylation and by modulating redox state. *J Mol Med* 2008;86:341-51.
35. Lamoreux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, Trichet V, 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;67:7308-18.
36. Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:335-48.
37. Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 2002;16:472-87.

38. Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem* 1998;273:14484-94.
39. Sanchez-Fructuoso AI. Everolimus: an update on the mechanism of action, pharmacokinetics and recent clinical trials. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4:807-19.
40. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006;66:1500-8.
41. Kim SH, Zukowski K, Novak RF. Rapamycin effects on mTOR signaling in benign, premalignant and malignant human breast epithelial cells. *Anticancer Res* 2009;29:1143-50.
42. Kiel C, Filchtinski D, Spoermer M, Schreiber G, Kalbitzer HR, Hermann C. Improved binding raf to Ras.GDP is correlated with biological activity. *J Biol Chem* 2009;284:319893-902.
43. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:541-55
44. Wittrant Y, Theoleyre S, Chipoy C, et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1704:49-57.

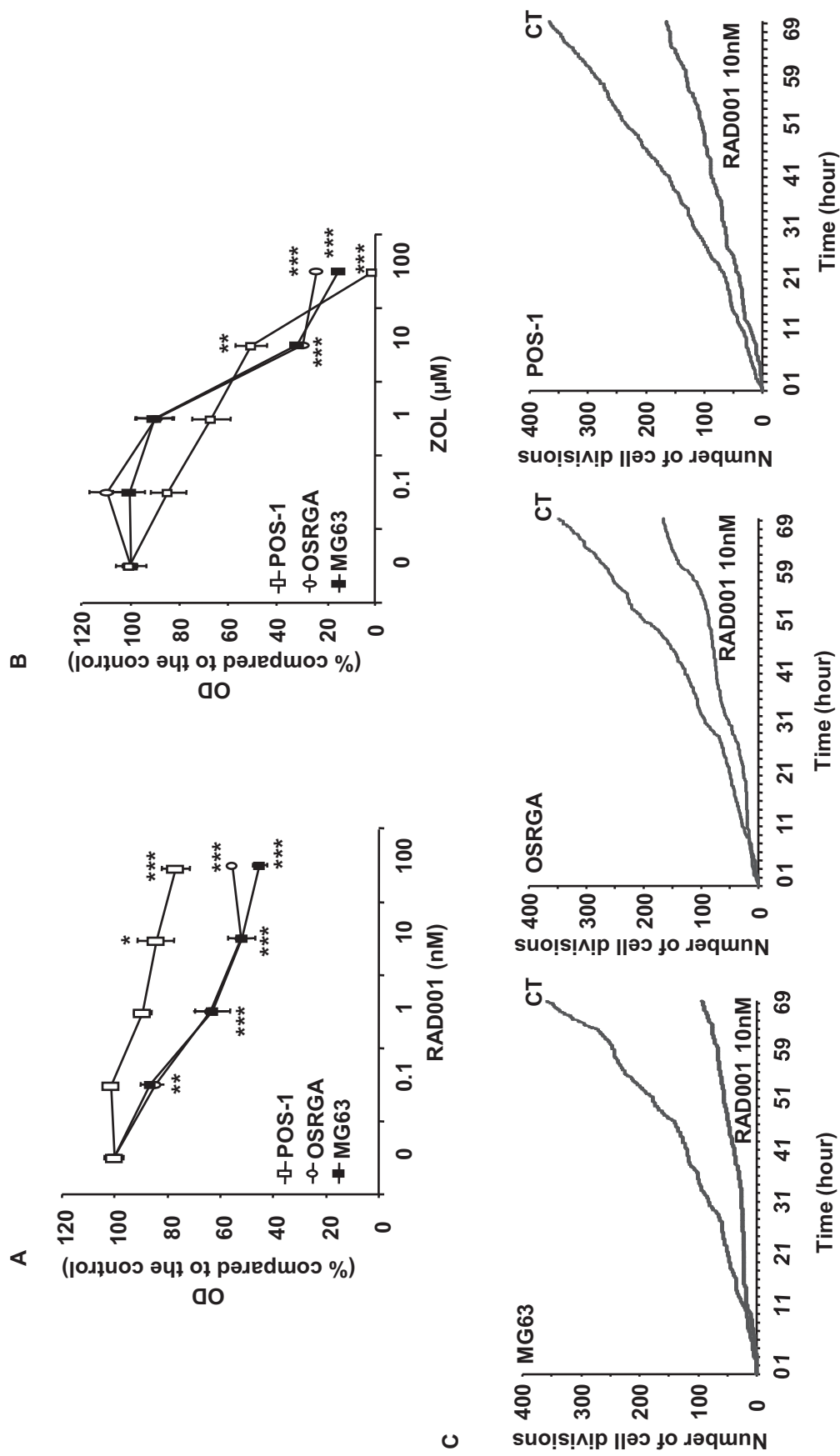


Figure 1: ZOL and RAD001 differentially affect osteosarcoma cell proliferation. Viability of osteosarcoma cells treated with RAD001 (A) or ZOL (B) for 72 h, Mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to the control. (C) Kinetic of cell divisions analyzed by time-lapse microscopy with or without 10 nM of RAD001.

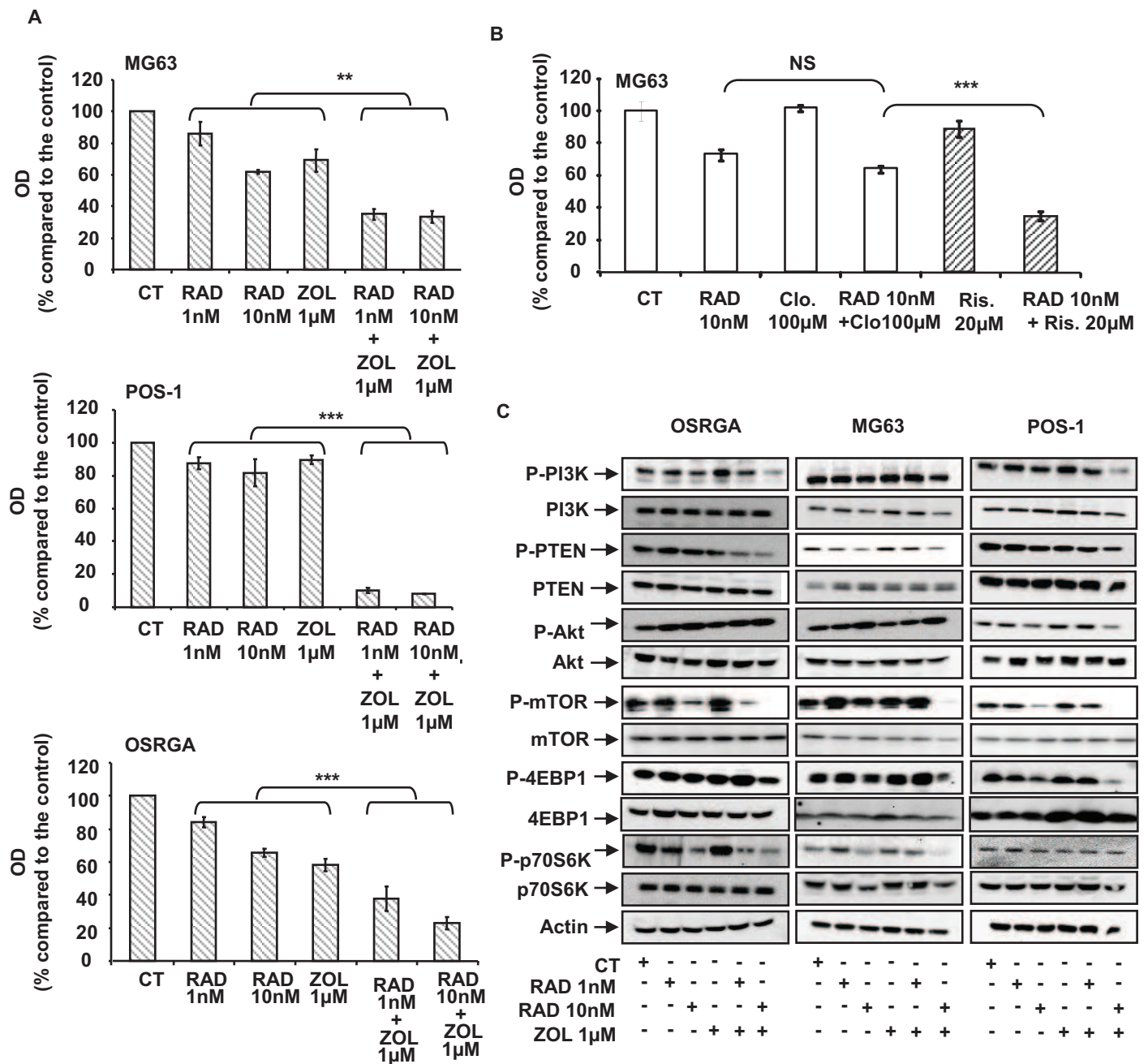


Figure 2: ZOL and RAD001 crosstalk: ZOL potentiates the RAD001 inhibition on osteosarcoma cell proliferation. (A) Viability of osteosarcoma cells treated with 1 µM ZOL combined or not with 1 or 10 nM RAD001 for 72h. (B) Viability of MG63 cells treated with 10 nM RAD001 combined or not with 100 µM clodronate (Clo.) or 20 µM risedronate (Ris.), determined by XTT assay. Graphs represent the mean ± SD of three independent experiments performed in triplicate. *** p < 0.001, NS: not significant. (C) Representative blots of PI3K/mTOR signaling pathways.

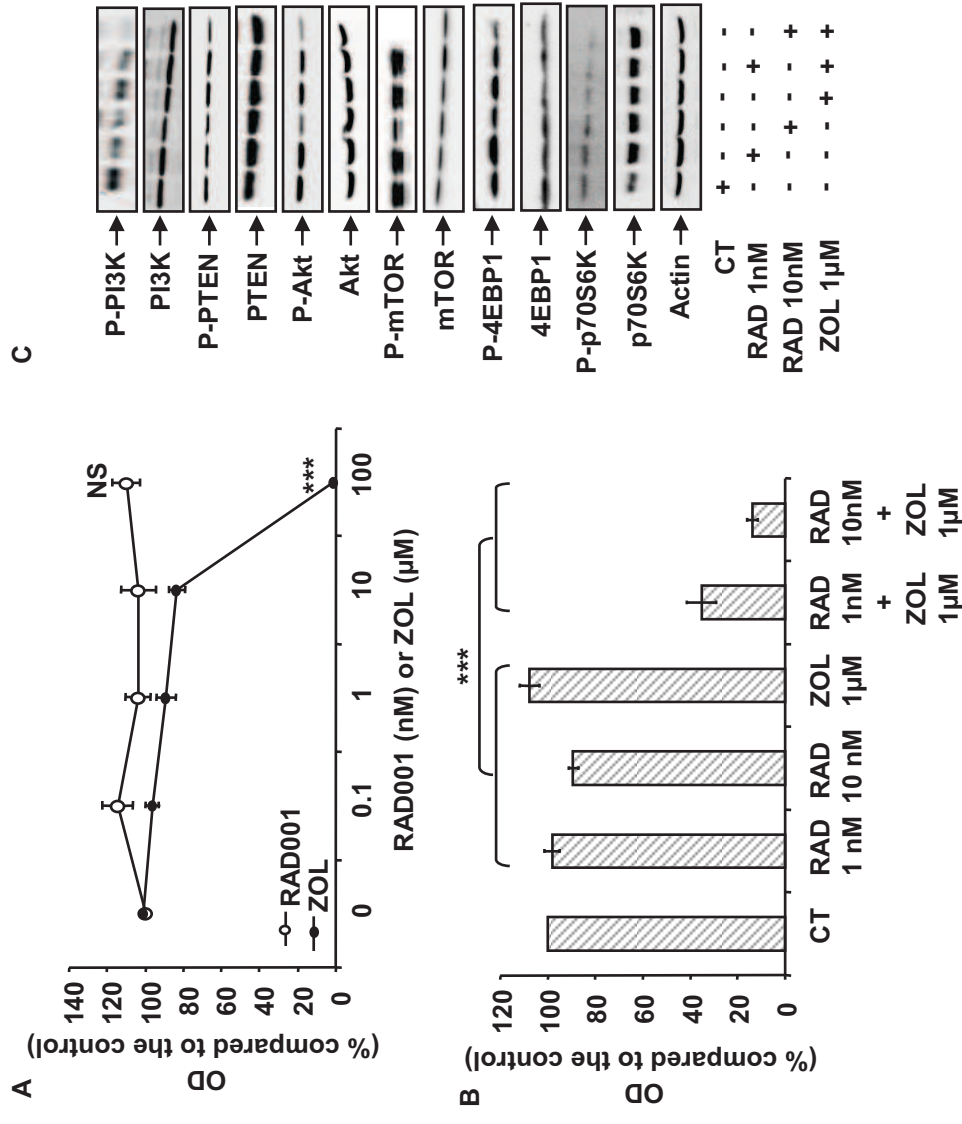
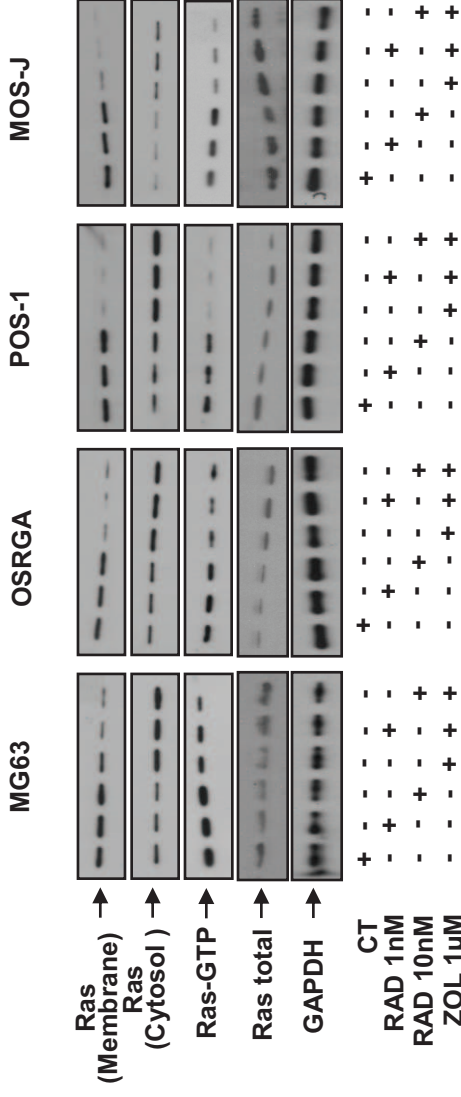


Figure 3: RAD001 and ZOL exert additive effect on the proliferation of resistant-osteosarcoma cells. (A) Number of viable MOS-J cells treated by ZOL (0.1 to 100 μM) or RAD001 (0.1 to 100 nM) or (B) a combination of both agents for 72 h. Graphs represent the mean ± SD of three independent experiments performed in triplicate. *** p < 0.001. (C) Representative blots of PI3K/mTOR signaling pathways.

A



B

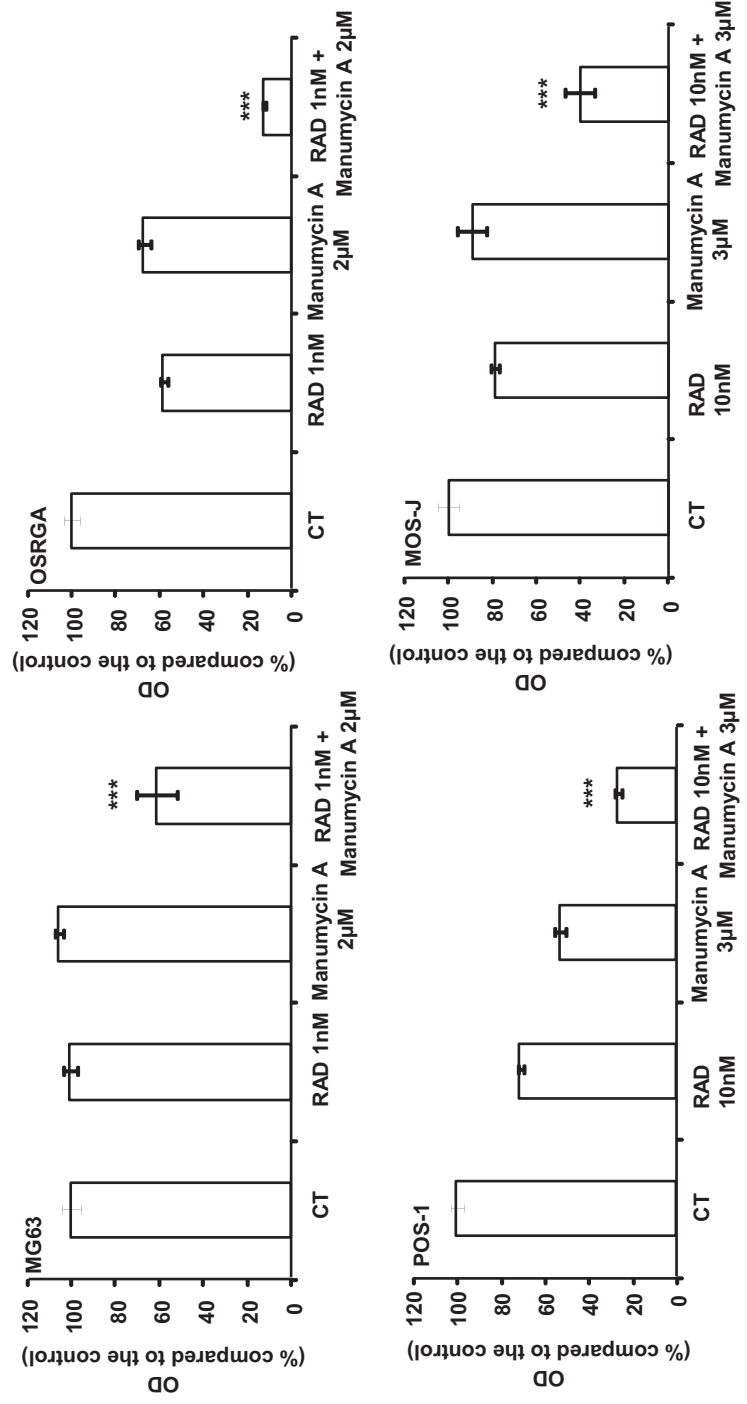


Figure 4: The inhibition of Ras prenylation is involved in the additive effect between RAD001 and ZOL. (A) Representative blot of isoprenylated-membrane bound Ras, non-isoprenylated cytosolic Ras and Ras bound to GTP in osteosarcoma cells treated with 1 µM ZOL combined or not with 1 or 10 nM RAD001 for 72 h. **(B)** Viability of osteosarcoma cells treated for 72h with 1 nM RAD001 in the presence or absence of 2 mM manumycin A. *** p <0.001 compared to single treatment.

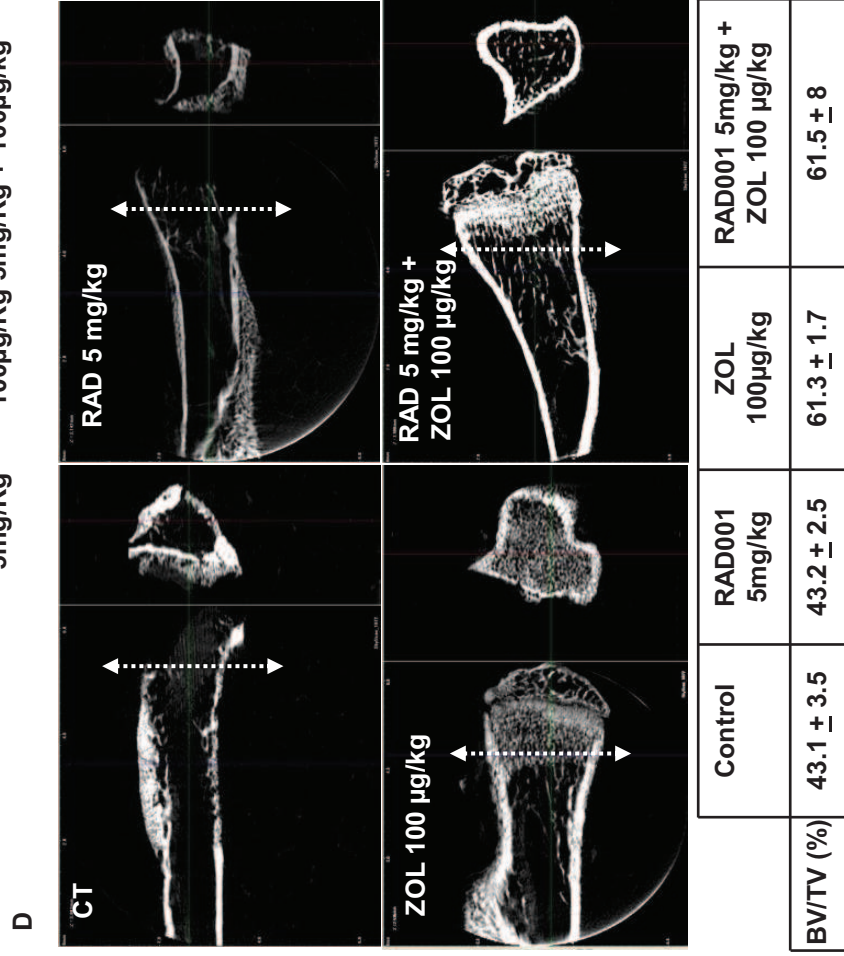
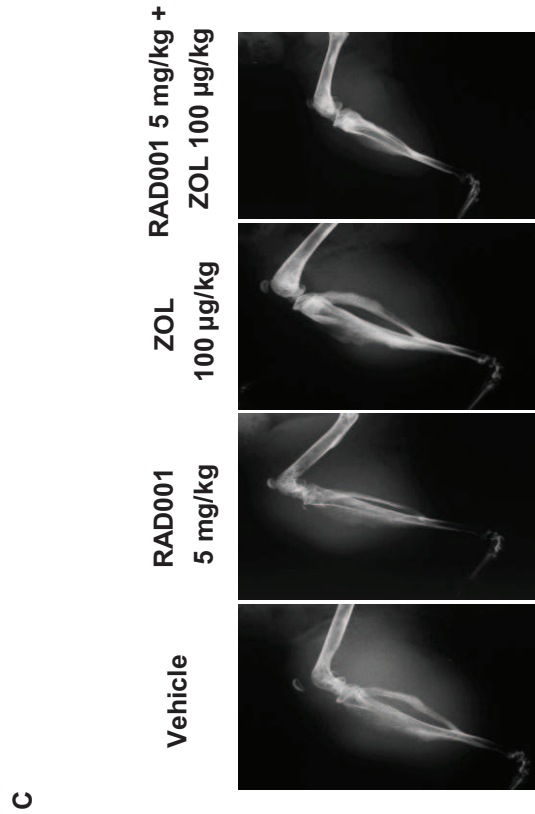
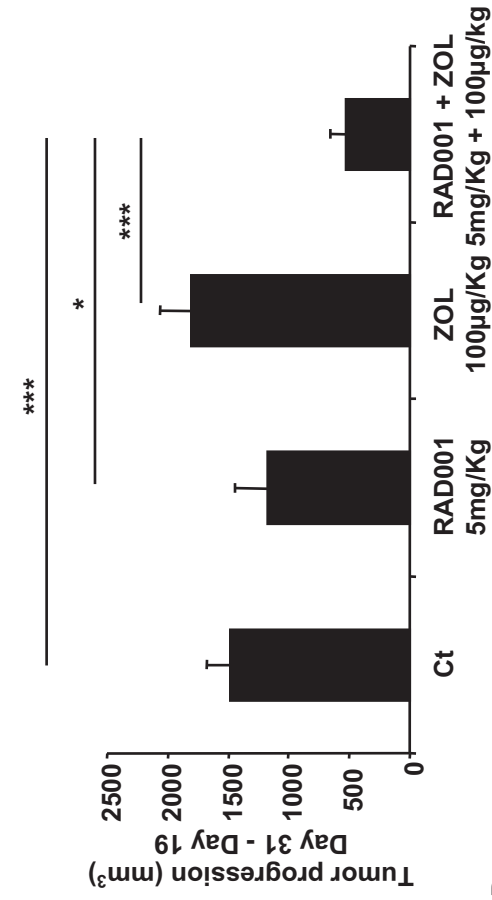
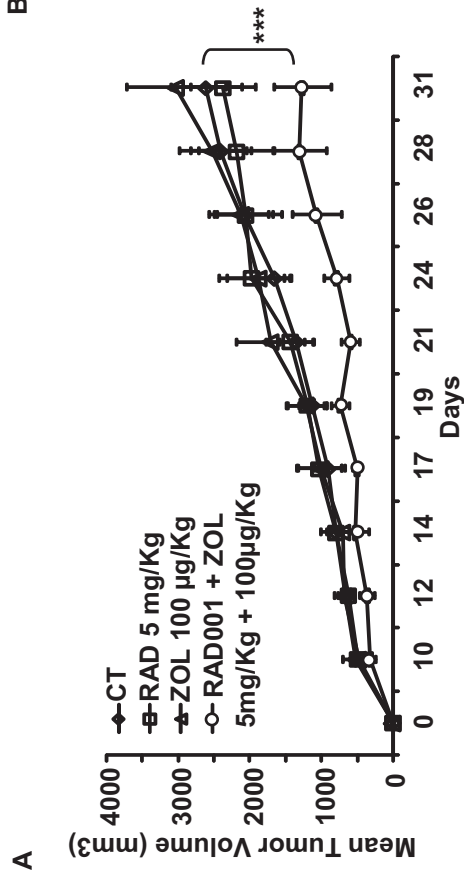


Figure 5: Effect of combinatory treatment of RAD001 with ZOL on the growth of resistant-MOS-J osteosarcoma cells in syngeneic mice. Mice bearing MOS-J tumors (n=8/group) were assigned as CT (vehicle), RAD001 (5 mg/kg, twice weekly), ZOL (100µg/kg, twice a week) or RAD001+ZOL groups. **(A)** Evolution of tumors volumes (V). **(B)** Follow up of tumor progressions. * p < 0.05; *** p < 0.001. **(C)** Radiographs taken at the time of sacrifice. **(D)** micro-CT analyses performed on bones explanted. Bone Volume: BV, Total Volume: TV.

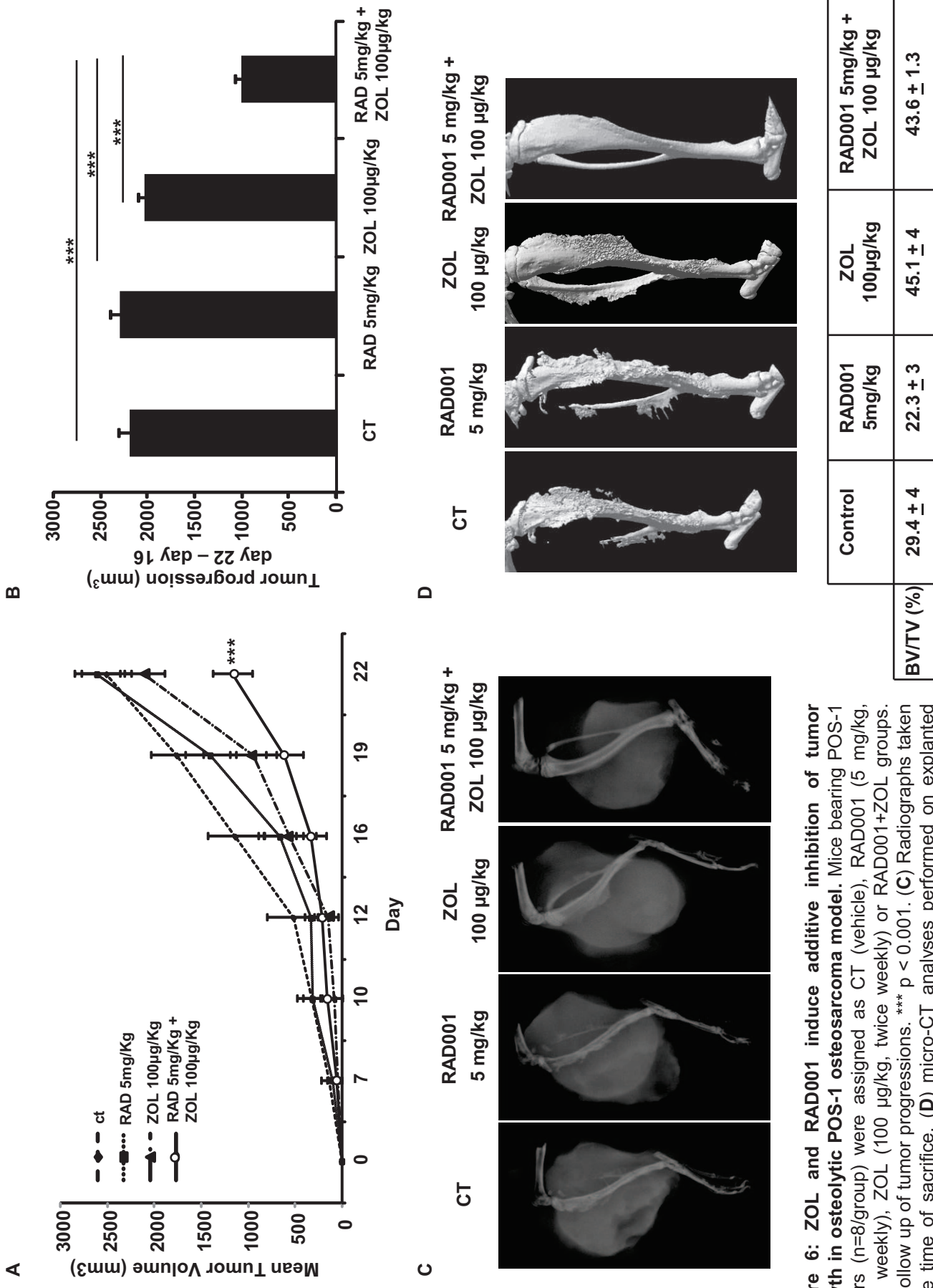


Figure 6: ZOL and RAD001 induce additive inhibition of tumor growth in osteolytic POS-1 osteosarcoma model. Mice bearing POS-1 tumors (n=8/group) were assigned as CT (vehicle), RAD001 (5 mg/kg, twice weekly), ZOL (100 µg/kg, twice weekly) or RAD001+ZOL groups. (A) Follow up of tumor progressions. *** p < 0.001. (C) Radiographs taken at the time of sacrifice. (D) micro-CT analyses performed on explanted bones. Bone Volume: BV, Total Volume: TV.

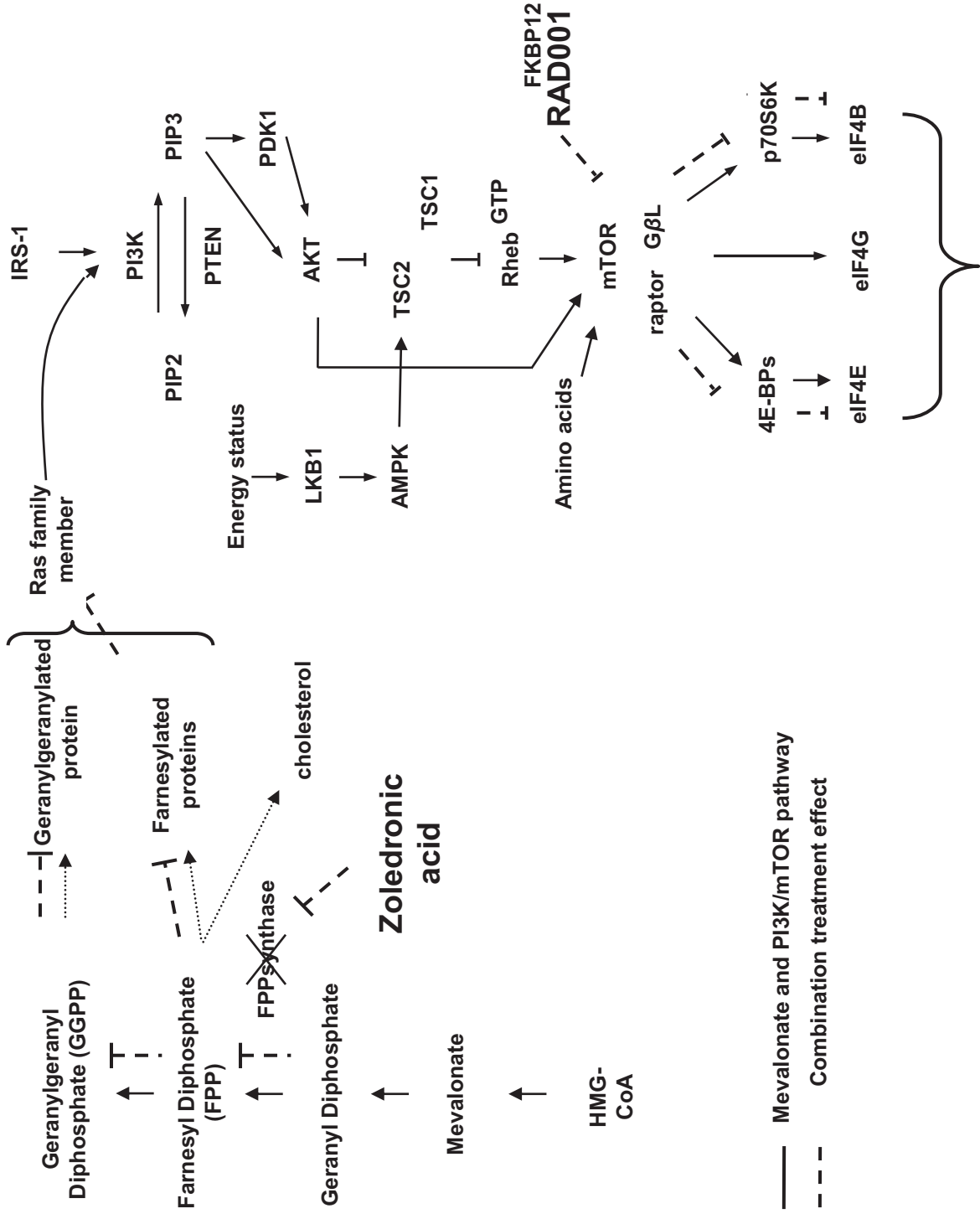


Figure 7: Diagram summarizing the mechanism of action of ZOL and RAD001 on osteosarcoma cells and the crosstalk between mTOR and mevalonate pathways.

- Inhibition of cell proliferation
- Inhibition of protein synthesis

Complément de discussion et perspectives de l'article 2

Les premiers effets des bisphosphonates (BPs) sur le métabolisme calcique ont été découverts il y a une trentaine d'année et ils sont devenus les agents les plus utilisés dans le traitement des pathologies osseuse associées à une forte résorption (ostéoporose, ostéolyse maligne etc...). Les effets anti-tumoraux des BPs contenant un atome d'azote (N-BPs) ont récemment été montrés (Ory et al, 2007). En effet, le ZOL induit une inhibition de la prolifération des lignées cellulaires d'ostéosarcome, un blocage des cellules en phase S/G2M du cycle cellulaire et une mort cellulaire indépendante des caspases (Ory et al, 2007). De part son action sur mTOR, les dérivés de la Rapamycine ont montré une activité anti-tumorale intéressante permettant d'élargir les thérapies actuelles. Dans le cadre de patients atteints de métastases de carcinome rénal en échec sous inhibiteurs des récepteurs TK du VEGF, RAD001 a montré un gain en termes de survie des patients (Ravaud et al, 2010). L'intérêt d'utiliser des molécules à plusieurs activités (ZOL, agent anti-résorptif et à action anti-tumorale et RAD001, agent immunosuppresseur à action anti-tumorale) permet d'élargir leur spectre d'action. Cette combinaison semble d'autant plus prometteuse dans le traitement de l'ostéosarcome que cette pathologie débute toujours par une phase d'ostéolyse importante. Nos résultats attestent d'une potentielle alternative dans le traitement des ostéosarcomes. En effet, notre combinaison a induit une diminution significative de la prolifération cellulaire sans modification de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire ni d'induction d'apoptose. Cet effet antiprolifératif s'accompagne d'une très forte inhibition de la signalisation de la voie PI3K/AKT/mTOR qui gouverne en outre la synthèse protéique où toute la signalisation apparaît presque totalement éteinte après traitement par notre association. Cependant dans deux de nos lignées cellulaires (OSRGA et MG63), une boucle de rétrocontrôle apparaît augmentant l'activité d'AKT, en effet O'reilly et ces collaborateurs ont montré qu'une inhibition de mTOR induisait une phosphorylation d'AKT permettant de compenser l'inhibition de mTOR (O'reilly et al., 2006). De façon surprenante, ce phénomène n'est pas présent dans toutes nos lignées. Les cellules POS-1 et MOS-J ne présentent pas de boucle de rétrocontrôle positif sur AKT. Sachant que c'est mTORC2 qui gouverne ce rétrocontrôle, RAD001 agirait-il sur mTORC2 et permettrait-il dans deux lignées cellulaires d'inhiber cette compensation. De récentes données indiquent que RAD001 est capable d'interférer avec les deux complexes de mTOR : mTORC1 et mTORC2 dans la leucémie myéloïde chronique (Zeng et al, 2007). Quels moyens les cellules mettent-elles en place pour

que mTORC2 ne soit pas inhiber pas les dérivés de la rapamycine ? Cette question soulève beaucoup d'interrogation et pose peut être les limites de l'utilisation des inhibiteurs de mTOR.

La combinaison RAD001 + ZOL n'a cependant pas induit d'ApppI (figure 28), métabolite induit par une très forte inhibition de la FPPs et laisse penser que le ZOL potentialise l'effet du RAD001 et non son contraire.

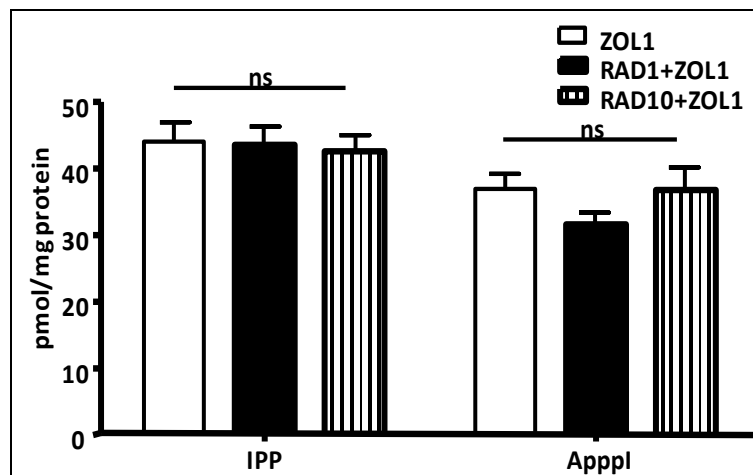


Figure 28 : La combinaison RA001 + Zol n'induit pas d'accumulation d'ApppI, métabolite de la voie du mévalonate.

Les résultats obtenus sur l'activité de mTOR et de 4EBP1 vont dans ce sens car RAD001 inhibe l'activité de mTOR et de 4EBP1 mais pas le Zol et leur association amplifie cette inhibition.

D'autre part, le ZOL synergise l'effet du RAD001 et le lien entre la voie du mévalonate et celle de mTOR s'oriente vers des protéines de la famille des GTPases. En effet, nous avons démontré que le ZOL inhibe l'activité de Ras sans accumulation de forme non prénylées de RAP1A (à 1 μ M de ZOL). Ras étant en lien direct avec PI3K, il semble logique que cette famille de protéine interagisse dans ce traitement combinatoire et permet de potentialiser l'effet de RAD001. Afin de savoir quelle GTPase est directement impliquée dans cette association, des siRNA dirigés contre certaines GTPase pourraient être envisagés et seraient associés ou non au RAD001. En cas de synergie de traitement, des études plus approfondies sur la ou les GTPase impliquées seraient réalisées (figure 29).

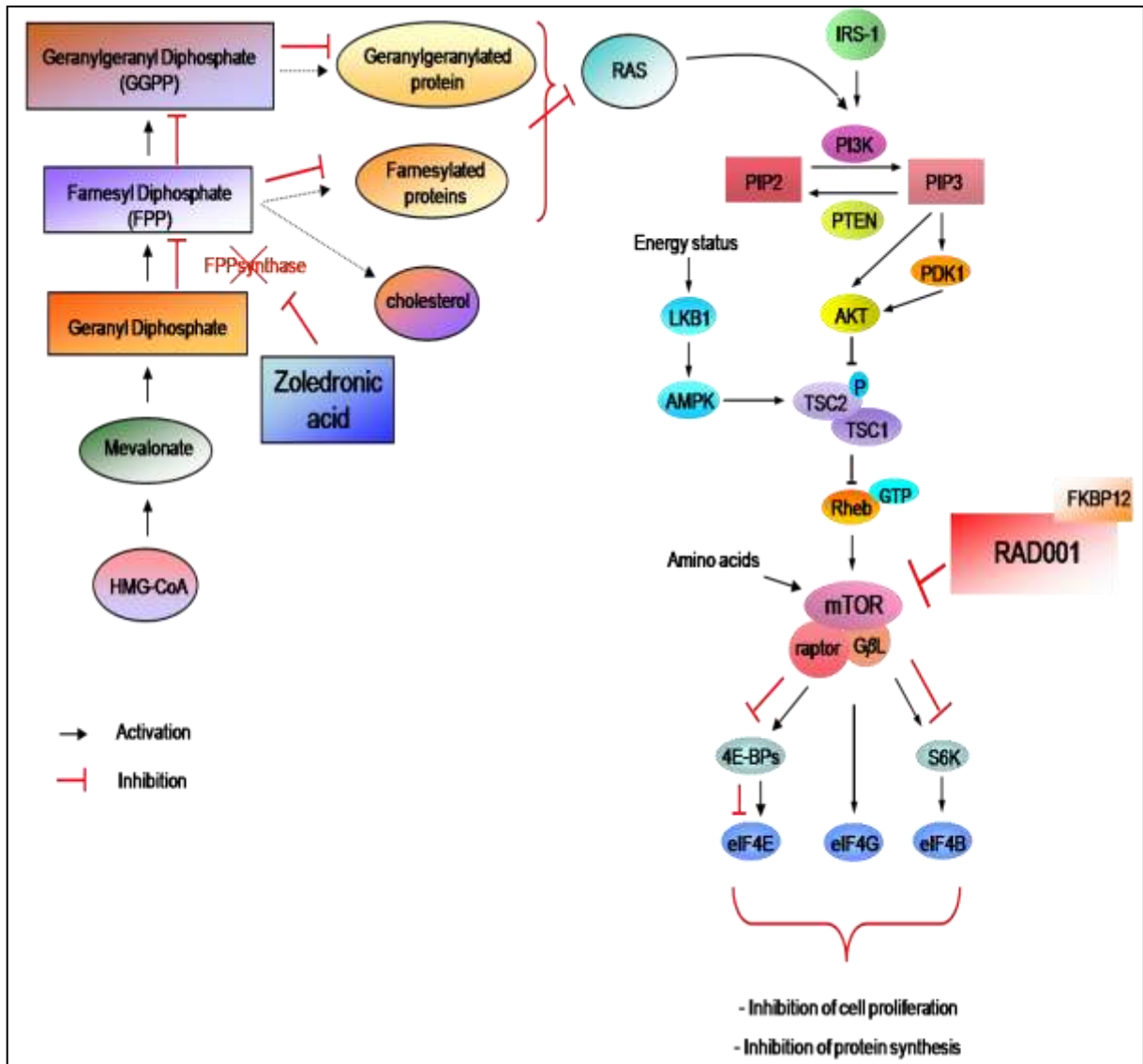


Figure 29 : Ras : Lien entre la voie du mévalonate et de mTOR ; Hypothèse de synergie entre RAD001 et l'acide Zolédronique.

Notre combinaison a aussi montré une diminution significative du volume et de la progression tumorale ainsi qu'une augmentation de la densité osseuse dans deux modèles d'ostéosarcome murin permettant de justifier l'intérêt de cette combinaison. Une large zone de fibrose apparaît lors de ce traitement mettant en exergue une réparation tissulaire plus importante dans les animaux traités par notre association (figure 30).

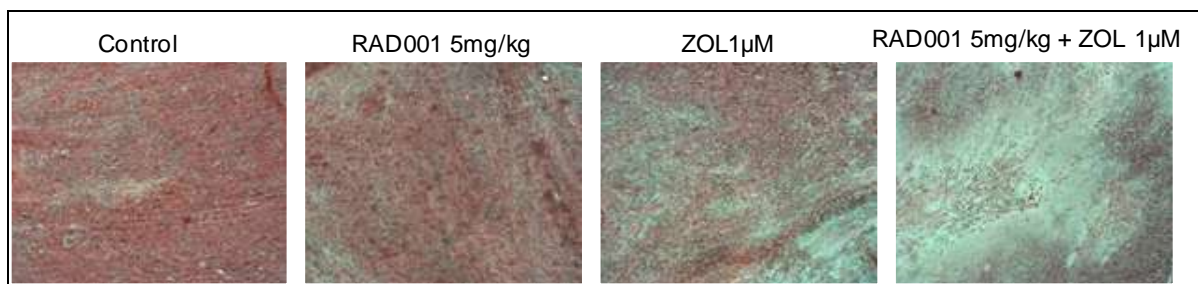


Figure 30 : Coloration au Trichrome de Masson permettant de voir une importante fibrose après traitement de l'association RAD001 + Zol lors d'un modèle d'ostéosarcome murin MOS-J (X20).

Une association avec l'ifosfamide permettrait peut être une régression totale du volume tumorale comme dans le cas de l'association du ZOL avec l'ifosfamide (heyman et al, 2005). Cette combinaison entre le RAD001 et le ZOL a permis de restaurer une sensibilité thérapeutique à ces agents. En effet, les cellules MOS-J sont totalement insensibles aux effets du RAD001 et du ZOL aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, la combinaison des deux agents a permis de réduire significativement la prolifération cellulaire et le volume et la progression tumorale dans un modèle d'ostéosarcome murin. De plus, ayant montré que la classe des bisphosphonates influe sur la synergie entre RAD001 et les N-BPs, une association entre RAD001 et d'autres bisphosphonates azotés ou non permettrait étayer la synergie entre les inhibiteurs de mTOR et ceux de la voie du mévalonate dans un modèle d'ostéosarcome murin.

Mohseni et ces collaborateurs (2010) ont récemment montré qu'une mutation sur KRas, PI3K et sur BRAF seraient de mauvais pronostic pour l'efficacité de RAD001 dans les thérapies anticancéreuses (Mohseni et al., 2010). Les statuts de mutation de KRas ont donc été vérifiés dans les quatre lignées cellulaires étudiées et aucune d'entre elles ne présente une mutation pour KRas. Il serait intéressant de tester notre combinaison sur des lignées avec un KRas muté et dans un modèle d'ostéosarcome présentant cette même mutation. Cette combinaison a induit la surexpression de l'OPG, protéine anti-résorptive permettant d'émettre l'hypothèse que cette association *in vivo* serait appuyée par cette surexpression d'OPG pour améliorer la qualité du tissu osseux (figure 31).

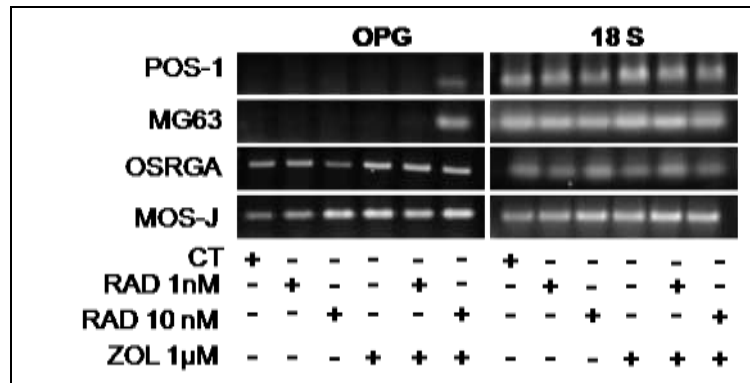


Figure 31 : Surexpression de l'OPG après traitement par notre combinaison.

Un dernier point reste à étudier, à savoir l'effet de cette combinaison sur l'expression de HIF1 α car mTOR gouverne son expression, notre association inhibant drastiquement mTOR, il est logique de penser que la vascularisation sera affectée. Enfin une collaboration avec l'école Vétérinaire de Nantes est en cours pour traiter des chiens atteints d'un ostéosarcome avec cette combinaison. Une étude clinique de phase I est en préparation mais sera peut être limitée par la toxicité rénale de cette combinaison. Au vue des résultats obtenus avec la combinaison entre RAD001 et le Zol dans des modèles précliniques d'ostéosarcome, nous pouvons tester cette combinaison dans d'autres de tumeurs osseuses primitives telles que le sarcome d'Ewing ou le chondrosarcome. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives dans le traitement des ostéosarcomes et s'inscrit dans le cadre des thérapies combinatoires ciblées.

PARTIE III :

**La Lovastatine potentialise l'effet
de l'Apomine et inhibe la
signalisation induite par la HMG-
CoA réductase**

Cette seconde approche thérapeutique des ostéosarcomes repose sur une combinaison médicamenteuse ciblant une même protéine mais avec des mécanismes d'action qui diffèrent, permettant ainsi l'extinction totale de la signalisation induite par cette cible. Dans cette partie, l'Apomine (Apo) et la Lovastatine (Lova) ciblent la HMG-CoA réductase, enzyme clef de la voie du mévalonate.

I. L'Apomine et la Lovastatine inhibent spécifiquement l'enzyme HMG-CoA réductase

Le cholestérol peut être produit de deux manières : par la signalisation induite par la voie du mévalonate ou par la consommation cellulaire de LDL. Le cholestérol est un composant majeur des membranes cellulaires qui contribue à leur stabilité et au maintien de leurs structures en s'intercalant entre les phospholipides (formant la bicouche de la membrane). Il rigidifie la membrane car il empêche sa gélification en évitant la cristallisation des acides gras, et diminue la perméabilité membranaire aux molécules hydrosolubles.

Le cholestérol est également un précurseur de nombreuses molécules :

- la vitamine D₃ qui participe au contrôle du processus de minéralisation du tissu osseux,
- les hormones stéroïdes : cortisol, cortisone, et aldostérone,
- les hormones stéroïdes sexuelles : progestérone, œstrogènes, et testostérone,
- les acides biliaires.

La voie du mévalonate conduit à la synthèse de cholestérol par l'intermédiaire de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-co-enzyme A réductase (HMG-CoA réductase) qui catalyse la conversion du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA en mévalonate. Cette conversion représente la première étape conduisant à la synthèse de cholestérol ainsi qu'à des composés essentiels isoprénoïdes (type terpènes). Le mévalonate ainsi formé produira du géranyl diphosphate qui sera ensuite converti en farnésyl diphosphate et cette voie métabolique produira finalement du géranylgéranyl diphosphate par l'intermédiaire de la farnésyl diphosphate synthase (figure 32). La formation de cholestérol et la prénylation des petites GTPases arrivant lors de ces deux dernières conversions.

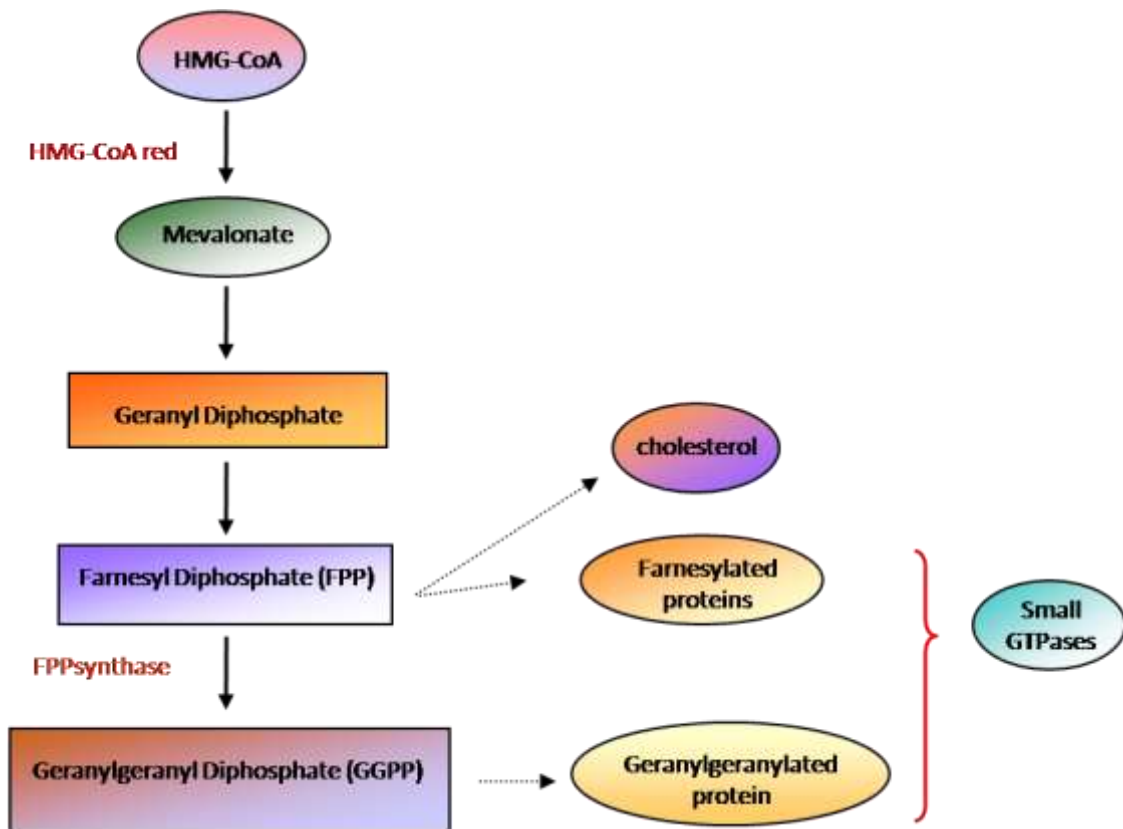


Figure 32 : Voie du mévalonate : synthèse du cholestérol et prénylation des petites GTPases.

Lorsque les cellules ont besoin de cholestérol, les taux de HMG-CoA réductase et de LDLR (Récepteur au Low Density Lipoprotein) augmentent conduisant ainsi la synthèse de composés stérol endogènes et à la consommation de LDL (Brown et al, 1978). La HMG-CoA réductase et les LDLR sont régulés au niveau transcriptionnel par des SREs (Sterol-Regulatory Elements) qui se fixent au promoteur spécifique de leur gène (Goldstein et al, 1990). Ces SRE sont liés à des protéines de fixation et forment des complexes SREBP (SRE binding protein) qui une fois fixés sont emmenés dans le noyau et activent la transcription. Pour déclencher la transcription de ces gènes, les SREBP sont transportés par des vésicules vers le Golgi où un clivage se déroule générant des facteurs de transcription pouvant atteindre le noyau et activer la transcription des gènes cibles. Dans des conditions d'excédant en stérols, le complexe SCAP-SREBP (SCAP : cleavage-activating protein) est retenu dans le réticulum endoplasmique par interaction entre SCAP-SREBP et des protéines du réticulum endoplasmique : Insig-1 ou Insig-2. Ce phénomène de rétrocontrôle permet de réguler la synthèse de cholestérol (Yang et al, 2002). Dans des conditions appauvries en stérol, SCAP

gouverne le passage des SREBP du reticulum endoplasmique au Golgi où ils seront clivés et actifs. Dans des conditions cellulaires appauvries en cholestérol, le taux de HMG-CoA réductase est stable mais dans des conditions en excès de cholestérol, la HMG-CoA réductase est très rapidement dégradée (Nakanishi et al 1988). La HMG-CoA réductase, enzyme de la membrane du réticulum endoplasmique est dégradée par le système ubiquitine-protéasome et pour ce faire, est étiquetée par de multiples chaînes d'ubiquitine.

La voie du mévalonate conduit aussi à la prénylation de petites GTPases telles Ras, Rho ou encore RAP1A sur lesquelles un groupement lipidique prényl lui est transféré. Cette isoprénylation est gouvernée par des enzymes de la voie du mévalonate telles la farnésyl transférase et la géranylgeranyl transférase qui transfèrent ces groupements (Claire et al, 2005). Ces protéines prénylées s'ancrent à la membrane et permettent les interactions membrane-protéines afin d'organiser le cytosquelette. Le rôle central de la voie du mévalonate a été démontré dans de nombreuses études dans lesquelles la production de mévalonate, précurseur du cholestérol et des petites GTPases était bloquée par des inhibiteurs spécifiques de la HMG-CoA réductase tels les statines et l'Apomine (ester de bisphosphonate) (Roelofs et al, 2007).

Les statines telles la Lovastatine (figure 33) sont des inhibiteurs synthétiques de la HMG-CoA réductase et sont des analogues de structures du HMG-CoA.

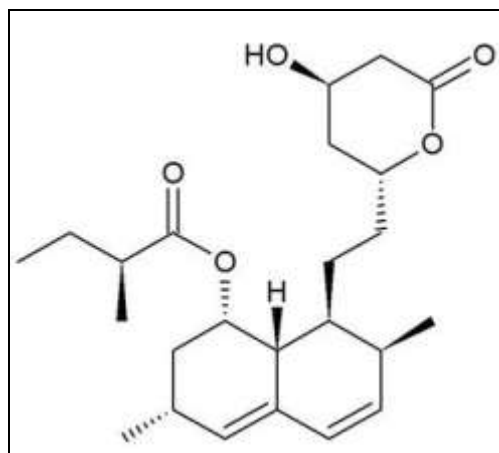


Figure 33 : Formule chimique semi-développée de la Lovastatine

Elles entrent en compétition avec le HMG-CoA pour se fixer avec la HMG-CoA réductase. Les statines ayant une forte affinité pour le site actif de la HMG-CoA réductase, il en résulte une inhibition de l'activité de cette enzyme et une suppression directe de la

biosynthèse du cholestérol. Le traitement par statines est également connu pour augmenter l'expression des récepteurs au LDL dans les hépatocytes conduisant à une clairance du cholestérol dans le sang (Jain et al, 2005). La capacité des différentes statines pour réduire les niveaux de mauvais cholestérol (LDL-cholestérol) a entraîné de nombreux essais cliniques qui ont établi que ces agents réduisent la progression de l'athérosclérose chez l'homme et diminuent l'incidence des épisodes cardiovasculaires chez les patients atteints de maladie coronarienne (CAD) (Cannon et al, 2003). Au-delà de leurs propriétés hypocholestérolémiantes, les statines présentent de nombreuses autres activités biologiques, et cette pléiotropie associée aux statines est responsable de nombreux autres effets bénéfiques de ces médicaments (Ito et al, 2006). Les statines ont montré des propriétés anti-inflammatoires (Schönbeck et al, 2004), des effets antihypertenseur, des effets anti-agrégant plaquettaires et une diminution de la protéinurie (Sassano et al, 2008). Enfin, il a été montré que les statines, *in vitro*, avait un effet anti-néoplasique. Ces effets induisent un arrêt du cycle cellulaire, une inhibition de la prolifération tumorale et une induction de mort cellulaire (Keyomarsi et al, 1991 ; Jones et al, 1994).

Une autre classe de molécule inhibe la HMG-CoA réductase, il s'agit des esters de bisphosphonate tel l'ApomineTM (SR-45023, (tetra-iso-propyl 2-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) ethyl-1,1-diphosphonate)) (figure 34) qui diminue les taux de HMG-CoA réductase et réduit la synthèse endogène de cholestérol.

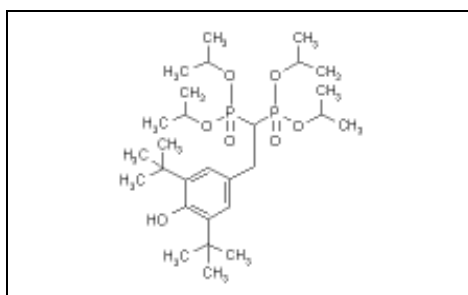


Figure 34 : Formule semi-développée de l'ApomineTM

De plus, l'Apomine induit une augmentation de l'activité du LDLR et accélère la clairance du LDL dans le sang. L'Apomine, analogue du SR-12813, abaisse l'état d'équilibre de la HMG-CoA réductase par un renouvellement rapide qui ne requiert pas d'activité catalytique de la HMG-CoA réductase et n'implique pas son domaine cytoplasmique. Ce processus dépend entièrement de la région transmembranaire de la HMG-CoA réductase,

nécessite la synthèse des protéines et est médiée par la voie ubiquitine-protéasome pour éliminer cette enzyme. Au vue de son action, l'Apomine paraît mimer le 25-hydroxycholestérol (25HC), puissant stimulateur de la dégradation de la HMG-CoA réductase. L'Apomine et le 25HC apparaissent utiliser des mécanismes distincts pour induire la dégradation de la HMG-CoA réductase. Le 25HC inhibe l'activation protéolytique de Site-1 et 2 sur SREBP empêchant alors SREBP d'aller dans le noyau et d'activer l'expression de gènes cibles (Roitelman et al, 2004) (figure 35).

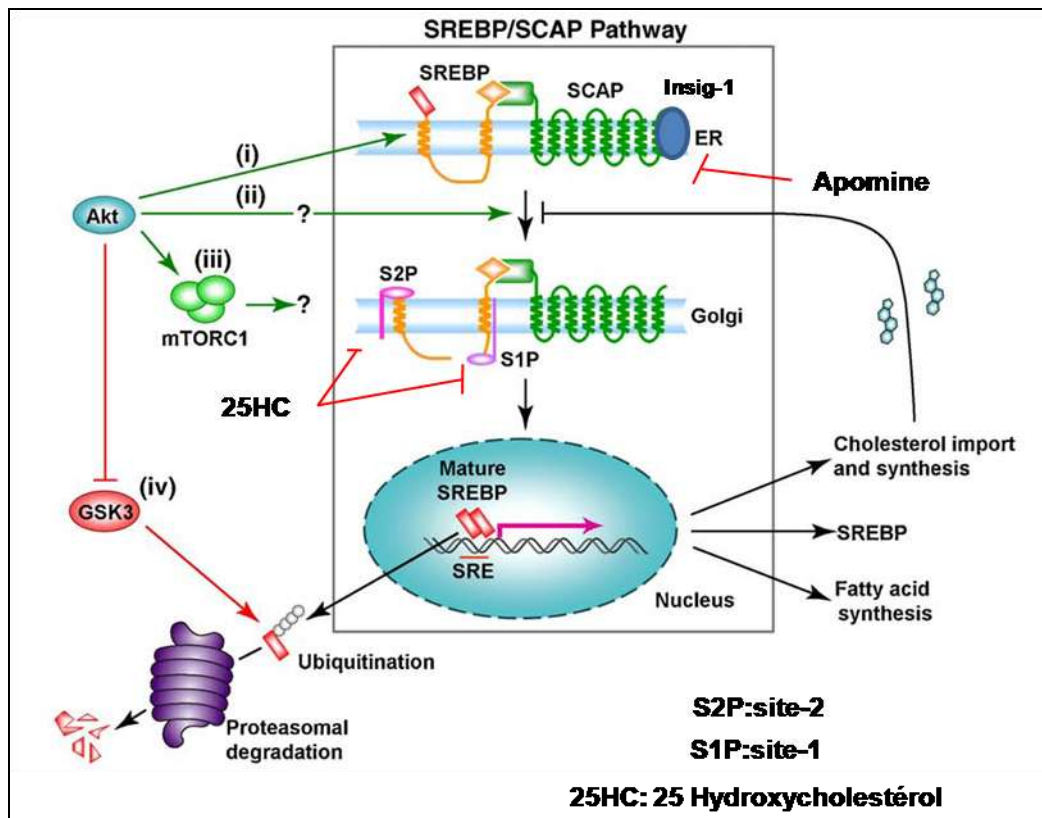


Figure 35 : Effet du 25HC et de l'apomine sur la translocation de SREBP, facteur de transcription de la HMG-CoA réductase (adapté d'après Krycer, 2010).

L'Apomine affaiblit l'interaction Insig-SCAP/SREBP et tendrait à promouvoir le passage de ce complexe du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi. Cependant, la fixation à Insig-1 a été montrée comme importante pour la dégradation de la HMG-CoA réductase en réponse aux stérols (Sever et al, 2003). L'interaction entre Insig-1 et la HMG-CoA réductase semble être médiée par le « sterol-sensing domain », domaine présent sur la HMG-CoA réductase (Sever et al, 2003). En accélérant la dégradation de la HMG-CoA réductase, il va de soi que l'Apomine, renforce les interactions entre le domaine de la membrane de cette enzyme et Insigs (figure 36).

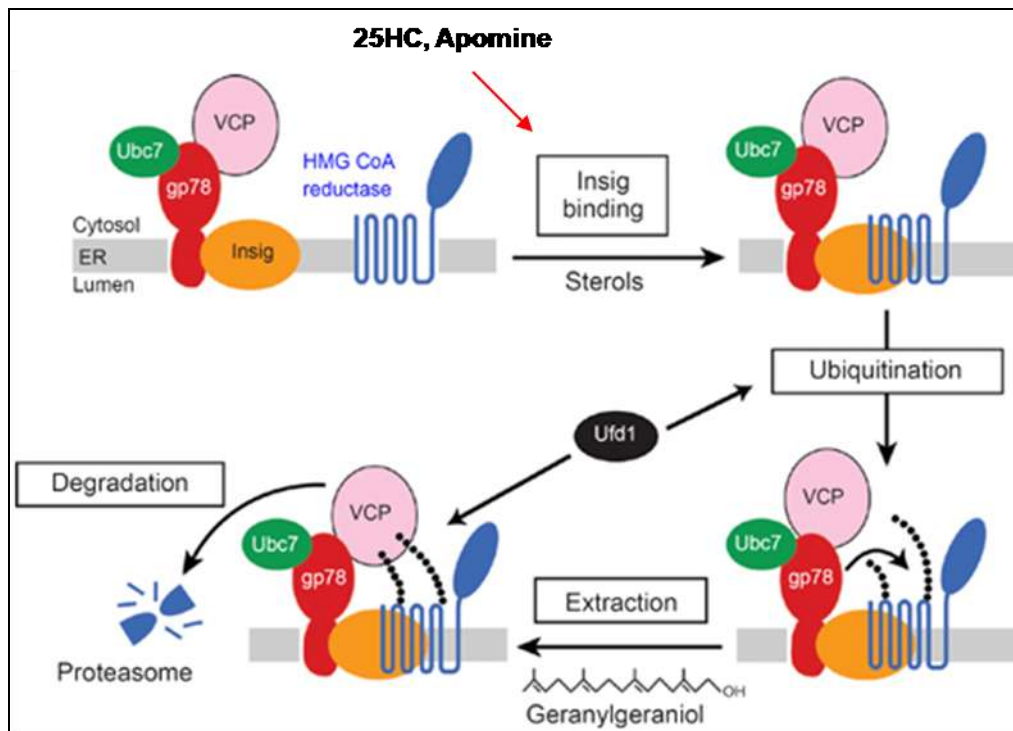


Figure 36 : Effet de l'Apomine et du 25HC sur la relation Insig/HMG-CoA réductase (Russell, 2008). L'accumulation de 25HC ou d'Apomine induit la fixation du complexe [gp78, Ubc7 (ubiquitine ligase)/ VCP (ATPase qui permet l'extraction de la HMG-CoA réductase après son ubiquitination)/ Insig] à la HMG-CoA réductase. L'enzyme ubiquitinisée par gp78 et Ubc7 et extraite par VCP sera délivrée au protéasome pour être dégradée.

Dans l'ensemble, il apparaît que l'Apomine exploite différentes propriétés des protéines à domaine « stérol-sensing domain » et affecte différemment leurs interactions avec Insigs: elle augmente l'affinité de la HMG-CoA réductase à Insig-1, conduisant au « turnover » rapide de la HMG-CoA réductase, mais diminue l'affinité de SCAP à Insig-1, permettant la circulation des précurseurs SCAP-SREBP du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi.

Il a été montré récemment que m'apomine présentait une activité anti-tumorale sur des cellules du myélome multiple (Edwards et al, 2007) et sur des cellules du mélanome (Pourpak et al, 2007) bien que les données de la littérature ne soient pas très abondantes. L'Apomine induirait une inhibition de la prolifération cellulaire, une mort cellulaire et une modulation du myélome *in vivo* (Edwards et al, 2007). La voie du mévalonate semble donc être une voie importante dans le métabolisme cellulaire et certaines protéines comme la farnésyl diphosphate synthase et la HMG-CoA réductase deviennent des cibles thérapeutiques

novatrices. L'Apomine et la Lovastatine s'intègrent parfaitement dans cette stratégie au vue de leur mécanisme d'action différent mais complémentaire sur la HMG-CoA réductase (figure 37).

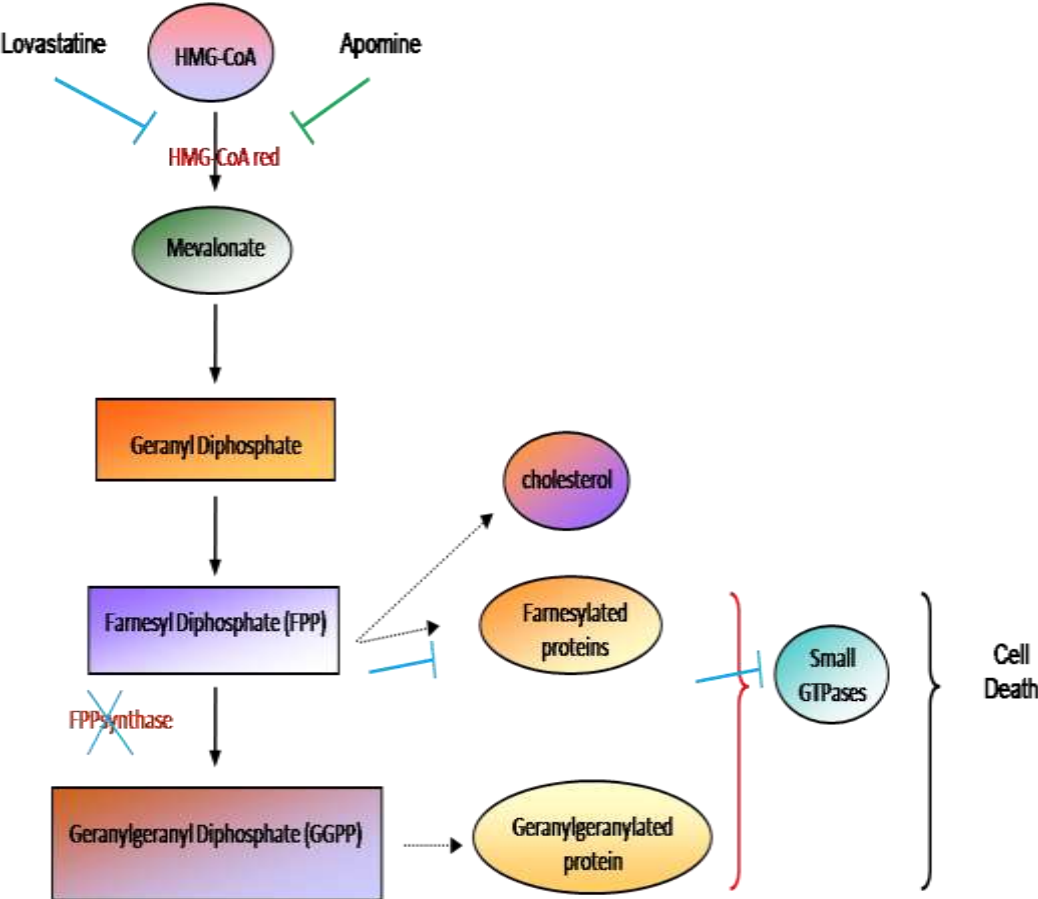


Figure 37 : Effets de la Lovastatine et de l'Apomine sur la HMG-CoA red, enzyme clef de la voie du mévalonate (Moriceau et al, 2010).

Article 3

« L'Apomine potentialise l'effet de la lovastatine sur des cellules d'ostéosarcome et diminue la progression tumorale *in vivo* »

En préparation : Moriceau Gatien, Roelofs Anke, Brion Régis, Ebetino Franck, Rédini Françoise, Rogers Mike, Heymann Dominique.

Edwards (2007) et Pourpak (2007) ont montré l'efficacité *in vitro* de l'Apomine sur des lignées de myélome multiple et de mélanome. La monothérapie induit souvent des résistances métaboliques par l'apparition d'une mutation sur la protéine cible (Stegmeier et al, 2010). Afin de contrôler l'acquisition potentielle de résistance et d'améliorer les traitements, une stratégie combinatoire ciblée a été envisagée. Cette étude porte sur l'utilisation de l'Apomine, ester de bisphosphonate, en association avec la Lovastatine. En effet l'Apomine augmente le taux de dégradation de la HMG-CoA réductase impliquée dans la voie du mévalonate et diminue la biosynthèse du cholestérol. La Lovastatine, qui affecte la voie du mévalonate par inhibition de la HMG-CoA réductase, empêche la prénylation des petites protéines G et la synthèse du cholestérol. Ces deux molécules inhibant la HMG-CoA réductase avec des mécanismes différents mais complémentaires conduisent à l'extinction totale de la signalisation induite par cette enzyme, cette combinaison s'intègre dans les thérapies combinatoires ciblées.

La combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine a un effet synergique sur l'inhibition de la prolifération des cellules d'ostéosarcome. Cette combinaison engendre la diminution de la HMG-CoA réductase et l'accumulation de la forme non prénylée de RAP1A (reflet de l'inhibition de la voie du mévalonate). De plus, cette combinaison induit également une activation de la caspase 3, prémice de l'apoptose et un blocage des cellules en phase G0 du cycle cellulaire, appuyé par une augmentation des « checkpoints » du cycle cellulaire p27 et p21 et une diminution significative de l'activité de Rb. Par ailleurs, l'ajout du Mévalonate, du Phosphatidylcholine et du Géranylgeraniol compensent en partie l'effet de cette association. La forme non prénylée de RAP1A n'est plus accumulée et l'activation de la caspase 3 très fortement réduite. Enfin, cette combinaison a permis dans un modèle d'ostéosarcome murin, de diminuer significativement le volume et la progression tumorale.

Ce travail démontre l'effet synergique *in vitro* et *in vivo* des inhibiteurs complémentaires de la HMG-CoA red et donne une nouvelle alternative dans le traitement des ostéosarcomes.

Apomine potentiates the effect of Lovastatin on osteosarcoma cell growth and decreases the tumoral progression

^aMoriceau G, ^bRoelofs A.J, ^aBrion R, ^cEbetino F. H, ^aRedini F., ^bRogers M.J, ^aHeymann D.

^a INSERM, UMR 957, Nantes, F-44035 France

^a Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, France

^bUniversity of Aberdeen, Bone Research Group, Institute of Medical Sciences.

^cProcter and Gamble Pharmaceuticals, Cincinnati, Ohio.

Running title: Apomine and Lovastatin combination to treat osteosarcoma

Key words: osteosarcoma, Lovastatin, Apomine, HMG-CoA red

Category of publication: original research

Journal section: Experimental Therapeutics, Molecular Targets, and Chemical Biology

Correspondence and reprint request to:

Pr. D. HEYMANN,

INSERM UMR-S 957, Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, 1 rue Gaston Veil 44035 Nantes Cedex 1, FRANCE

Tel: +33 (0) 240 412 846; Fax: +33 (0) 240 412 860

Introduction

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives apparaissant préférentiellement chez l'enfant et le jeune adulte avec un pic d'incidence observé à l'âge de 18 ans (Link et al, 1991). Les stratégies thérapeutiques actuelles sont basées sur une résection de la pièce tumorale associée à une chimiothérapie de haute toxicité.

Malheureusement, ces stratégies cliniques ne parviennent pas à améliorer le pronostic vital des patients en raison d'une absence de réponse aux drogues anti-tumorale observée dans de nombreux cas, conduisant à l'apparition de métastases et, finalement au décès du patient (Rosen et al, 1976; Provisor et al, 1997). La survie des patients est étroitement liée à la réponse des cellules tumorales aux médicaments anti-mitotiques pour atteindre 70% à 5 ans dans les meilleures séries et seulement 30% lorsque des métastases pulmonaires sont détectées au moment du diagnostic. Ainsi, malgré de récentes avancées en matière de chimiothérapie et de chirurgie, le problème de la non réponse aux drogues anti-tumorales subsiste avec l'émergence de résistance innée ou acquise justifiant la recherche de nouvelles stratégies thérapeutique (Kruh et al, 2003).

Dans ce contexte, les thérapies ciblées combinatoires (Liu et al, 2008) apparaissent comme des stratégies cliniques prometteuses permettant l'abaissement du seuil cytotoxique des thérapies conventionnelles tout en réduisant l'impact de résistance métabolique. Le processus d'isoprénylation joue un rôle clé dans la physiologie cellulaire en régulant la fonction de petites GTPase comme Ras, Rho ou Rap1A sur lesquelles des groupements lipides prényl sont transférés. Cette isoprénylation est régie par des enzymes de la voie du mévalonate tels que la farnésyl transférase et la géranygéranyl transférase qui transfèrent des groupes lipidiques prényl (Edwards et al, 2005).

Ces protéines prénylées peuvent donc être ancrées à la membrane et permettre des interactions protéine-membrane pour organiser le cytosquelette. Ainsi, une déstabilisation de la voie du mévalonate par l'inhibition de ces enzymes ou d'autres protéines impliquées dans cette voie peut entraîner une perturbation du cytosquelette et induire une inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses. Récemment, nous avons montré l'efficacité de cibler la voie du mévalonate comme nouvelle approche thérapeutique de l'ostéosarcome. L'utilisation de l'acide Zolédronique (Zol), bisphosphonate de

troisième génération, induit une diminution significative de la prolifération de cellules d'ostéosarcome *in vitro*, par l'inhibition spécifique de la Farnésyl Diphosphate synthase (FPPs), induisant l'accumulation de la forme non prénylée de RAP1A, petite GTPase (Ory et al, 2007). Nous avons ensuite mis en évidence que Zol induit un arrêt du cycle cellulaire en phase S et G2 / M et une apoptose atypiques indépendante de l'activation des caspases, caractérisée par la translocation de deux facteurs AIF (Apoptose Inducing Factor) et Endo-G (Endonuclease-G) (Ory et al, 2007). De plus, des expériences *in vivo* ont également mis en évidence l'intérêt thérapeutique du Zol seul ou en combinaison avec la chimiothérapie conventionnelle sur la croissance de carcinome (Ottewil et al, 2008) et de sarcome (Heymann et al, 2005).

Toutefois, un traitement prolongé au ZOL a induit une résistance métabolique des cellules d'ostéosarcome impliquant le niveau d'expression de la Farnésyl Diphosphate synthase (Ory et al, 2008).

Nous avons récemment montré l'intérêt des thérapies combinatoires ciblées lors de notre association entre l'acide Zolédronique et RAD001. En effet, cette combinaison a induit une inhibition significative de la prolifération des cellules

d'ostéosarcomes sans modification de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire ni d'activation de caspase mais avec une inhibition très forte de la voie PI3K/AKT/mTOR. Cette combinaison a dans deux modèles murin d'ostéosarcome permis une diminution significative du volume et de la progression tumorale ainsi qu'une amélioration des paramètres osseux (Moriceau et al, soumis 2010).

Dans ce contexte et afin d'éviter l'apparition de phénomènes de résistance et d'améliorer l'efficacité de traitement, nous nous sommes intéressés à des inhibiteurs de la HMG-CoA réductase, enzyme clé de la voie du mévalonate. La Lovastatine appartient à la famille des statines qui inhibent par compétition l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase. La HMG-CoA réductase a été reconnue depuis longtemps comme l'enzyme limitante dans la synthèse du cholestérol et est donc un élément important de régulation de la voie du mévalonate. La Lovastatine, principalement utilisée pour traiter l'hypercholestérolémie, a récemment montré un intérêt dans les thérapies anticancéreuse par l'induction d'une mort cellulaire des cellules de myélome (Roelofs et al, 2007) par l'accumulation de formes non prénylées de Rap1A et dans

plusieurs autres types de tumeurs (Gauthaman et al 2009).

L'Apomine est un 1,1 ester de bisphosphonate qui bloque la voie du mévalonate en accélérant spécifiquement le taux de dégradation de la HMG-CoA réductase et inhibe la biosynthèse du cholestérol (Roitelman J, 2004). L'Apomine a été décrit comme pouvant mimer le 25-hydroxycholestérol (25HC), puissant stimulateur stéroïde de la dégradation de la HMG-CoA réductase, et pouvant induire le clivage de SREBP-2 et augmenter l'expression des récepteurs LDL (Berkhout et al, 1996). L'Apomine inhibe donc la HMG-CoA réductase en accélérant la dégradation de cette enzyme par l'intermédiaire du protéasome causant ainsi une diminution rapide des taux de HMG-CoA réductase (Roitelman et al, 2004). Récemment, des études ont montré que l'Apomine pouvait inhiber la prolifération de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (Flach et al, 2000 ; Lowe et al, 2005) en activant le récepteur farnésyle X, ce qui suggère que l'Apomine pourrait avoir des effets indépendants de la voie du mévalonate.

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de l'Apomine, seul ou en combinaison avec de la Lovastatine, afin d'inhiber de façon complémentaire une enzyme clé de la voie du mévalonate, la HMG-CoA

réductase. Pour cela, nous détaillerons les mécanismes d'action de chaque molécule ainsi que de leur combinaison et nous évaluerons l'effet de cette association dans un modèle d'ostéosarcome murin.

Materials and Methods

Cells and culture conditions

The rat osteosarcoma OSRGA cell line established from a radio-induced osteosarcoma (41, 42) and human MG63 cells purchased from ATCC (Promochem, France) were cultured in DMEM (Lonza, Belgium) supplemented with 10% FCS (Hyclone, USA). Murine osteosarcoma POS-1 cells were provided respectively by Dr Kamijo (Kamijo et al, 2002).

Cell Growth and viability

Cell growth and viability were determined by XTT reagent assay kit (Roche Molecular Biomedicals, Germany). Two thousand cells per well were plated into 96-well plates and cultured for 72h in culture medium in the presence or the absence of Apomine (10 μ M) or Lovastatin (0.5-2 μ M) or combination of 10 μ M of Apomine with 0.5-2 μ M of Lovastatin. Apomine was provided by Procter and Gamble pharmaceutical (Cincinnati, United States) and Lovastatin was provided by Sigma (France). After the culture period and addition of XTT

reagent, the absorbance was then determined at 490 nm. Cell viability was also assessed by Trypan blue exclusion, viable and non-viable cells were manually counted.

Caspase Activity

Twenty thousand cells were treated for 48 h with Apomine (10 μ M) or Lovastatin (0.5-2 μ M) or combination of 10 μ M of Apomine with 0.5-2 μ M of Lovastatin. Caspase-3 activity was assessed on 10 μ l of total cell lysates using the kit CaspACE Assay System (Promega, USA), following the manufacturer's recommendations. Results were expressed in arbitrary units and corrected for protein content quantified using the BCA test (Pierce Chemical Co.). Cells treated with 100 nM Staurosporin for 24 h were used as a positive control.

Cell cycle Analysis

Subconfluent cultures of OSRGA, MG63 and POS-1 cells were incubated in the absence or the presence of 10 μ M Apomine and/or 0.5-20 μ M of Lovastatin for 48h. After the treatment period, trypsinized cells were incubated in PBS containing 0.12% Triton X-100, 0.12 mmol/L EDTA, and 100 μ g/mL DNase-free RNase A (Sigma). Then, 50 μ g/ml propidium iodide were added for 20 min at 4°C in the dark. Cell cycle distribution was studied by flow cytometry (Cytomics

FC500, Beckman Coulter, France), based on 2N and 4N DNA content, and analyzed by DNA Cell Cycle Analysis Software (Phoenix Flow System, USA).

Cell signaling analysis

Two hundred thousand cells were treated with 10 μ M Apomine and/or 0.5-20 μ M of Lovastatin for 48h and then lysed in radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 5% Tris, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1mM Na₃VO₄, 0.5 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin). Lysates were cleared of debris by centrifugation at 12,000 g for 15 min. Twenty microgram of total cell lysate, determined by the BCA kit, were run on 10% SDS-PAGE and electrophoretically transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, USA). The membrane was blotted with antibodies anti-HMG-CoA red (Upstate, Dundee, UK), -p-Cdk2 (Thr 160), -p-Rb (ser 807/811), -p-pCdc2 (Tyr 15), -actin (Cell Signaling Technologies, Boston, MA, USA), p21, p27 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), Cdc25A, unphosphorylated Rap1A (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) or total forms of protein above. The membrane was washed and probed with the secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. Antibody binding was visualized with the enhanced chemiluminescence system (Roche

Molecular Biomedicals). For quantification, the emitted glow was acquired with a CCD camera and analysed with the GeneTools program (Syngene, UK).

***In vivo* experiments**

Mice (Elevages Janvier, France) were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators.

Osteolytic osteosarcoma model:
Four-week-old male C3H/He mice were anesthetized as previously described before s.c. inoculation of POS-1 cell suspension (containing 2×10^6 cells) in the hind footpad of the mice. Under these conditions, mice develop a primary tumor at the site of injection in 3 weeks that can be transplanted to mice of the same strain as a small fragment (2 x 2 x 2 mm) in close contact with the tibia. For this purpose, the periosteum of the diaphysis was opened and resected along a length of 5 mm, and the underlying bone was intact. The osteosarcoma fragment was placed contiguous to the exposed bone surface without the periosteum, and the cutaneous and muscular wounds were sutured. Tumors appeared at the graft site

approximately 8 days later associated with the development of pulmonary metastases in a 3-week period. The tumors that develop in contact to the femora lead to osteolytic lesions that reproduce the osteolytic form of human osteosarcoma.

For this model, the tumor volumes (V) were calculated from the measurement of two perpendicular diameters using a caliper according to the following formula: $V = 0.5 \times L \times S^2$, where L and S represent respectively, the largest and smallest perpendicular tumor diameters. Four groups of eight mice were assigned, respectively, as control (placebo by oral administration and intra-peritoneal injection of PBS, daily), Apomine treatment (oral administration of 50 mg/kg, daily), Lovastatin (i.p injection of 25 mg/kg, daily) and the association of Apomine (50 mg/kg) and Lovastatin (25 mg/kg). Treatment continued until each animal showed signs of morbidity including cachexia or respiratory distress, at which point they were sacrificed by cervical dislocation.

Histological analysis

After sacrifice, tibia were conserved and fixed in 10% neutral buffered formalin at 4°C, decalcified (PBS-EDTA) and embedded in paraffin. Five- μ m sections

were cut and stained with hematoxylin-eosin (HE) or with Masson's trichrome.

Statistical analysis

Each experiment was repeated independently three times in triplicate. The mean \pm SD was calculated for all conditions and compared by ANOVA

followed by Bonferroni post hoc test. Differences relative to a probability of two-tailed $p < 0.05$ were considered significant.

Résultats

L'Apomine et la Lovastatine synergisent pour induire la mort des cellules d'ostéosarcome.

Plusieurs études ont démontré l'activité anti-tumorale de l'Apomine et de la Lovastatine dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses, nous avons tout d'abord examiné l'effet de l'Apomine et de la Lovastatine, seul sur la prolifération des lignées d'ostéosarcome humaine MG63, de souris POS-1 et de rat OSRGA (données non montrées). L'Apomine et la Lovastatine réduisent significativement la viabilité cellulaire des lignées MG63, POS-1 et OSRGA (données non montrées). L'Apomine et la Lovastatine pouvant induire des effets indésirables chez le patient, nous avons analysé l'effet de la combinaison de faibles doses de ces deux molécules sur la prolifération cellulaire d'ostéosarcome (figure 1). Les cellules MG63, POS-1 et OSRGA sont traitées par la combinaison de 10 μ M d'Apomine et de 0.5 à 2 μ M de Lovastatine pendant 48h. les résultats mettent clairement en évidence un effet synergique entre l'Apomine et la Lovastatine (figure 1A).

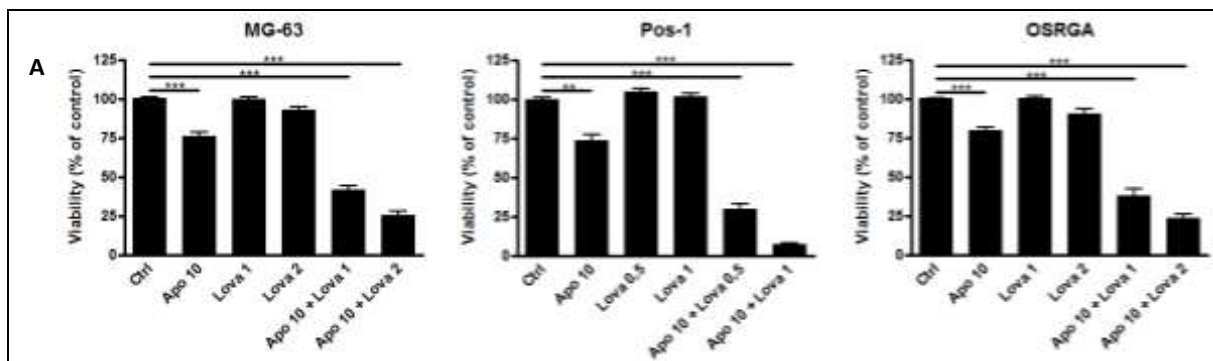


Figure 1A : Effet de la combinaison Apomine + Lovastatine sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome.

En effet, dans trois lignées cellulaires étudiées, 10 μ M d'Apomine induisent une inhibition de 35% du nombre de cellules viables mais 0,5 à 2 μ M de Lovastatine n'ont aucun effet

significatif sur le nombre de cellules viables. La combinaison de l'Apomine et de la Lovastatine induit une inhibition comprise entre 60 et 75% du nombre de cellules viables MG63 et OSRGA (figure 1A). Cet effet synergique est particulièrement marquée sur la lignée cellulaire POS-1 dont 1 μ M de Lovastatine et 10 μ M d'Apomine induisent seulement une inhibition 35% alors que leur combinaison atteint 90% (figure 1A).

Pour déterminer si l'effet inhibiteur de la combinaison d'Apomine et de Lovastatine observé sur les lignées cellulaires d'ostéosarcome résulte de l'inhibition de la prolifération cellulaire et / ou de l'induction de la mort des cellules d'ostéosarcome, un comptage manuel a été réalisé à l'aide d'un test d'exclusion au Bleu Trypan. Dans les trois lignées cellulaires étudiées, une mort cellulaire a été mise en évidence (figure 1B). En effet, dans les cellules MG63, 10 μ M d'Apomine et 2 μ M de Lovastatin induisent une diminution de la viabilité de 50% et une augmentation des cellules mortes de 30% (figure 1B). La combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine potentialise leur effet et induit une diminution des cellules viables de 90% et une augmentation de cellules mortes de 40%.

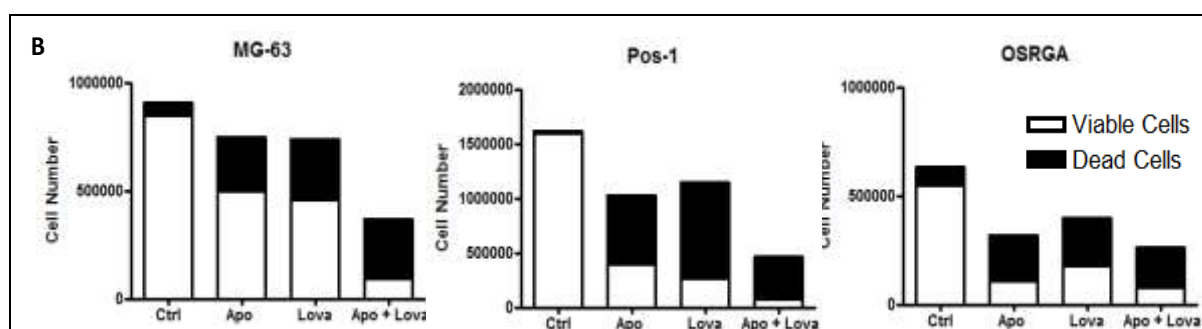


Figure 1B : Effet de la combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine sur la viabilité des cellules d'ostéosarcome.

Les effets des molécules seules sont particulièrement marqués pour les cellules POS-1 et OSRGA avec une diminution de cellules viables pour l'Apomine et la Lovastatine de 70%

induisant un effet de la combinaison entre la Lovastatine et l'Apomine beaucoup moins prononcée (figure 1B). Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de cette association, nous avons utilisé comme outil les cellules MG63 (cellules d'ostéosarcome humaine).

L'Apomine et la Lovastatine diminuent l'activité de la voie du mévalonate.

Pour comprendre l'effet de cette association, nous avons étudié par western blot différentes protéines impliquées dans la voie du mévalonate. L'inhibition de la HMG-CoA réductase par les statines provoque généralement des mécanismes de rétrocontrôle compensatoire responsable d'une forte augmentation de la HMG-CoA réductase (Brown et al, 1978; Nakanishi et al, 1988). Après traitement à la Lovastatine, une forte augmentation des taux de la HMG-CoA réductase est observée dans les trois types cellulaires ainsi qu'une accumulation de la forme non prénylée de RAP1A (unRAP1A) reflet de l'inhibition des protéines impliquées dans la prénylation (telle la FPPs) (figure 1C).

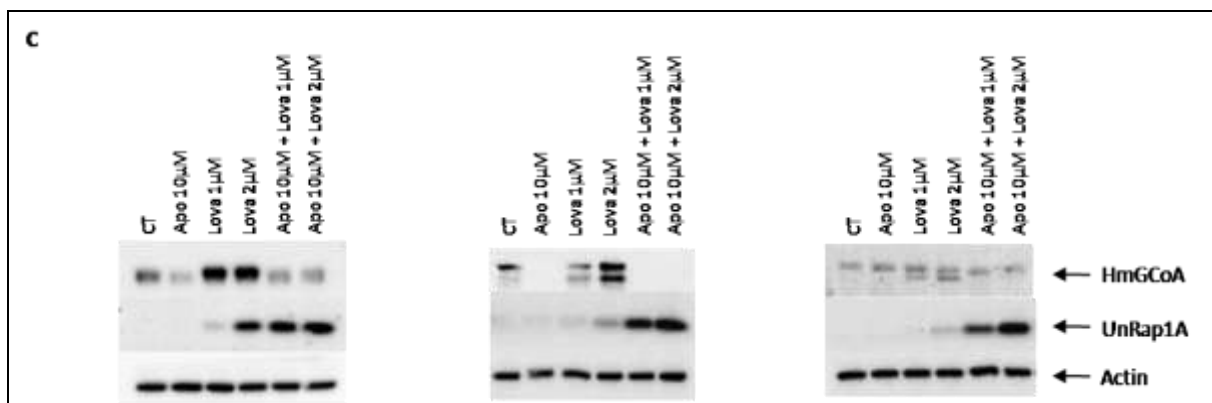


Figure 1C : Effet de la Lovastatine et de l'Apomine sur différentes protéines impliquées dans la voie du mévalonate.

L'Apomine induisant une diminution significative de la HMG-CoA réductase, nous avons étudié l'effet du traitement combinatoire. Dans les trois lignées cellulaires, notre

combinaison diminue les taux de HMG-CoA réductase et augmente l'accumulation de la forme non prénylé de RAP1A (figure 1C).

L'Apomine et la Lovastatine induisent une apoptose caspase dépendant.

Afin de caractériser les mécanismes de l'apoptose induite par la combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine, la fragmentation nucléaire et l'activation des caspases ont été analysés dans les cellules MG63. Cette combinaison induit une fragmentation nucléaire caractéristique de l'apoptose comparativement aux autres conditions expérimentales (figure 2A).

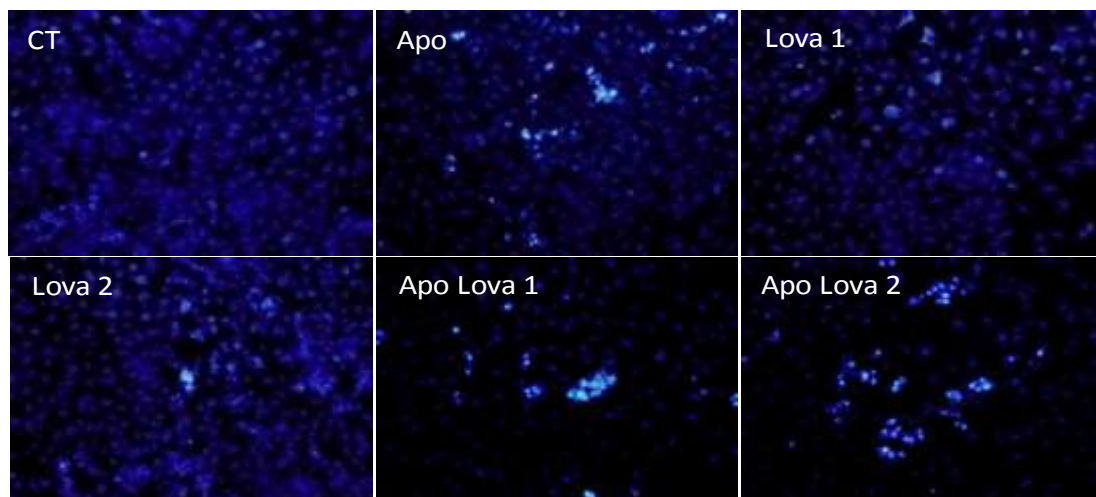


Figure 2A : Fragmentation nucléaire induite par l'association entre l'Apomine et la Lovastatine (X100).

De plus, 10 μ M d'Apomine induit une activation de la caspase 3 (figure 2B), protéine effectrice de l'apoptose, et l'ajout de Lovastatine potentialise son effet (figure 2B).

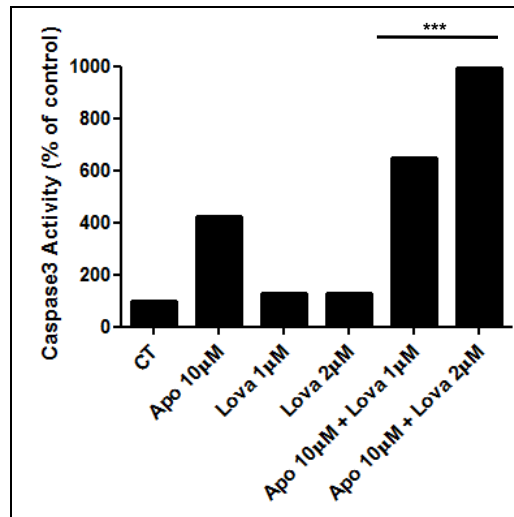


Figure 2B : La combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine potentialise l'activation de la caspase 3 induite par l'Apomine.

L'inhibiteur pan-caspase Z-Vad-FMK compense les effets induits par la combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine sur la viabilité cellulaire (figure 2C).

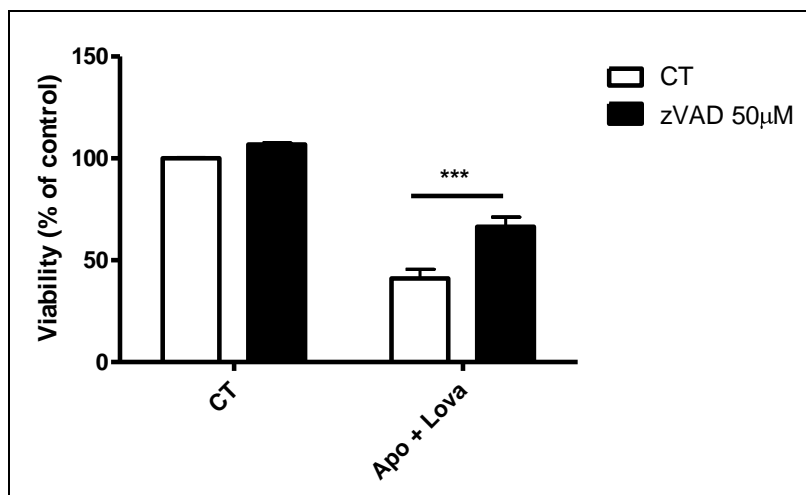


Figure 2C : ZVAD compense l'effet de la combinaison sur la viabilité cellulaire des MG63.

La combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G0.

Afin de déterminer si la mort cellulaire induite par la combinaison était associée à un blocage des cellules dans une des phases du cycle cellulaire, une analyse en cytométrie en flux a été effectuée après 48 h de traitement. 10 μM d'Apomine induit une accumulation significative des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire (45% des cellules en G0/G1 pour le CT et 72% pour 10 μM d'Apomine). La combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine induit une légère augmentation comparativement à l'effet de l'Apomine (de 45% pour les cellules CT à 76 et 77% pour les combinaisons) (figure 3A). Plus précisément, nous observons suite à un marquage Ki67 une importante accumulation des cellules en phase G0. L'Apomine induit une accumulation des cellules en phase G0/G1 de 34% sur 72% de cellules bloquées en G0/G1 en comparaison avec le contrôle, où seulement 3% des cellules sont en G0 sur 45% de cellules en phase G0/G1. Le traitement combiné induit la même accumulation, avec 33% des cellules en G0 sur 76% et 77% des cellules en phase G0/G1 (figure 3B).

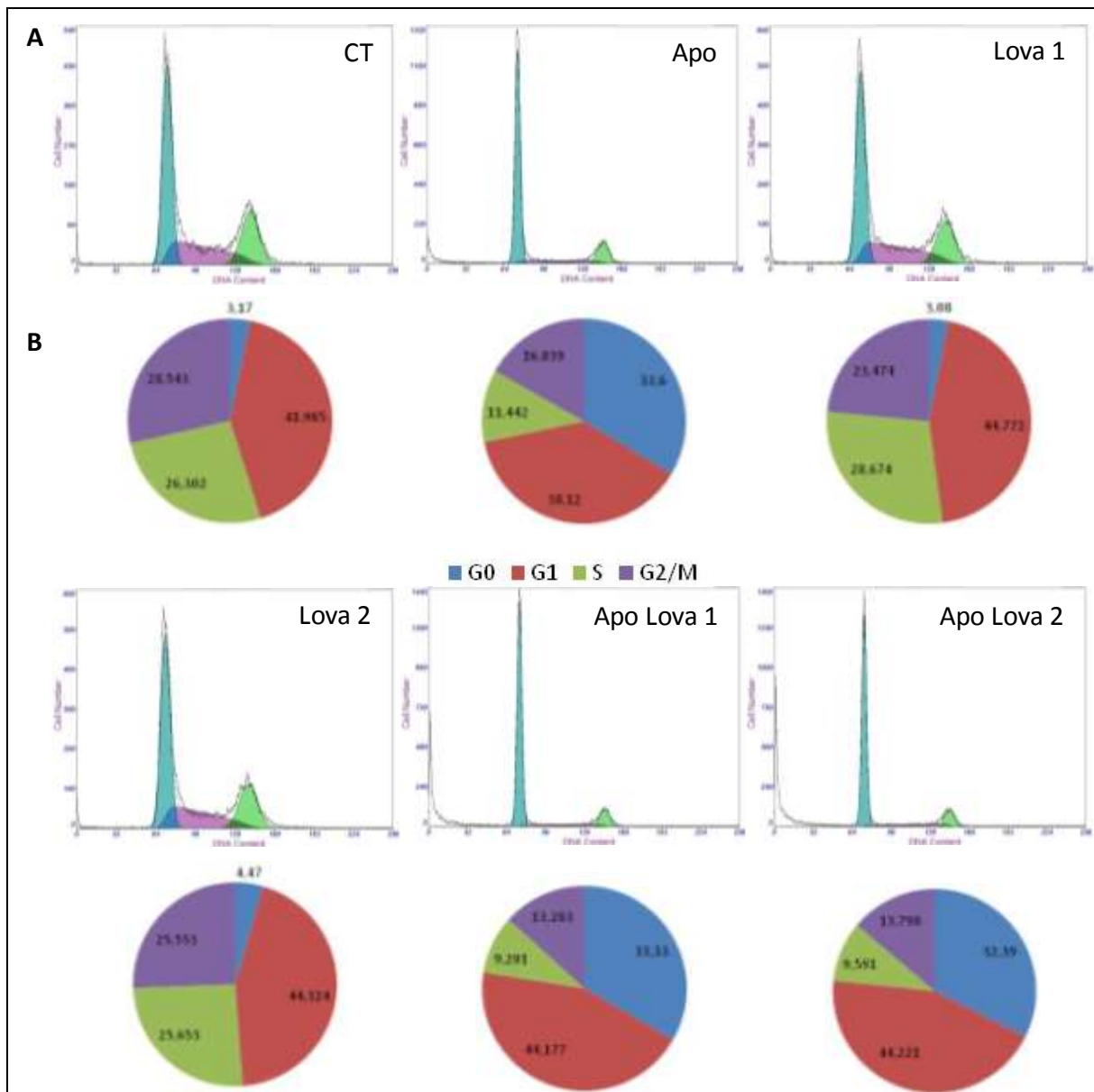


Figure 3 A et B : La combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine induit une accumulation des cellules en phase G0 du cycle cellulaire.

Nous avons donc étudié par Western blot quels « checkpoints » de l'ADN pouvaient être impliqués dans cet arrêt du cycle cellulaire observée après ce traitement combinatoire. Dans les cellules MG63, la combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine augmente p27 et p21 induisant ainsi une diminution significative de l'activité de Rb, responsable de la transition G1/S. De plus, cette combinaison induit une augmentation de l'activité de cdk2 et de

CDC25A et diminue celle de cdc2 éteignant ainsi la signalisation de transition G1/S (figure 3C).

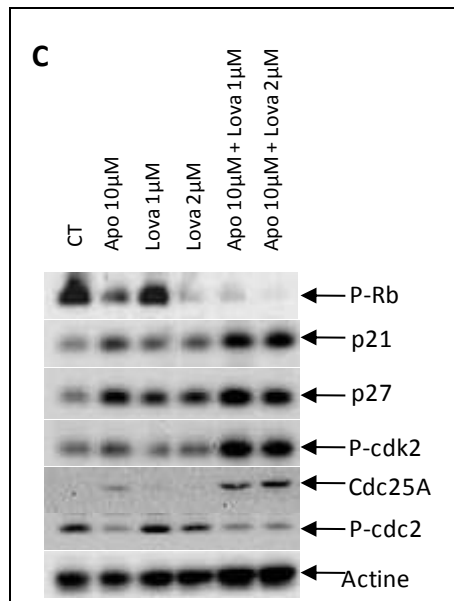


Figure 3C : Effet de l'association entre l'Apomine et la Lovastatine sur les « checkpoints » du cycle cellulaire reponsable de la transition G1/S.

L'effet de la combinaison de l'Apomine et de la Lovastatine est compensé par certain produit de la voie du mévalonate.

Pour mettre en évidence l'implication de la voie du mévalonate dans l'effet de cette association, nous avons utilisé du mévalonate (Meva), de la phosphatidylcholine (PC) et du geranylgeraniol (GGOH) qui interferent à différents niveaux de la voie du mévalonate. Les cellules MG63 ont été traitées avec 10µM d'Apomine et / ou avec 2µM de Lovastatine et / ou avec de 500 µM mévalonate et / ou avec de 250 µg/mL phosphatidylcholine et / ou avec de 10µM GGOH. L'effet synergique de la combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine observé précédemment est compensé par l'ajout de mévalonate et de GGOH mais pas totalement par le PC (figure 4A).

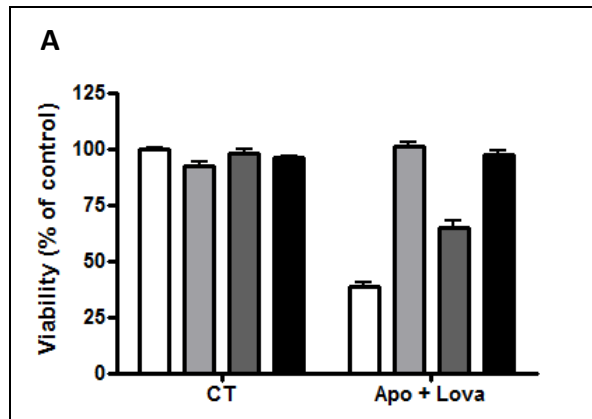


Figure 4A : Le mévalonate, le GGOH et le PC compensent l'effet synergique de la combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine.

De plus, l'accumulation de la forme non prénylée de RAP1A induite par la combinaison de l'Apomine et de la lovastatine est abolie par l'ajout de mévalonate et presque compensée par le GGOH (figure 4B). Toutefois, le PC n'est pas capable de compenser l'effet du traitement combinatoire (figure 4B).

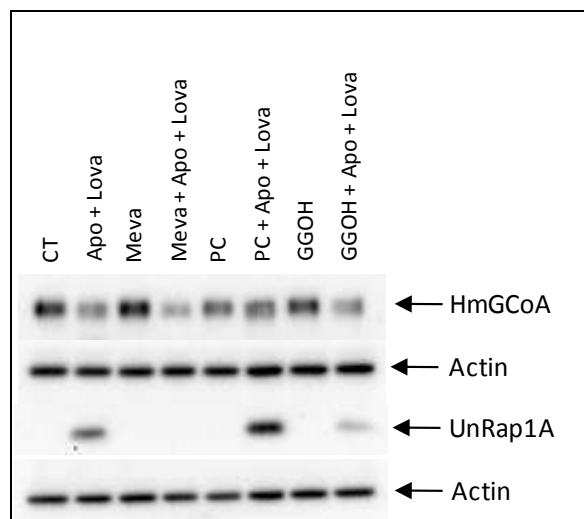


Figure 4B : Le mévalonate et le GGOH compensent l'effet de la combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine sur l'accumulation de la forme non-prénylée de RAP1A.

Enfin, le mévalonate, le PC et le GGOH diminuent l'activation de caspase 3 induite la combinaison apomine-lovastatine (figure 4C).

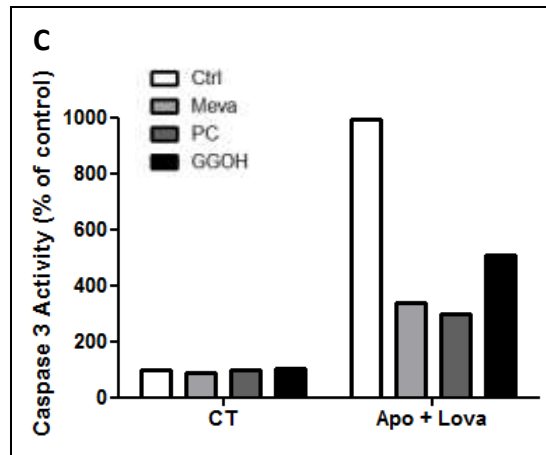


Figure 4C : Le mévalonate, le PC et le GGOH compensent l'activation de caspase 3 induite la combinaison apomine/lovastatine.

La combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine réduit la croissance tumorale dans un modèle d'ostéosarcome syngénique murin.

Une précédente étude a permis de déterminer les doses optimales d'Apomine et de Lovastatine ainsi que leur mode d'administration (données non montrées). Les doses de 50 mg/kg d'Apomine et de 25 mg/kg de Lovastatine n'ont aucun effet significatif sur la croissance tumorale (figure 5A). La combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine réduit significativement la moyenne du volume tumoral (figure 5A). Le volume tumoral moyen du groupe contrôle atteint 3600 mm³ alors que celui du groupe traité par la combinaison médicamenteuse atteint 2300 mm³ (figure 5A).

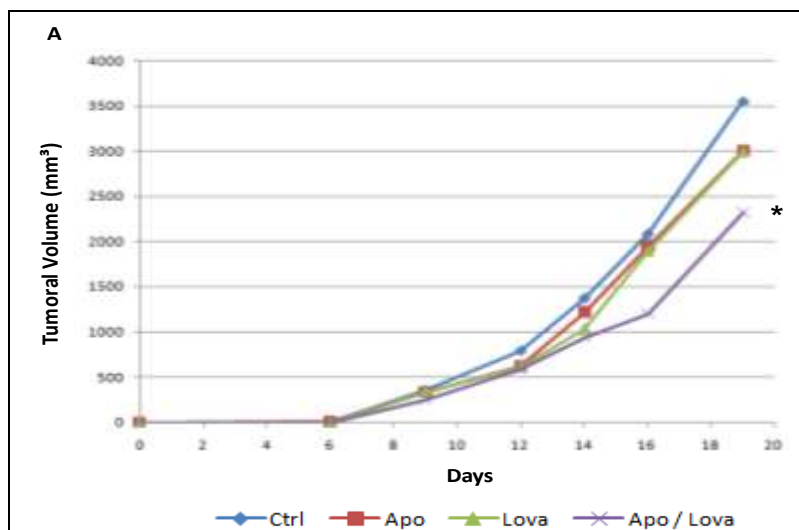


Figure 5A : La combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine réduit significativement le volume tumoral moyen. Kruskal wallis (anova); Post test Dunn (compare column to control):

* $p < 0.05$.

De plus, la progression tumorale entre le jour 16 et le jour 9 confirme un effet synergique de cette association. Le traitement combinatoire a considérablement ralenti la progression tumorale avec une évolution de 1240 mm^3 comparativement aux autres groupes qui présentent une évolution du volume tumoral de l'ordre de 2500 mm^3 (figure 5B).

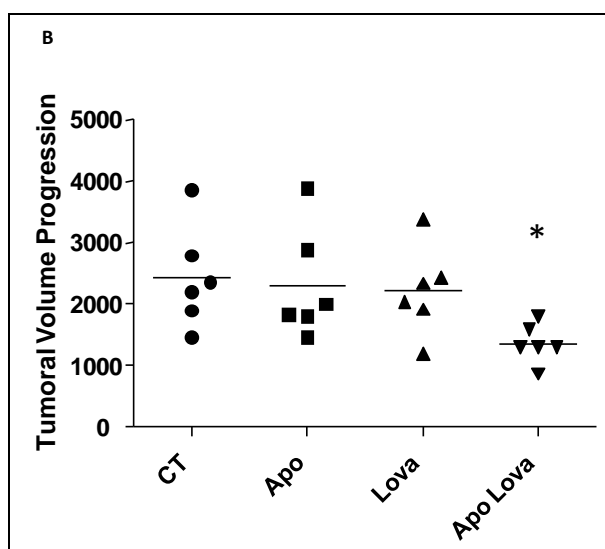


Figure 5B : Le traitement combinatoire ralentit la progression tumorale entre les jours 9 et 16.

Kruskal wallis (anova); Post test Dunn (compare column to control):* $p < 0.05$.

Discussion

L'ostéosarcome avec 150 nouveaux cas par ans est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives. Malgré les progrès réalisés dans les protocoles de chimiothérapie et dans la chirurgie, le taux de survie des patients n'a pas évolué durant ces 25 dernières années. De plus, l'absence de réponse des patients à la chimiothérapie et l'inefficacité du traitement à contrôler la progression tumorale poussent à envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, les traitements utilisant une approche combinatoire ciblant différentes voies de signalisation pourraient améliorer l'efficacité des traitements et éviter l'émergence de résistance métabolique (Kruh et al, 2008).

La voie du mévalonate joue un rôle clé dans la prénylation des petites GTPases telles Ras, Rho ou encore RAPIA qui s'ancrent à la membrane et contribue à la bonne organisation du cytosquelette et au processus de signalisation intracellulaire. Andela et ces collaborateurs (2003) ont mis en évidence la voie du mévalonate comme nouvelle cible des stratégies anticancéreuses suggérant un rôle important des protéines farnésylées et géranylgeranylées dans les processus cellulaires cancéreux et a donc stimulé le développement d'inhibiteur de cette voie. Nous avons précédemment démontré par le Zol, l'effet de cibler la voie du mévalonate comme approche thérapeutique des ostéosarcomes (Ory et al, 2007) où nous avons observé une induction de mort cellulaire indépendante des caspases et un blocage des cellules en phase S/G2M du cycle cellulaire. Nous avons récemment démontré qu'un traitement combinatoire ciblant différentes voies métaboliques pouvait améliorer l'efficacité de traitement et contourner des résistances induites par l'utilisation de molécules seules (Moriceau et al, Cancer Res en révision). En effet, nous avons démontré des effets synergiques des inhibiteurs de la voie de mTOR (RAD001) et de la voie du mévalonate (Zol) sur la croissance des cellules d'ostéosarcome. De plus, nous avons montré que cette combinaison (RAD001 + Zol) induit une diminution significative du processus de

prénylation. La diminution significative du volume et de la progression tumorale dans deux modèles syngéniques d'ostéosarcome murin confirme l'intérêt des thérapies combinatoires ciblées.

Dans ce contexte, ce travail témoigne de l'intérêt thérapeutique d'une combinaison entre l'Apomine et la lovastatine, qui cible la même protéine, la HMG-CoA réductase et de leur effet synergique inhibant totalement la voie du mévalonate. En effet, les statines, généralement connues comme agents diminuant le taux de cholestérol, ont montré des activités anti-tumorales (Laezza et al, 2008 ; Garwood et al, 2010). De plus, la Lovastatine a permis une synergie avec le celecoxib améliorant ainsi le traitement du cancer du colon (Guruswamy et al, 2009) et contourne des résistances acquises vis-à-vis de drogues cytotoxiques sur des cellules cancéreuses pulmonaires (Park et al, 2009). La Lovastatine permet la surexpression de protéines de jonction comme thérapie anti-cancéreuse (Khaidakov et al, 2009). En effet, Wei et al (2007) ont montré que la lovastatine était capable d'augmenter les fonctions des jonctions GAP.

En inhibitant la voie du mévalonate, la Lovastatine et d'autres statines telles la simvastatine, induisent une augmentation des marqueurs de la formation osseuse (BMP2) et une diminution des marqueurs de la dégradation osseuse (Kanazawa et al, 2009). Les statines pourraient prévenir la perte osseuse chez des souris ovariectomisées (HO et al, 2009) et pourraient atténuer l'ostéoporose induite par les glucocorticoïdes (Kanazawa et al, 2009). Toutefois, la Lovastatine manque d'efficacité dans la carcinogenèse mammaire des rongeurs (Lubert et al, 2009) et a un double effet sur l'angiogénèse. A de faibles doses, la Lovastatine semble être pro-angiogéniques en augmentant les taux de VEGF, et à de fortes doses, elle induit un effet anti-angiogénique en réduisant ces taux (Wang et al, 2010). L'association de la lovastatine et de l'Apomine permet obtenir une forte inhibition de l'activité HMG-CoA réductase. Par ailleurs, l'Apomine permet la dégradation de la HMG-CoA réductase par

l'intermédiaire du protéasome, son mécanisme d'action complète celui de la Lovastatine et réduit alors les mécanismes de rétrocontrôle activés lors d'une première inhibition par la Lovastatine (Nakanishi et al, 1988).

L'Apomine, récemment, a démontré un effet potentiel anti-tumoral sur les cellules myélomateuses (Edwards et al, 2007) et peu d'effets secondaires chez les patients (Lewis et al, 2006). Deux mécanismes d'action de l'Apomine sont connus: i) l'activation du récepteur nucléaire FXR (farnesoid X receptor) qui induit une mort cellulaire (Niesor et al, 2001) ; ii) l'inhibition de la prénylation de Ras (Lowe et al, 2005). De plus, l'Apomine a induit une mort cellulaire des lignées humaines de mélanome *via* un nouveau mécanisme médiée à la membrane et indépendant des caspase (Pourpak et al, 2007). Nous démontrons dans notre étude que la combinaison entre l'Apomine et la Lovastatine réduit de façon significative le niveau d'expression de la HMG-CoA réductase résultant d'une inhibition de la prolifération, d'une mort cellulaire induite par un arrêt des cellules en phase G0 et une activation de la caspase 3. De plus, notre traitement combinatoire induit la surexpression de p21 et de p27 conduisant à la diminution significative de l'activité de Rb. Rb reste donc fixé à E2F, facteur de transcription qui régit la progression G1-S, étayant un blocage des cellules en phase G0. Nos résultats mettent en évidence que, même si l'Apomine diminue l'expression de la HMG-CoA réductase, l'Apomine ne permet pas l'accumulation de la forme non prénylée de RAS1A suggérant que l'Apomine potentialise l'effet de la Lovastatine pour éteindre totalement la signalisation induite dans la voie du mévalonate. Le mévalonate, le GGOH et le PC préviennent l'apoptose induite par cette combinaison avec une diminution significative de l'inhibition de la prolifération cellulaire et la diminution de l'activation de la caspase 3. Cependant, bien que le mévalonate et le GGOH compensent l'accumulation de la forme non prénylée de RAS1A après le traitement combinatoire, le PC n'a aucun effet sur cette accumulation suggérant un autre mécanisme d'action de l'Apomine. L'intérêt de combiner

l'Apomine et la Lovastatine a été confirmé *in vivo* dans un modèle d'ostéosarcome syngénique murin. Le traitement combinatoire a induit une diminution significative du volume et de la progression tumorale.

Edwards et al (2007) ont démontré que l'Apomine n'est pas en mesure d'inhiber la résorption osseuse des ostéoclastes *in vitro* et soulève la question du mécanisme par lequel l'Apomine prévient les lésions osseuses ostéolytiques.

Au vue des résultats, cette étude démontre l'intérêt thérapeutique potentiel de cette combinaison qui abolit totalement la signalisation de la voie du mévalonate, sans mécanisme de rétrocontrôle. La pertinence de cette combinaison offre une alternative dans le traitement de l'ostéosarcome.

Perspectives de l'article 3

L'apomine, ester de bisphosphonate et la Lovastatine (statine) ont mis en exergue un effet potentialisateur de leur combinaison. En effet, quand la Lovastatine et l'Apomine, utilisées seuls n'induisent aucune inhibition de prolifération cellulaire, leur combinaison a un effet drastique sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome induisant une mort cellulaire reflétée par un blocage des cellules en phase G0 du cycle cellulaire et une activation de la caspase 3. De plus, cette combinaison réduit le volume tumoral dans un modèle d'ostéosarcome murin. Par ailleurs, l'ajout de mévalonate, de phosphatidylcholine et de géranylgeraniol compensent l'effet de cette combinaison. L'inhibition de la HMG-CoA red, enzyme clé de la voie du mévalonate, par deux molécules à mécanisme complémentaire ouvre de nouvelles perspectives dans le traitement ciblé de pathologie cancéreuse. En effet, une inhibition de la voie du mévalonate a pour conséquence la non prénylation de petite GTPase telles Rho, Ras ou encore RAP1A, protéines responsables des interactions protéines-protéines à l'interface membranaire. Ces protéines ancrées à la membrane sont indispensables à la signalisation cellulaire et gouvernent la plupart du temps des voies impliquées dans la prolifération cellulaire. Dans le cancer colorectal, la mutation de KRas serait prédicteur de l'efficacité des inhibiteurs de l'EGFR (Fakih et al, 2010). De plus, Krycer et al (2010) mettent en avant le lien entre la voie PI3K/AKT/mTOR dans l'activation de SREBP et donc, dans la synthèse de cholestérol (figure 38) (Krycer et al, 2010). L'activité d'AKT diffère selon les différents facteurs de transcription SREBP mis en jeu (Bengoechea-Alonso et al, 2009). AKT activerait SREBP-2, responsable de l'expression de la HMG-CoA réductase (Krycer et al, 2010).

Il serait donc intéressant de regarder l'effet de l'Apomine, de la Lovastatine et de leur association sur l'activité des protéines impliquées dans la voie PI3K/AKT/mTOR. Sachant que la combinaison d'Apomine + Lovastatine inhibe l'activité d'AKT, cette analyse permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces molécules et permettrait d'envisager de nouvelles combinaisons ciblées, à savoir d'associer RAD001, inhibiteur de mTOR avec cette combinaison.

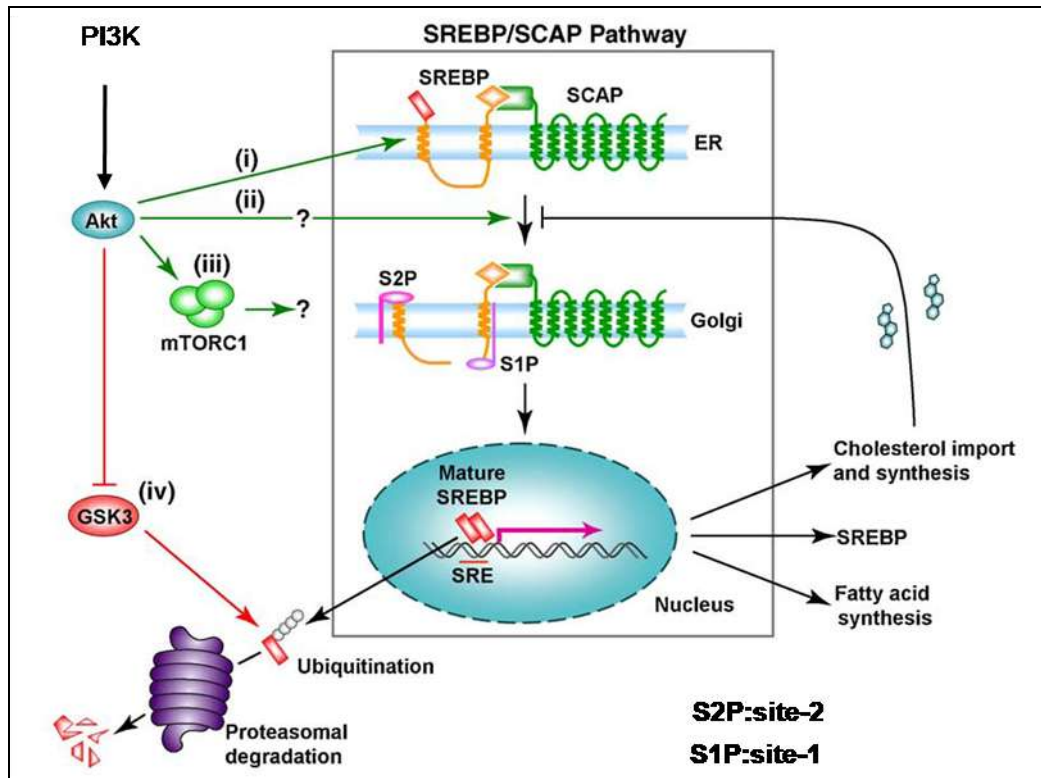


Figure 38 : Interaction entre la voie PI3K/AKT/mTOR et le facteur de transcription SREBP (adapté d'après Krycer, 2010).

Sassano et al (2008) a montré qu'une augmentation du taux de cholestérol corrèle avec une résistance relative aux agents de chimiothérapie, une association statine + agents de chimiothérapie peut être envisagée en clinique. Browning et al (2006) ne corrèlent aucun effet des statines dans la survenue des cancers. Ces observations confortent la voie de mévalonate comme nouvelle approche thérapeutique et ouvre des hypothèses de combinaisons ciblées intéressantes.

PARTIE IV :

**L'Imatinib mesylate (Glivec®)
inhibe la prolifération des cellules,
induit une mort cellulaire
dépendant de la caspase 3 et réduit
le volume et la progression tumorale
dans deux modèles d'ostéosarcome
murin**

I. L'Imatinib comme nouvelle approche thérapeutique des ostéosarcomes

Le succès clinique de l'utilisation de l'Imatinib mésylate (Glivec® ou STI-571) dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) a conduit à de grands espoirs dans l'application générale des thérapies ciblées. En effet l'Imatinib mésylate a été développé pour inhiber spécifiquement la protéine de fusion BCR-Abl, responsable de la LMC. La LMC est caractérisée par la présence du chromosome de Philadelphie (Ph1) correspondant à une translocation t(9 ; 22) qui aboutit à l'expression d'une protéine de fusion pathologique : BCR-Abl (BCR : Breakpoint Cluster Region ; Abl : Abelson proto-oncogène). BCR-Abl possède une activité tyrosine kinase constitutivement active et non-régulable ce qui engendre un effet mitogène des cellules hématopoïétiques myéloïdes, provoquant la LMC. L'Imatinib mésylate en se fixant au site de liaison de l'ATP du domaine tyrosine kinase inhibe son activité et permet à terme de restaurer une réponse complète hématologique (Druker et al, 2008).

Au regard de cette spécificité, des récepteurs présentant une activité tyrosine kinase sont devenus cibles de l'Imatinib mésylate tels que le récepteur au PDGF (Platelet Derived Growth Factor) (Buchdunger et al, 2000), le récepteur c-KIT qui lie le stem cell factor (SCF) (Buchdunger et al, 2000) et le récepteur au M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) (Dewar et al, 2005). De part sa capacité d'inhiber des protéines à activité tyrosine kinase, l'imatinib est aussi devenu le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) dont 85% d'entre elles présentent une mutation soit du récepteur c-kit soit du récepteur PDGFRa (Liegl-Atzwanger et al, 2010).

Nos précédentes études ont montré l'intérêt de cibler des protéines clés de voies de signalisation impliquées dans les phénomènes de cancérisation. L'Imatinib mésylate, inhibiteur spécifique de protéines à activité tyrosine kinase s'intègre parfaitement dans nos stratégies thérapeutiques ciblées. Cependant, de nombreuses études font l'état de résistance acquise à l'Imatinib mésylate avec soit l'apparition d'une deuxième mutation dans le domaine kinase d'Abl soit l'amplification de l'oncogène BCR-Abl. L'utilisation d'inhibiteurs de deuxième génération pourrait palier à ces résistances. Cependant l'association de l'Imatinib mésylate avec une autre molécule ciblant soit une protéine de la même voie de signalisation (thérapie combinatoire ciblée verticale) soit une protéine d'une autre voie de signalisation (thérapie combinatoire ciblée horizontale) paraît être prometteuse.

Ce travail s'est donc porté sur l'étude des mécanismes d'action de l'imatinib sur des lignées cellulaires d'ostéosarcome puis dans des modèles d'ostéosarcome murin. Les résultats obtenus nous permettront d'envisager des stratégies combinatoires soit avec RAD001 (inhibiteur spécifique de mTOR) soit avec l'acide Zolédronique (bisphosphonate de troisième génération inhibant la FPPs). Ces nouvelles approches auront comme objectif d'offrir de nouvelles alternatives dans le traitement des ostéosarcomes.

MATERIEL ET METHODE

A - Culture cellulaire

1 - Lignées cellulaires utilisées

1.1 - Cellules POS-1

Ces cellules adhérentes dérivent d'un ostéosarcome murin développé spontanément par des souris de souche C3H/HeN (Uesugi et al, 2000).

1.2 - Cellules OSRGA

Cette lignée de morphologie épithéliale a été établie par le Dr JP Thiéry à partir d'un ostéosarcome radio-induit chez le rat. Ces cellules induisent des nodules minéralisés *in vitro* et forment des tumeurs mixtes ostéolytiques et ostéogènes *in vivo* (Heymann et al, 2005)

1.3 - Cellules MG63

La lignée MG63 a été établie à partir de sarcomes ostéogènes humains et proviennent de l'ATCC (American Tissue Cell Collection).

1.4 - Cellules MOS-J

Ces cellules, de nature ostéogène, dérivent d'un ostéosarcome murin développé spontanément par des souris de souche C57BL/6J (Joliat et al, 2002). Elles nous ont été fournies par le Dr Léonard Shultz (Jackson Laboratory). Ces cellules induisent des nodules minéralisés *in vitro* et induisent la formation de tumeurs très ostéogènes *in vivo*, correspondant à un ostéosarcome ostéoblastique, le plus fréquent chez l'homme.

2 - Culture et prolifération cellulaire

Toutes les manipulations se font dans un environnement contrôlé sous hotte à flux laminaire vertical (PSM Securipius, Astec). Les cellules sont cultivées en flasques F25 ou F75 (FALCON[®], Becton Dickinson Labware), dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Biowhittaker) pour les cellules POS-1 et MOS-J et dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biowhittaker) supplémenté par 5% de SVF (Sérum de Veau Fœtal, Hyclone Perbio) pour les cellules OSRGA et MG63. Les cellules sont ensemencées à une densité de 50×10^3 cellules/cm². Les flasques sont ensuite placées à 37°C dans une atmosphère

saturée en humidité avec 5% de CO₂. Les milieux de culture sont changés deux fois par semaine. A confluence, les cellules sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA [BioWhittaker, Trypsine : 0,5 g/L; EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) : 0,2 g/L]. La trypsine est ensuite neutralisée par un ajout de milieu de culture supplémenté par 5% SVF. Après centrifugation à 500 g pendant 5 min à température ambiante, le culot est repris dans du milieu complet. Un comptage cellulaire est alors réalisé sur cellule de Malassez par la méthode d'exclusion au Bleu Trypan, technique qui permet de quantifier la viabilité cellulaire. En effet, les cellules mortes incorporent le colorant, tandis que les cellules viables restent réfringentes.

B - Effets de l'Imatinib sur les cellules tumorales

Afin de savoir si l'Imatinib a un impact sur la prolifération cellulaire des lignées étudiées, différents types de tests ont été réalisés.

1 - Etude de la prolifération cellulaire (test XTT)

Il s'agit d'un dosage colorimétrique de quantification de la prolifération et de la viabilité cellulaire, basé sur le clivage du sel de tétrazolium XTT (jaune) en formazan (orangé) par l'activité métabolique des cellules (activité déshydrogénase des mitochondries). Le formazan (soluble en solution aqueuse) est quantifiable par une mesure de la DO à 490 nm (Lecteur Victor, Perkin Elmer). Ce dosage nécessite le mélange de deux réactifs :

- Le réactif de marquage XTT (Roche) = (Sodium 3'-[1-(phénylaminocarbonyl)-3,4-tétrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate).
- Le réactif de couplage électronique (Roche) à diluer au 1/50^e dans le XTT labelling reagent.

Les cellules sontensemencées à 2x10³ cellules/puits (OSRGA) ou à 1,5x10³ cellules/puits (MG63, MOS-J et POS-1) dans 100 µl de milieu, en plaque 96 puits. Des puits « contrôle » (cellules sans facteur) et « blanc » (milieu de culture seul) sont également réalisés. Suite à l'adhésion des cellules, le ou les facteurs sont ajoutés à chaque puits. Le milieu de culture est éliminé, puis 100 µl de milieu contenant l'Imatinib à la concentration adéquate plus ou moins Z-VAD (50 µM ou 100 µM) (R&D) sont déposés dans chaque puits, sauf dans le puits contrôle, auquel du milieu seul est ajouté (milieu supplémenté par 5% SVF). Les plaques sont à nouveau placées dans l'incubateur pendant 24, 48 ou 72 h. Après cette incubation, 50 µl de mélange XTT sont ajoutés à chaque puits. Le mélange XTT se compose

de réactif de couplage électronique dilué au 1/50^e dans le réactif de marquage. Cette manipulation doit se faire sous la hotte dans des conditions de faible luminosité car le XTT est sensible à la lumière. Les plaques sont ensuite replacées dans l'incubateur. Après 2 h, la lecture spectrophotométrique est réalisée à 490 nm grâce au lecteur de plaque VICTOR². Le protocole est réalisé en triple et est identique pour les différents types cellulaires, mais les paramètres peuvent varier selon l'objectif de la manipulation.

2 - Technique du time lapse

Cette technique a été réalisée à l'IFR de Nantes en collaboration avec M. Philippe Hulin. Son principe repose sur la prise de photographies de cellules observées en microscopie à contraste de phase (Leica) à intervalle de temps réguliers, permettant ainsi la réalisation d'un film sur la durée de l'expérience. La division et la mort des cellules peuvent être alors observées et quantifiées.

Les cellules sont cultivées 24 h en plaque 6 puits à raison de 15×10^3 cellules par puits, puis après que les cellules aient adhéré, le milieu est retiré et remplacé par le milieu contenant ou non l'Imatinib aux concentrations voulues. Pour les différents types cellulaires une gamme de concentrations d'Imatinib est utilisée avec des photographies prises toutes les 10 min pendant une durée de 72 h. Un contrôle sans Imatinib est réalisé pour chaque type cellulaire. Le montage du film Quick Time réalisé grâce au logiciel Métamorphe va ensuite permettre d'observer les divisions et la mort cellulaire en fonction du temps pour chaque condition.

3 - Etude de l'effet de l'Imatinib sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire

Les effets de l'Imatinib observés lors du test XTT et de l'analyse time lapse peuvent résulter de modifications du cycle cellulaire.

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer certains paramètres tels que la taille, la granulométrie et l'expression de marqueurs membranaires ou intracellulaires. Les cellules sont entraînées rapidement dans une gaine liquide et amenées une par une dans un faisceau laser. Pour l'étude du cycle cellulaire, on exploite l'aptitude de la cellule à émettre de la fluorescence lors de son passage dans le faisceau laser par excitation de fluorochromes fixés directement ou indirectement sur l'ADN. L'iodure de propidium est un fluorochrome qui se fixe sur l'ADN et dont le taux de fixation est directement lié à la quantité d'ADN, il

émettra donc une quantité de fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans le noyau.

Les cellules sontensemencées à une densité de 150×10^3 cellules/puits (MG63, MOS-J et POS-1) ou 200×10^3 cellules/puits (OSRGA) dans 2 ml de milieu. Après adhérence, les cellules sont incubées en présence d'Imatinib à différentes concentrations (de 0 à 40 μM) pendant 36 ou 48 h. L'analyse du cycle cellulaire se faisant sur la totalité des cellules présentes dans les puits de culture, les cellules adhérentes et présentes dans le surnageant sont récupérées. L'ensemble est ensuite transféré dans des tubes eppendorf de 1,5 ml. Une centrifugation à 800 g pendant 5 min précède l'ajout de 0,5 ml d'éthanol à 70% sur le culot. Après 30 min de fixation à 4°C une nouvelle centrifugation à 800 g pendant 5 min est effectuée puis le culot est rincé avec 300 μl de DPBS. Une centrifugation à 800 g pendant 5 min est de nouveau effectuée, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 50 μl de PC (tampon phosphate-citrate). L'ensemble est incubé 30 min à température ambiante puis centrifugé à 1000 g toujours pendant 5 min. Le surnageant est encore éliminé avant rinçage au PIB-RNase (DPBS + Triton X100 + EDTA 0,5 M). Une incubation de 30 min à 37°C est réalisée avant l'ajout final de 50 μg de IP par tube. Une dernière incubation de 20 min à 4°C est entreprise avant l'analyse au cytomètre (Cytomics™ FC500, Beckman Coulter). L'analyse des résultats est faite à l'aide du logiciel Multicycle DNA content.

4 - Coloration Hoechst

La coloration Hoechst 33258 (Sigma) permet d'observer par microscopie l'ADN marqué des cellules. Ainsi, l'état d'une cellule est visible (mitose, mort ...). Les cellules sontensemencées en plaque 24 puits (150 000cellules/puits MG63, MOS-J, POS-1 et 200 000 cellules/puits OSRGA). 48 h après traitement ou non par l'Imatinib, les cellules sont lavées au DPBS puis colorées pendant 30 min (solution DPBS-Hoechst : 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Le fluorochrome est excité par les UV à 350 nm. La fluorescence (461 nm) est observée au microscope à fluorescence Leica.

5 - Test d'activité caspase 3

Ce test est utilisé dans le but de déterminer si l'induction de la mort par l'Imatinib met en jeu la caspase 3, effectrice de l'apoptose, qui reflète directement le déclenchement de l'apoptose. L'activité de la caspase 3 se mesure par une technique fluorimétrique utilisant le kit CaspACE™ Assay System Fluorometric (Promega corporation). Le substrat CPP32/caspase 3 marqué avec un fluorochrome est clivé et libéré lorsque la caspase 3 est

activée. La fluorescence, proportionnelle à la quantité de substrat clivé, peut alors être détectée à 460 nm. Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à raison de 150×10^3 (MG63, MOS-J et POS-1) ou 200×10^3 (OSRGA) cellules par puits et cultivées pendant 24 h dans du milieu supplémenté avec 5% de SVF. L'Imatinib est ensuite ajouté ou non au milieu à différentes concentrations. Un contrôle positif est réalisé avec $1 \mu\text{M}$ de staurosporine pendant 6 h. Les lysats cellulaires sont récupérés après 48 h de traitement en utilisant le tampon de lyse (RIPA) puis dosés à l'aide de BCA/copper II sulfate (Bicinchoninic acid, Sigma). Ce test est réalisé en plaque à fond noir 96 puits, 98 μl de mélange réactionnel (tampon caspase, DTT 100mM, eau distillée, lysat ou tampon de lyse) étant ajoutés dans chaque puits. La plaque couverte avec du parafilm est ensuite incubée 30 min à 37°C puis 2 μl de substrat CPP32 à 2,5 mM sont ajoutés dans chaque puits. Après une nouvelle incubation d'une heure à 37°C de la plaque couverte, l'absorbance est lue au spectrophotomètre ($\lambda = 460 \text{ nm}$).

6 - Test de migration

Le test de migration met en jeu la mitomycine C à $4 \mu\text{g/ml}$ (Sigma) qui bloque la prolifération, permettant ainsi d'étudier uniquement l'impact de l'Imatinib sur la migration cellulaire. Elle est utilisée en pré-traitement pendant 1 h. Les cellules sont mises en culture en plaque 6 puits, 400 000 cellules par puits (OSRGA) et 300 000 cellules par puits pour les trois autres lignées. Lorsque les cellules sont à confluence, un trait est tiré dans chaque puits à l'aide d'un cône stérile, le milieu est alors enlevé et remplacé par du milieu avec les différentes conditions de traitements (Imatinib, mitomycine C). Des photos sont prises aux temps 0 et 24 h avec le microscope Leica.

C - Analyse transcriptionnelle de l'expression des gènes d'intérêts

L'expression des différents récepteurs à activité TK au niveau transcriptionnel a été recherchée par Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) et comparée au gène de référence 18S. La technique de RT-PCR consiste dans un premier temps en l'extraction des ARN totaux exprimés par la cellule dans des conditions données, puis ces ARN sont rétrotranscrits en ADN complémentaires (ADNc) afin d'amplifier par PCR les différents gènes d'intérêt et ainsi d'évaluer leur niveau d'expression respectif.

1 - Extraction des ARN totaux

L'extraction permet d'isoler les ARN totaux des cellules. Elle est réalisée à partir de cellules (200×10^3) cultivées en plaque 6 puits à l'aide du kit NucleoSpin[®]RNAPII (Macherey

Nagel). Les cellules sont lysées avec 350 µl de tampon RA1 additionné de 1% de β-mercaptoéthanol (BME, Sigma). Le lysat est ensuite transvasé dans un eppendorf. 350 µl d'éthanol à 70% sont ajoutés pour débiter la précipitation des acides nucléiques. L'ensemble de l'eppendorf est transvasé sur une colonne d'extraction qui va fixer les ARN. La colonne est lavée par 350 µl de MDB afin d'éliminer les sels de la membrane de silice. Afin de détruire l'ADN génomique résiduel, un traitement par 95 µl de *DNaseI* est effectué pendant 15 min. Trois lavages sont réalisés par respectivement 200 µl de RA2, 600 µl de RA3 et 250 µl de RA3 afin de purifier les ARN fixés à la membrane. Pour finir, les ARN sont élués par 40 µl de *RNase Free Water* par centrifugation. La concentration en ARN extraits est ensuite mesurée au Nano Drop, le rapport DO_{260}/DO_{280} doit être compris entre 1,8 et 2 (pureté de l'échantillon).

2 - Reverse-transcription (RT)

5 µg d'ARN totaux extraits sont mis en présence de 1 µl d'un mélange d'amorces aléatoires à 500 µg/ml dans de l'eau stérile (qsp 30 µl). L'ARN subit une dénaturation pendant 5 min à 95°C suivie d'une hybridation des amorces à 65°C pendant 10 min. 20 µl de mélange réactionnel composé de tampon 5X, 10 mM de dithiotéïtol (DTT), 0,5 mM de désoxyribonucléides tri-phosphate (dNTP), 20 U d'inhibiteur des RNAses (RNAsine) et 400 U de Murine Moloney Leukemia Virus-Reverse transcriptase (MMLV-RT, Sigma) sont ajoutés. La réaction de réverse transcription de l'ARN en ADN complémentaire s'effectue à 37°C pendant 1 h.

3 - Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR est utilisée pour réaliser une amplification spécifique d'un fragment d'ADN précis (Protéine à activité tyrosine kinase : potentielle cible de l'Imatinib), même si celui-ci est présent en faible quantité dans le mélange initial. Cette technique utilise de manière répétitive l'une des propriétés des ADN polymérase : pouvoir synthétiser le brin complémentaire d'un ADN matrice à partir d'un couple d'amorces spécifiques du gène recherché. L'enzyme utilisée est la Taq polymérase, une ADN polymérase thermorésistante dont la température optimale d'action est de 72°C, mais qui est capable de résister à des passages successifs à 95°C (ce qui rend possible l'automatisation de la réaction). La Taq polymérase permet l'élongation de l'ADN à partir de deux amorces sens et antisens (tableau 1) encadrant la séquence d'ADN à amplifier. La synthèse des brins d'ADN complémentaires

est réalisée avec les éléments de base que sont les dNTPs. Une PCR correspond à la succession de plusieurs cycles comportant chacun 3 étapes :

- La dénaturation de la matrice d'ADN double brin à 95°C
- L'hybridation des amorces de 50°C à 65°C (selon les amorces)
- L'élongation des brins complémentaires à 72°C par la Taq polymérase (Eurobio, France)

Au fil des cycles la quantité d'ADN doubles brins bornés par les amorces augmente de façon exponentielle, en théorie 2^n copies pour n cycles de PCR.

La solution utilisée pour la PCR est constituée :

- 2µL de produits de RT obtenus précédemment
- 48µL de milieu réactionnel pour PCR qui diffère selon l'enzyme utilisée.

Une fois la PCR terminée, les produits qui en sont issus peuvent être conservés à 4°C.

organisme	amorces		séquences	Taille amplicon
Humain	Abl	sens	AGT CTG GAG AAA CAC TCC TGG T	323
		anti-sens	ACA CCA TAG ACA GTG GGC TTG T	
	c-KIT	sens	GGA AGC CCT CAT GTC TGA ACT	403
		anti-sens	GTC TTC TAA GTC TAG GGC CAA CTC	
	c-fms	sens	TGA CGT TTG AGC TCA CCC TTC GAT	675
		anti-sens	ATC TTC ACA GCC ACC TTC AGG ACA	
	PDGFRa	sens	AAG ATA ATG ACT CAC CTG GGG	495
		anti-sens	AGC CAA AAA CTC CAT TCC TCG	

	PDGFRb	sens	AGG TGA TTG AGT CTG TGA GC	630	
		anti-sens	TAT CGT AAG GGG CCA TGT AG		
Souris	Abl	sens	ATG AAG GGA GGG TGT ACC ACT A	396	
		anti-sens	CCA GGT TAG GGT GTT TGA TCT C		
	c-KIT	sens	GAG GAG ATC CGC AAG AAT AGA C	355	
		anti-sens	CCC ATA GGA CCA GAC ATC ACT T		
	c-fms	sens	AAC AAG TTC TAC AAA CTG GTG AAG G	752	
		anti-sens	GAA GCC TGT AGT CTA AGC ATC TGT C		
	PDGFRa	sens	AAG ATA ATG ACT CAC CTG GGG	495	
		anti-sens	AGC CAA AAA CTC CAT TCC TCG		
	PDGFRb	sens	AGG TGA TTG AGT CTG TGA GC	630	
		anti-sens	TAT CGT AAG GGG CCA TGT AG		
	rat	Abl	sens	TGG TCT CAG TTT CTC CCT ACC T	487
			anti-sens	CCC CTA TCT TTG TCT CTC CAT C	
c-KIT		sens	GAG AAG CAG ATC TCA GAC AGC A	267	
		anti-sens	TAC CCT GGA GTA GGA TGC AAG T		

	c-fms	sens	GGA GCC TAC CAA AAG ACC TAC CT	577
		anti-sens	CTC ACC TAC AAC CTG AGA CCT GT	
	PDGFRa	sens	CAG GTC TAG TGA GAA GCA AGC TC	382
		anti-sens	CGA TCT CTG GAT GTC GGA GTA	
	PDGFRb	sens	GGT ACG TGT GAA GGT GTC AGA AG	275
		anti-sens	GGC TCT CCT CCT TGG AAC TAT T	
Gène de référence	18S	sens	TCA AGA ACG AAA GTC GGA GGT TCG	462
		anti-sens	TTA TTG CTC AAT CTC GGG TGG CTG	

Tableau I : séquences des primers utilisés pour la PCR. Chaque couple de primers est utilisé à une T_m (Température d'hybridation) de 56°C. La séquence référence est validée pour les trois espèces.

4 - Migration sur gel d'agarose

Un gel d'agarose à 1% est réalisé pour déterminer la présence ou non des séquences recherchées. 5 µl de bleu de chargement sont ajoutés à chaque échantillon de PCR, puis ce mélange est déposé dans le gel, préalablement immergé dans du Tris-acétate-EDTA (TAE) 1X dans la cuve à électrophorèse. Un marqueur de taille (Invitrogen) est déposé dans un puits voisin. Après migration pendant environ 1 h à 100V, le gel est déposé dans du gel RED (Biotium) et la bande représentant l'ARNm rétrotranscrit et amplifié est visualisée sous UV (InGenius, Syngene) grâce au gel RED qui s'intercale dans l'ADN et qui émet une fluorescence visualisable sous UV. Les résultats sont analysés grâce au logiciel GeneSnap (Syngene).

D - Effets de l'Imatinib Mésylate sur les voies de signalisations impliquant les récepteurs à activité TK

La technique de Western Blot permet de détecter le niveau d'expression d'une protéine ou son état de phosphorylation. Ainsi, sous l'effet des différentes concentrations d'Imatinib à différents temps, nous étudierons les variations de phosphorylations reflétant l'activation des certaines protéines de différentes voies métaboliques. Tout d'abord, les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10% en fonction de leur poids moléculaire. Les molécules séparées sont ensuite transférées sur une membrane de PDVF (polyfluorure de vinylidène, Immobilon™, Millipore) puis une révélation de la protéine recherchée est réalisée à l'aide d'un anticorps spécifique.

Les cellules, après différentes conditions de traitement, sont lysées par incubation dans un tampon de lyse (RIPA) 30 min à 4°C. Les lysats cellulaires sont ensuite collectés en tubes eppendorf puis centrifugés à 12×10^3 g pendant 10 min à 4°C. Les lysats obtenus sont alors conservés à -20°C. Le dosage protéique permet de déterminer la quantité de protéines contenue dans chaque échantillon et est réalisé selon la technique BCA. Pour cela, dans une plaque 96 puits, 10 µl de lysat cellulaire ou d'une gamme étalon de BSA sont mis en présence de 200 µl de réactif BCA (sulfate de cuivre dilué au 1/50^{ème} dans une solution d'acide bicinchoninique ; Sigma). Après 30 min d'incubation, les densités optiques sont lues à 570 nm. La migration électrophorétique s'effectue dans un gel composé de deux parties : le gel de séparation surmonté du gel de concentration. Les lysats cellulaires, dilués au demi dans le bleu de chargement et portés à ébullition pendant 5 min, sont chargés dans les puits du gel dénaturant à 10% d'acrylamide ainsi que 5 µl de marqueur de poids moléculaire (Bio-Rad). La migration est réalisée dans un tampon dénaturant avec une intensité de 10 mA par gel pour le gel de concentration puis de 20 mA par gel pour le gel de séparation. Les protéines qui ont préalablement été séparées par électrophorèse sont transférées sur une membrane de PVDF. Pour cela, les gels d'électrophorèse au contact des membranes de PVDF sont placés dans une cuve de transfert contenant du tampon de transfert. Le transfert se fait sur une période de 16 h avec un courant de 40 mA. Une coloration au Rouge Ponceau [Ponceau S (2%), acide trichloroacétique (30%), acide sulfosalicylique (30%), Sigma] est réalisée afin de vérifier si le transfert s'est réalisé correctement. La membrane est ensuite rincée sous agitation rapide dans le tampon de lavage. Puis, suite à une étape de saturation dans la solution de saturation 1 (tampon de lavage-BSA 3%), la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire spécifique de la protéine à mettre en évidence durant une nuit à 4°C. Les anticorps utilisés,

mTor (mammalian Target of rapamycin), P-mTor (Ser2448), Akt, P-Akt (Ser473) et l'Actine, proviennent de Cell Signaling (P pour protéine Phosphorylée). Après lavages, la membrane est soumise à une deuxième étape de saturation dans la solution de saturation 2 (tampon de lavage-lait 5%) puis à l'incubation de 1 h avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation se fait en incubant la membrane 5 min dans une solution ECL (BM chemiluminescence blotting substrate, Roche) contenant le substrat de l'enzyme peroxydase, le luminol. Le résultat du blot est visualisé grâce à la G-box (Syngene). Pour chaque protéine, une exposition de quelques secondes à une heure est choisie de façon à obtenir un signal visible mais non saturé et l'analyse des résultats se fait grâce au logiciel GeneSnap (Syngene).

E - Effet de l'Imatinib dans des modèle d'ostéosarcome

Afin de valider l'effet observé *in vitro* de l'imatinib sur la prolifération des lignées cellulaires d'ostéosarcome, différents modèles d'ostéosarcome murin mimant la pathologie humaine ont été réalisés.

1- Modèle d'ostéosarcome murin MOS-J

Des souris mâles C57BL/6J (élevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) âgées de 4 semaines sont utilisées pour les expérimentations *in vivo*. Les tumeurs sont induites par injection en sous-cutanée de 4×10^6 de cellules MOS-J reprises dans 50 μ l de DPBS au niveau du tibia de l'animal (anesthésie par isoflurane). Une tumeur apparait 8 jours après l'injection de ces cellules au niveau du tibia.

2 – Modèle d'ostéosarcome murin POS-1

La lignée POS-1 est dérivée d'un ostéosarcome qui s'est développé spontanément dans la souche murine C3H/HeN. Les souris C3H/HeN âgées de quatre semaines (élevage janvier) subissent une injection par voie sous-cutanée dans le coussinet plantaire gauche de 2.10^6 cellules tumorales POS-1 dans 50 μ L de PBS. Suite à cette injection, les souris développent en 14 jours une tumeur primitive au site d'injection. Un fragment d'environ $2 \times 2 \times 2$ m^3 de la tumeur primitive est ensuite transplanté chez des souris de même souche au contact du tibia (en site paratibial), après avivement du périoste, induisant le développement d'un ostéosarcome ostéolytique en 20-25 jours et des métastases pulmonaires.

2 - Protocole expérimental

L'effet de l'Imatinib a été étudié dans ces différents modèles d'ostéosarcome soit dans le cadre d'un traitement curatif soit dans le cadre d'un traitement préventif.

Quatre groupes sont constitués : un groupe contrôle (eau stérile) et 3 concentrations d'Imatinib: 25 mg/kg, 50 mg/kg et 100 mg/kg. Les souris sont traitées par gavage de 200 µl tous les jours. Dans le cadre du traitement dit de prévention, les gavages journaliers commencent le lendemain de la mise en route du modèle alors que dans le cadre du traitement curatif, le traitement par gavage commence lorsqu'un volume tumoral est mesurable c'est-à-dire 7 jours après le début du modèle.

3 - Mesure du volume tumoral

La mesure de la tumeur selon deux axes perpendiculaires permet de calculer le volume tumoral suivant la formule :

$$\text{Volume tumoral : } \frac{L \times l^2}{2} \quad L = \text{plus grand axe ; } l = \text{petit axe}$$

Le volume tumoral est mesuré tous les 2 jours avec un pied à coulisse.

4 - Radiographie

La radiographie des tibias des souris développant une tumeur MOS-J permet d'observer les dégradations et formations osseuses, en vérifiant notamment les propriétés ostéogéniques des tumeurs MOS-J. Les pattes avec tumeurs et controlatérales sont récupérées après sacrifices des animaux et directement placées dans le Formol afin de les fixer.

5 - Microscanner

L'analyse microscanner permet d'étudier l'architecture osseuse grâce à la reconstruction en 3 dimensions. L'acquisition de chaque patte est réalisée grâce au microscanner Skyscan 1076 (Micro Photonics Inc.) et le logiciel utilisé est le logiciel Skyscan. La caméra prend des images tous les 0,7°, la résolution des images est de 18 microns. Le logiciel NRecon permet de convertir les images obtenues afin de les analyser grâce aux logiciels CTAnt et ANT.

F - Statistiques

Afin de déterminer si l'efficacité de la molécule utilisée (Imatinib) est significative, des tests ANOVA ont été réalisés, ainsi que des post-test de Bonferroni (comparaisons multiples). Le taux minimal de significativité retenu est $p < 0,05$.

RESULTATS

A - Effets de l'Imatinib sur la prolifération cellulaire des différentes lignées d'ostéosarcome

Les lignées d'ostéosarcome (MG63, OSRGA, MOS-J et POS-1) ont été cultivées pendant 72 h en présence d'Imatinib. L'effet sur la viabilité cellulaire a été étudié à l'aide d'un test colorimétrique au XTT. Les résultats montrent que l'Imatinib réduit la viabilité cellulaire de toutes les lignées étudiées et que son effet est dépendant de la dose (figures 1). La viabilité des cellules OSRGA est réduite dès l'addition de 1 μM d'Imatinib dans les cultures cellulaires. Quinze μM d'Imatinib réduisent significativement la viabilité des cellules MG63 de 55% et des cellules POS-1 de 50%. Enfin, 20 μM d'Imatinib réduisent la viabilité des cellules MOS-J de 75%. Les différentes lignées cellulaires présentent une sensibilité différente vis-à-vis de cet agent thérapeutique, les cellules les plus sensibles sont les cellules OSRGA et les moins sensibles sont les cellules MOS-J. Les IC₅₀ (IC₅₀ = concentration qui inhibe 50% de l'effet maximal) sont de 8 μM (OSRGA), 15 μM (POS-1), 23 μM (MG63) et 24 μM (MOS-J) (figure 1).

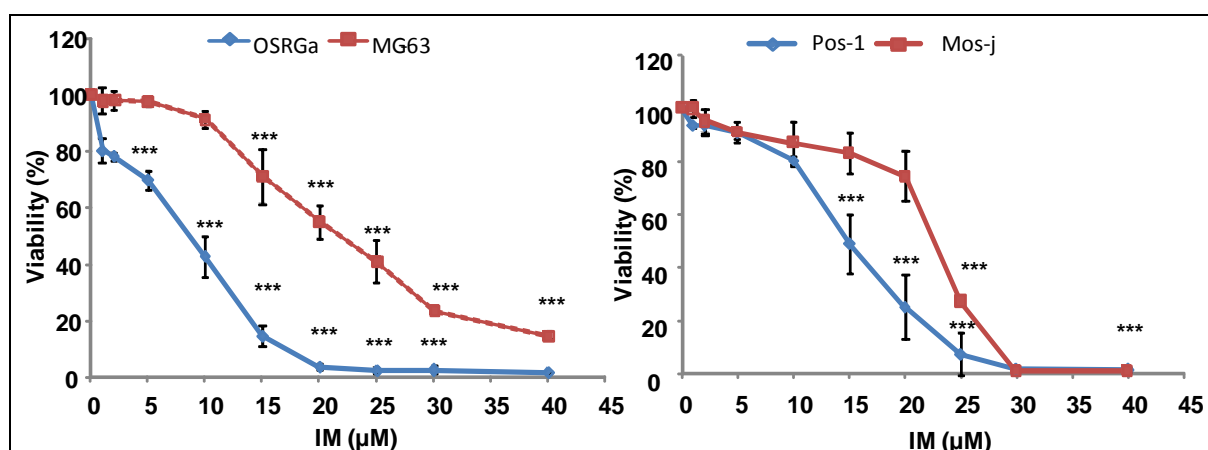


Figure 1 : L'Imatinib inhibe significativement la viabilité cellulaire des lignées d'ostéosarcome. *** : test Anova $p < 0,0001$ suivi du test de Bonferroni (multiples comparaisons) $p < 0,001$

Aucun effet n'a été observé pour des faibles doses d'Imatinib (1 à $10 \cdot 10^3$ pM) sur la viabilité cellulaire de ces cellules (figure 2).

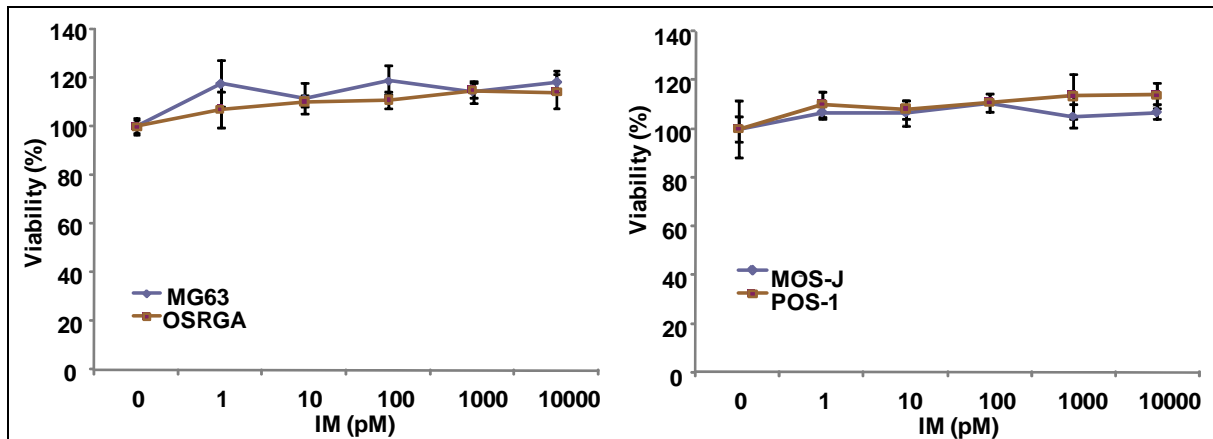


Figure 2 : Aucun effet de l'Imatinib à faible concentration n'a été observé sur la viabilité cellulaire des lignées d'ostéosarcome.

Afin de déterminer de façon précise les cinétiques d'action de l'Imatinib, une analyse en microscopie time lapse a été réalisée pendant 72 h, le nombre de divisions cellulaires et de cellules mortes ont alors été comptés manuellement. Dans toutes les lignées cellulaires étudiées, l'Imatinib (de 20 à 40 μM) réduit le nombre de division cellulaire comparativement aux cellules contrôle non traitées (figure 3). De plus, l'Imatinib augmente significativement la mort de cellules d'ostéosarcome et l'augmentation de la dose accélère ce processus. En effet, sur les cellules MOS-J par exemple, 30 μM d'Imatinib induit la mort de cellules dès 11h de traitement alors que 20 μM ne fait apparaître une mort cellulaire que vers les 26h de traitement, ainsi une forte dose permet d'atteindre plus rapidement une mort totale des cellules évitant ainsi l'émergence de résistance métabolique à cet agent (figure 3).

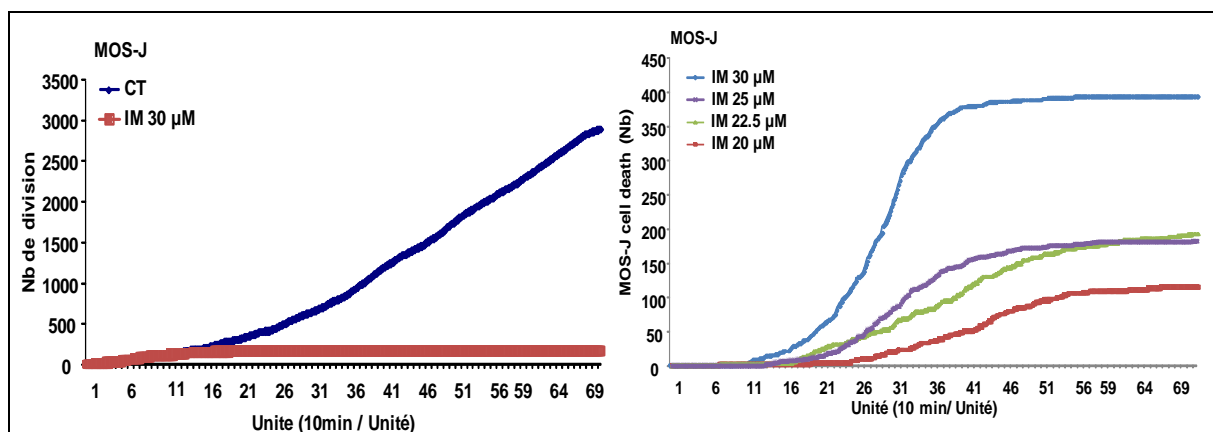


Figure 3 : L'Imatinib réduit significativement le nombre de division cellulaire et induit une mort cellulaire plus rapide dépendant de la dose sur les cellules MOS-J.

Le même profil est observé dans toutes les autres lignées cellulaires étudiées avec des sensibilités qui diffèrent selon les lignées (figure 4).

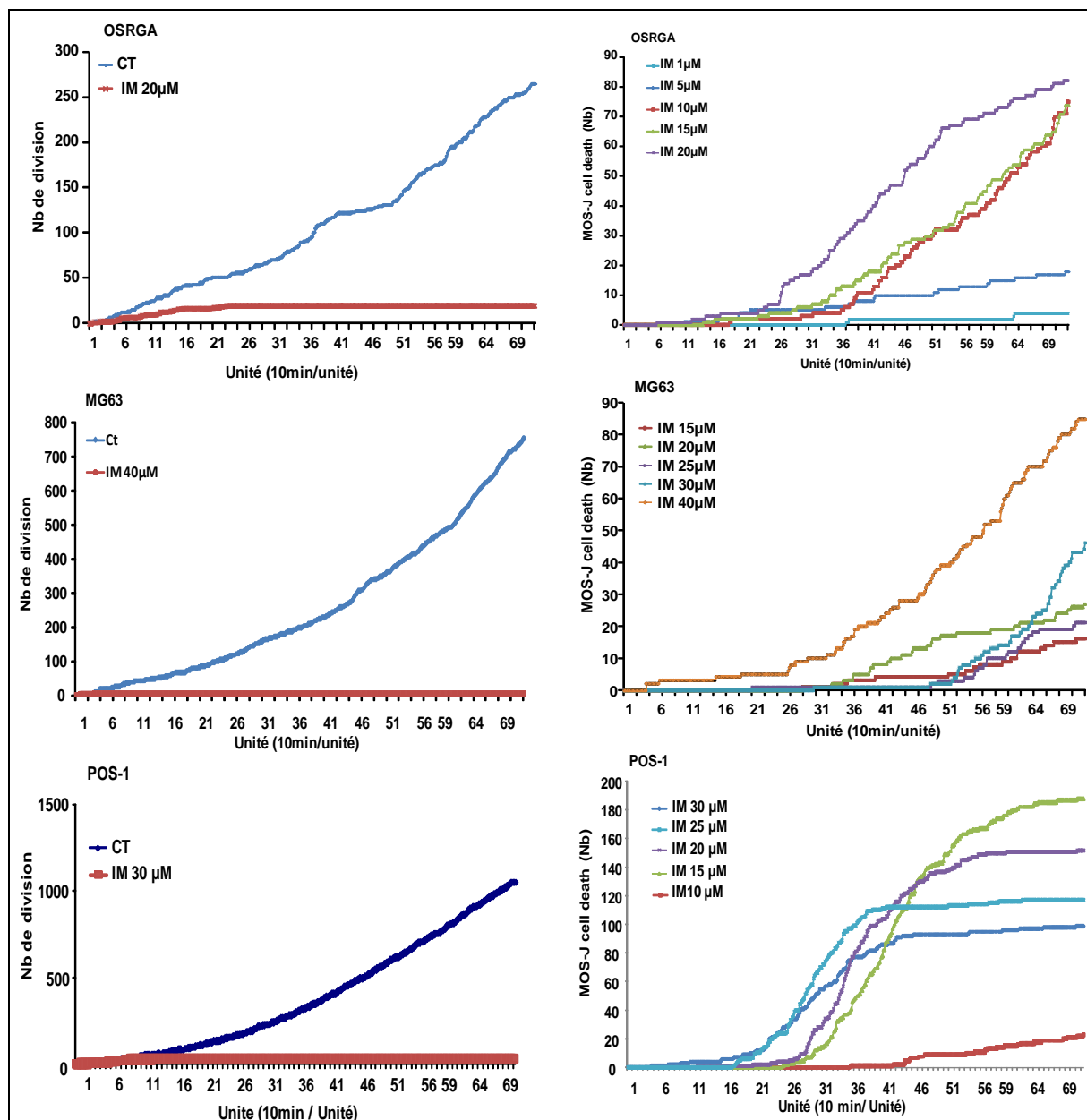


Figure 4 : L'imatinib induit une diminution significative des divisions cellulaires et augmente la mort cellulaire dans les lignées d'ostéosarcome OSRGA, MG63 et POS-1.

L'Imatinib a donc un effet inhibiteur sur la division des cellules d'ostéosarcome (effet anti-prolifératif) ainsi qu'un effet sur la mort cellulaire, ses effets sont dépendants de la dose utilisée.

Afin de mieux comprendre les effets de l'Imatinib, des tests de migration cellulaire ont été réalisés après traitement des cellules par 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mitomycine C (figure 5). En présence

de mitomycine C seule, alors que les cellules ne se divisent plus, l'espace du puits exempt de cellule est progressivement envahi par les cellules tumorales montrant ainsi leur capacité de migration. Dans les conditions de traitement où l'Imatinib est associée à la mitomycine C (4 µg/ml), l'Imatinib inhibe la migration des cellules MG63, POS-1 et OSRGA (figure 5).

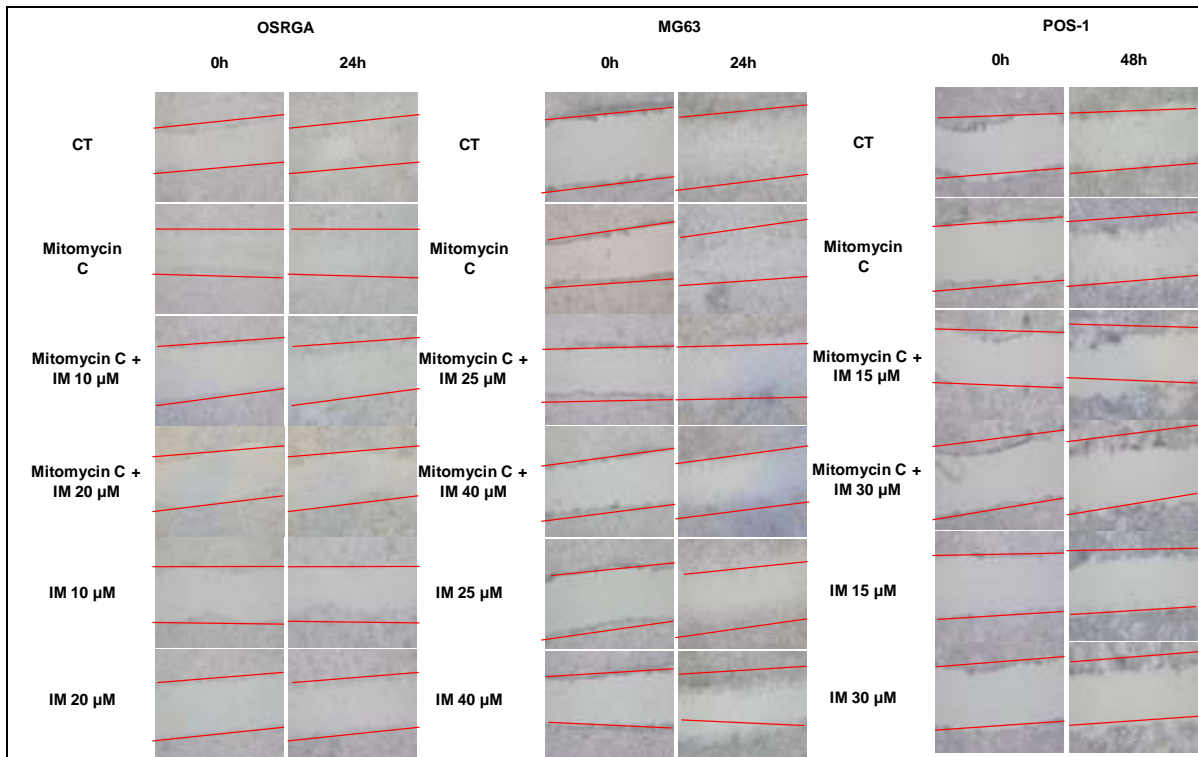


Figure 5 : L'Imatinib inhibe la migration cellulaire et la prolifération cellulaire des lignées OSRGA, MG63 et POS-1. Les barres rouges représentent les zones de rupture du tapis cellulaire au début de l'expérience afin d'observer l'effet de l'Imatinib.

De plus, l'Imatinib seul étaye les résultats obtenus en XTT et en analyse time lapse, à savoir inhibe la prolifération cellulaire du fait de la non migration des cellules traitées seulement avec l'Imatinib (figure 5). Pour les cellules MOS-J, 20 µM d'Imatinib limitent la migration cellulaire mais ce résultat n'est pas aussi significatif que les précédents du au fait que la division de ces cellules est beaucoup plus rapide que les autres lignées (figure 6).

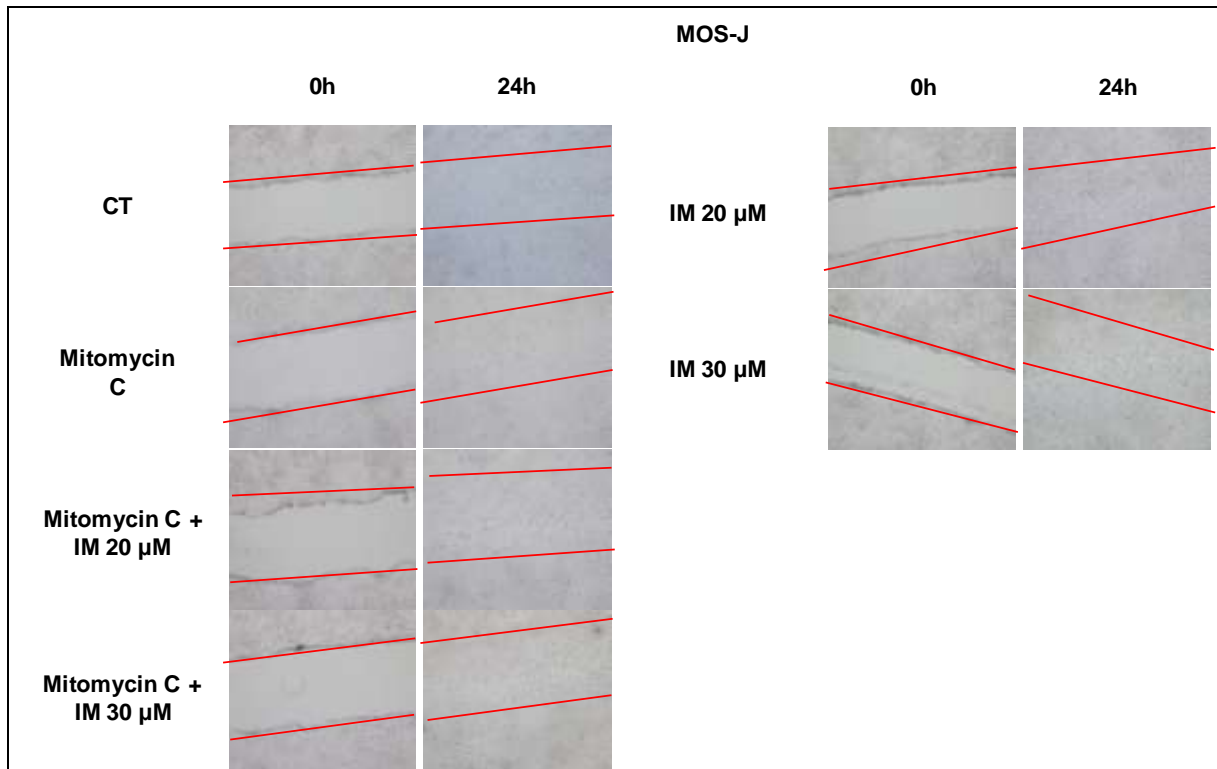


Figure 6 : L'imatinib limite la migration cellulaire des cellules MOS-J. Les barres rouges représentent les zones de rupture du tapis cellulaire au début de l'expérience afin d'observer l'effet de l'Imatinib.

B - Effet de l'Imatinib sur le cycle cellulaire des cellules d'ostéosarcomes

L'étude de la répartition des cellules d'ostéosarcome dans les différentes phases du cycle cellulaire a été réalisée sur des cellules cultivées pendant 48 h, en présence ou non d'Imatinib.

Après 36 h de traitement, pour les cellules MG63, alors que 25 μM d'Imatinib n'induit aucune modification des phases du cycle cellulaire, 40 μM d'Imatinib augmentent le pourcentage de cellules en phase S (21 à 32%) ainsi que le pourcentage des débris cellulaires (2 à 16%) (figure 7). Ce phénomène s'intensifie à 48 h (21,5 à 40% pour la phase S et 1,5 à 30% pour les débris cellulaires) en présence de 40 μM d'Imatinib. Les observations pour les cellules MOS-J (figure 7) sont similaires : 30 μM d'Imatinib induisent un blocage en phase S (42 à 65 % à 36 h, 43 à 55 % à 48 h) ainsi qu'une augmentation des débris cellulaires (5 à 26 % à 36 h, 2,7 à 40 % à 48 h). Ce blocage du cycle cellulaire est dépendant de la durée du traitement. Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules OSRGA et POS-1 sur lesquelles 40 et 30 μM d'Imatinib respectivement induisent un blocage du cycle cellulaire en

phase S [42 à 65% (OSRGA) et 21,5 à 40% (POS-1)] et une augmentation du pourcentage des débris cellulaires [5 à 26% (OSRGA) et 1,5 à 30% (POS-1)] après 48 h de traitement (données non montrées).

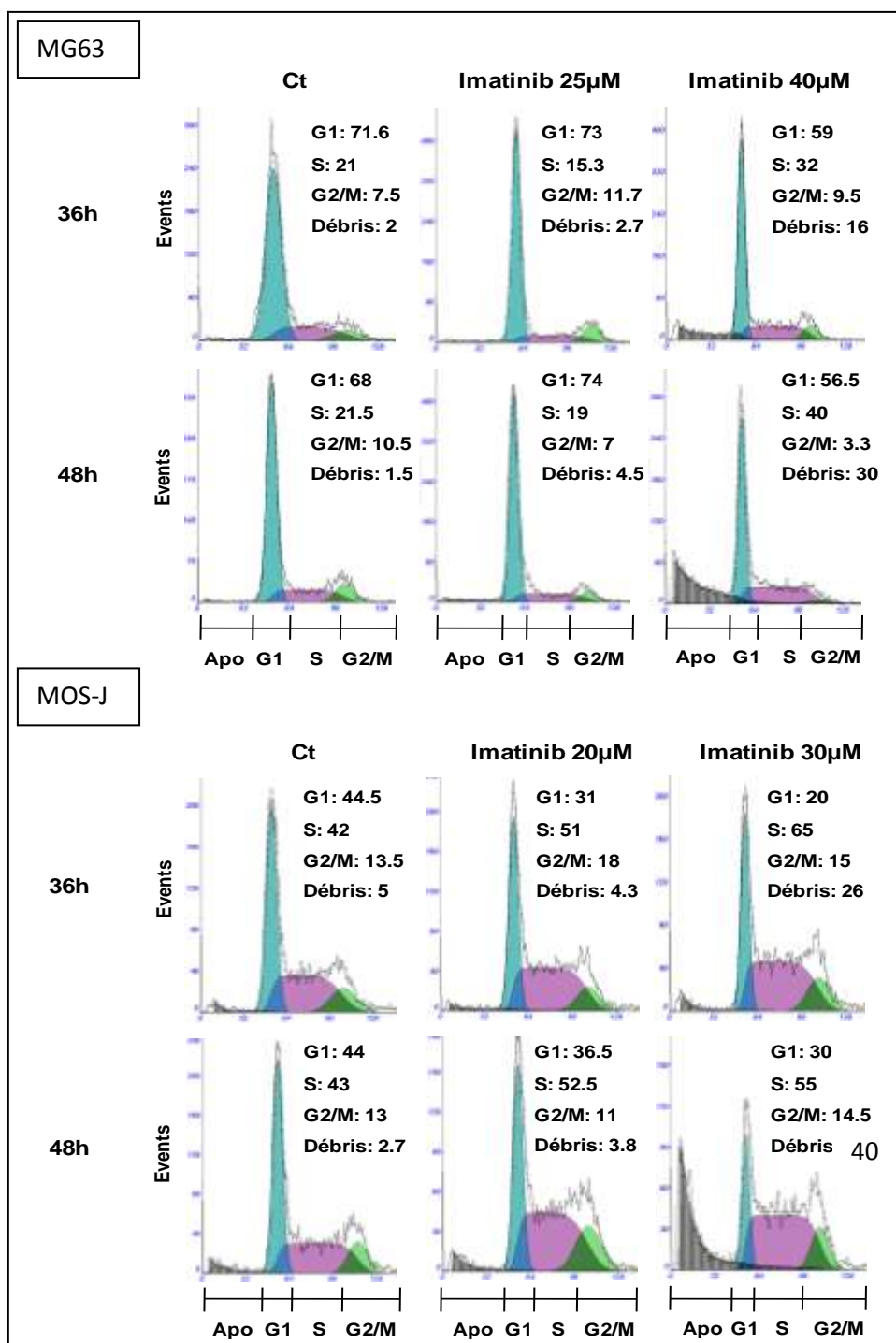


Figure 7 : L'imatinib induit une accumulation des cellules MG63 et MOS-J en phase S du cycle cellulaire.

C - Effet de l'Imatinib sur la mort des cellules d'ostéosarcome

Différents tests ont été réalisés sur les cellules d'ostéosarcomes afin de mettre en évidence l'induction de la mort cellulaire par l'Imatinib.

La première étude effectuée est une coloration Hoechst, permettant d'observer l'état de l'ADN nucléaire. Le traitement des différentes lignées cellulaires d'ostéosarcome par l'Imatinib (pendant 48h) induit une fragmentation nucléaire, révélatrice de mort cellulaire (figure 8). Afin de caractériser la mort cellulaire induite par l'Imatinib, une mesure de l'activité caspase 3 a été réalisée suite au traitement. Des doses croissantes d'Imatinib induisent une augmentation de l'activité caspase 3 dans toutes les lignées cellulaires étudiées (augmentation de 6 fois de l'activité caspase 3 par 40 μM d'Imatinib versus le contrôle dans les cellules MG63) (figure 8).

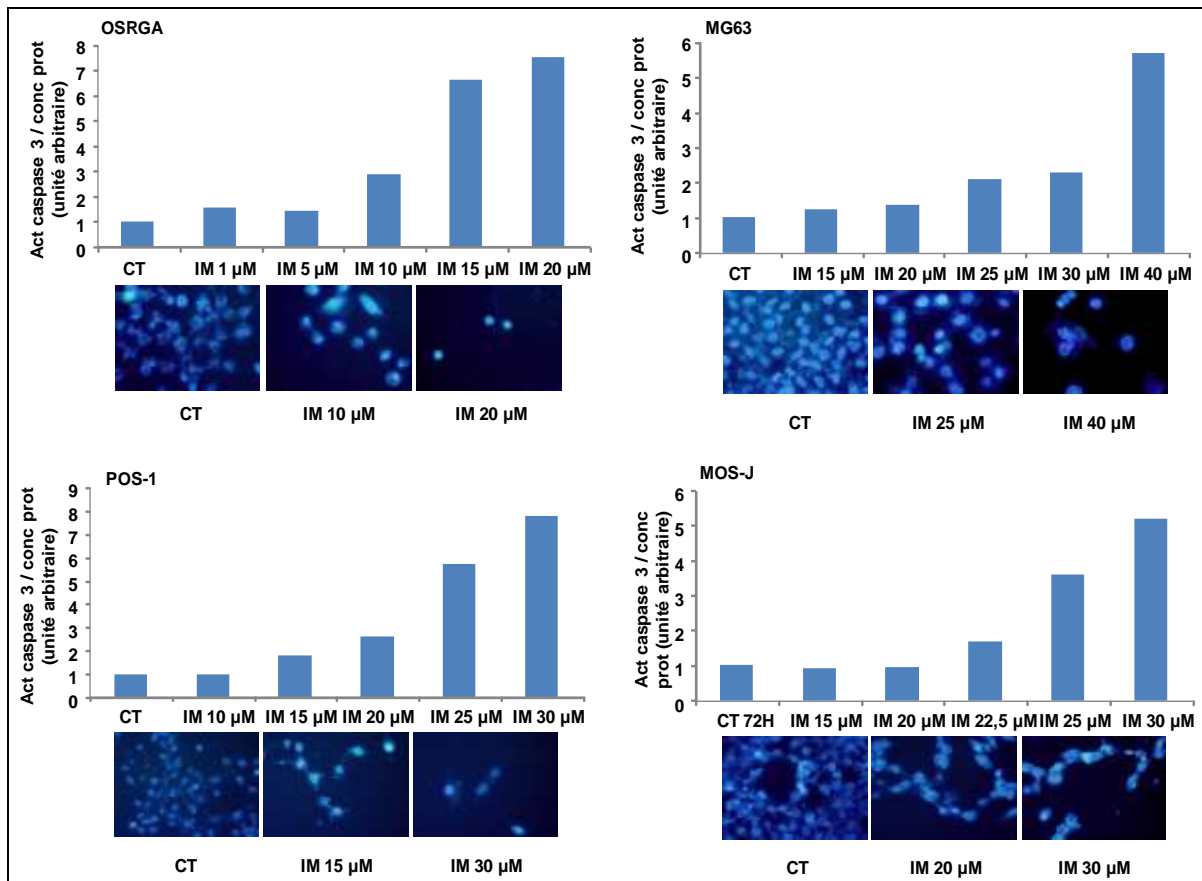


Figure 8 : L'Imatinib induit une fragmentation nucléaire suite à une coloration Hoechst (X400) et une activation de la caspase 3.

Dans le but de confirmer l'implication de la caspase 3 dans les mécanismes de mort induits par l'Imatinib, des expériences similaires ont été réalisées en présence de Z-VAD. Le Z-VAD réduit partiellement la mort cellulaire induite par l'Imatinib (figure 9) alors que le Z-VAD n'a aucun effet sur la viabilité cellulaire aux doses utilisées (données non montrées). En effet, 40 μ M d'Imatinib induisent 80% de mort des cellules MG63 alors qu'un co-traitement avec 50 μ M de Z-VAD n'induit que 60 % de mort cellulaire (figure 9). Pour les cellules MOS-J, 20 μ M d'Imatinib induisent 90 % de mort cellulaire contre 75 % de mort cellulaire avec le co-traitement Imatinib (20 μ M)/Z-VAD (100 μ M). L'Imatinib induit donc la mort cellulaire des lignées d'ostéosarcome par l'intermédiaire de la caspase 3.

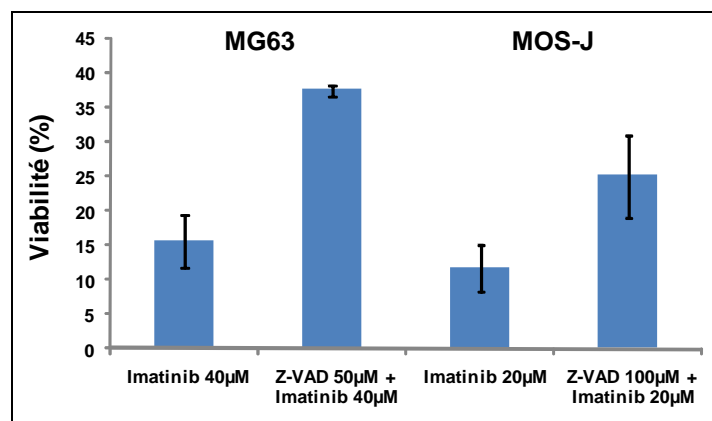


Figure 9 : L'utilisation du Z-VAD permet de mettre en évidence l'implication de la caspase 3 dans le mécanisme de mort cellulaire induit par l'Imatinib.

D - Analyse transcriptionnelle de l'expression des gènes d'intérêts

Plusieurs protéines à activité tyrosine kinase sont des cibles connues de l'Imatinib : c-fms (récepteur du M-CSF) (Dewar et al, 2005a), c-KIT (récepteur du SCF) (Buchdunger et al, 2000), PDGF récepteur a et b (récepteur au PDGF) (Buchdunger et al, 2000) ainsi que la protéine Abl (Mauro et Drucker, 2001). L'expression de ces différentes protéines a été analysée par PCR semi-quantitative (figure 10).

Les cellules MG63, MOS-J et POS-1 expriment les gènes codant pour PDGFRa, PDGFRb et Abl. Elles n'expriment pas les gènes codant pour c-KIT et c-fms. Les cellules OSRGA expriment les gènes codant pour Abl, PDGFRa et PDGFRb mais également le gène codant pour c-KIT, contrairement aux trois autres lignées cellulaires. Les cellules OSRGA n'expriment pas le gène codant pour c-fms (figure 10).

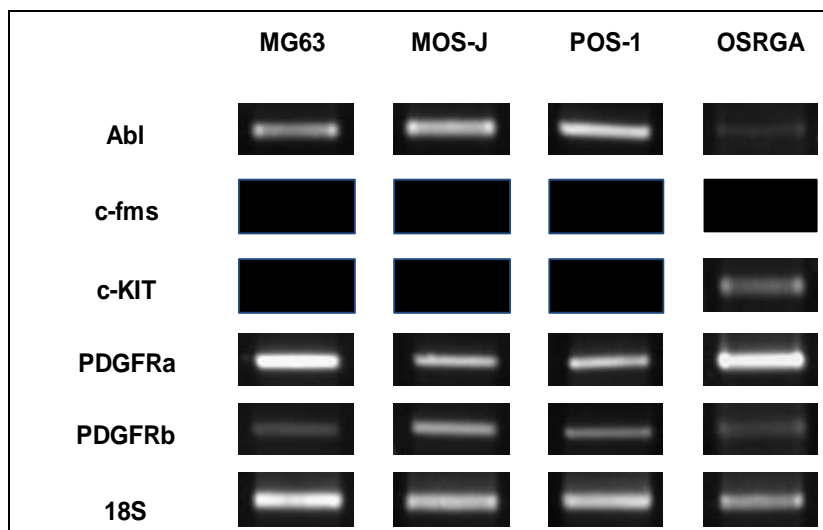


Figure 10 : Expression des gènes codant pour certaines protéines à activité tyrosine kinase potentiellement cible de l'Imatinib. Les rectangles noirs montrent l'absence de l'expression du gène.

E - Etude des voies de signalisations associées aux récepteurs TK, cibles de l'Imatinib

Trois voies de signalisations sont associées à l'activation des récepteurs c-KIT, PDGFRa et PDGFRb : PI3K (phosphatidyl-inositol-3-kinase), MAPK (mitogen activated protein kinase) et JAK-STAT. L'étude de l'activité des protéines impliquées dans la voie PI3K est réalisée par western blot. Les cellules d'ostéosarcome MG63 et MOS-J sont traitées avec des concentrations croissantes d'Imatinib, pendant 36 h (figure 11).

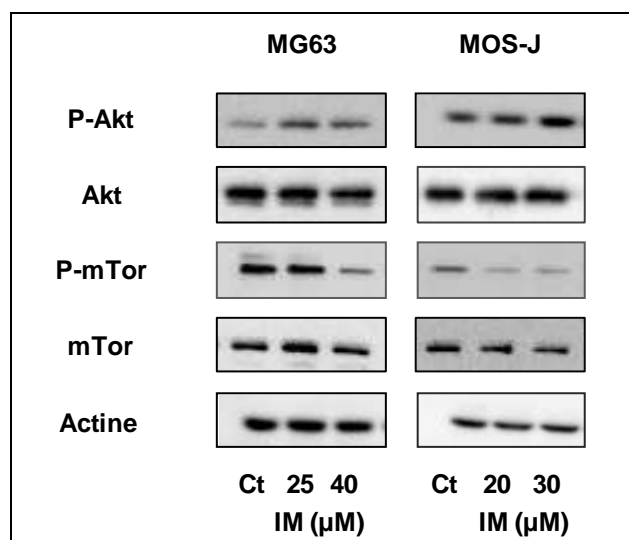


Figure 11 : Effet de l'Imatinib sur l'activité de protéines impliquées dans des voies métaboliques gouvernées par des récepteurs à activité tyrosine kinase.

Une concentration croissante d'Imatinib induit une augmentation significative de l'activité d'Akt comparativement au contrôle dans les deux lignées étudiées. Parallèlement, une concentration croissante d'Imatinib induit une diminution significative de l'activité de mTOR (figure 11). Cette inhibition de l'activité de mTOR est le reflet de l'effet de l'Imatinib sur les récepteur TK, cette inhibition est compensée par une boucle de rétrocontrôle sur AKT.

F - Expérimentation *in vivo* : Effet de l'Imatinib sur la croissance tumorale

Différents modèles d'ostéosarcome murin ainsi que différentes protocoles thérapeutiques ont été réalisés afin de valider les effets observés de l'Imatinib *in vitro* sur les lignées cellulaires d'ostéosarcome. Après induction du modèle, la croissance tumorale est suivie pour chaque souris en mesurant la taille de la tumeur tous les deux jours.

L'effet de l'Imatinib a tout d'abord été analysé dans un modèle d'ostéosarcome murin induit par l'injection de cellules MOS-J en IM dans le cadre d'un protocole préventif. Dans ce modèle, l'Imatinib réduit significativement le volume tumoral moyen des groupes traités ($p < 0,001$ pour le groupe 25, 50 et 100 mg/kg) (figures 12A). Les volumes tumoraux des groupes traités sont diminués 2 à 3 fois par rapport au groupe contrôle (1400, 1300 et 1000 mm³ pour les groupes 25, 50 et 100 mg/kg respectivement versus 3000 mm³ pour le contrôle). La progression tumorale (figure 12B) a été calculée entre le jour 18 et le jour 43. Les 3 groupes traités par l'Imatinib ont une progression tumorale significativement diminuée par rapport à celle du CT ($p < 0,01$ pour les groupes 25 et 50 mg/kg ; $p < 0,001$ pour le groupe 100 mg/kg). La progression tumorale des groupes traités diminue 2 à 3 fois par rapport au groupe contrôle (1100, 1100 et 900 mm³ pour les groupes 25, 50 et 100 mg/kg respectivement versus 2500 mm³ pour le contrôle) (figure 12B).

La radiographie de la patte contrôle (figure 13) montre une dégradation de l'os cortical par la tumeur. De plus, une néoformation de tissu calcifiée est observée révélant le caractère ostéoblastique des tumeurs MOS-J.

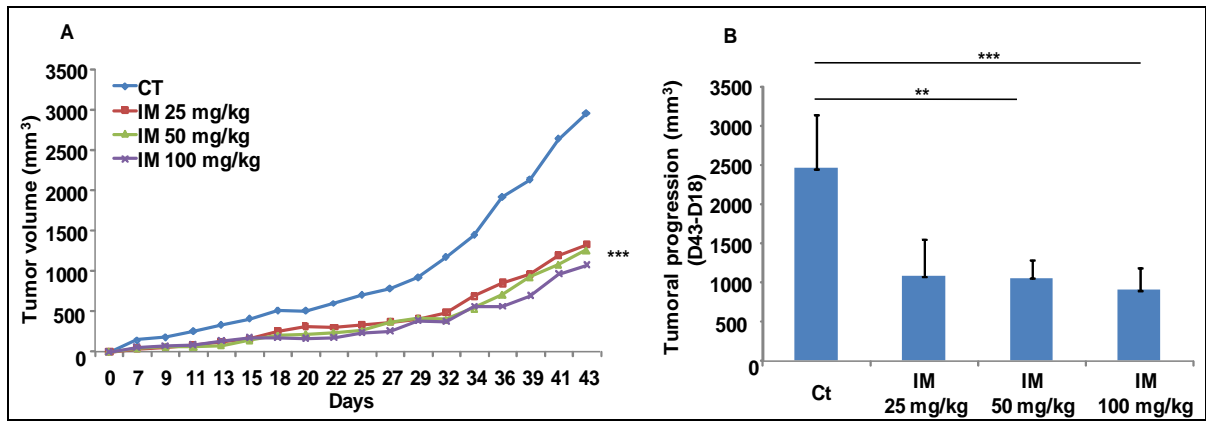


Figure 12 A et B : Effet de l'Imatinib sur le volume et la progression tumorale dans un modèle d'ostéosarcome murin induit par l'injection de cellules MOS-J.

*** : test Anova $p < 0,0001$ suivi du test de Bonferroni (multiples comparaisons) $p < 0,001$

** : test Anova $p < 0,0001$ suivi du test de Bonferroni (multiples comparaisons) $p < 0,01$

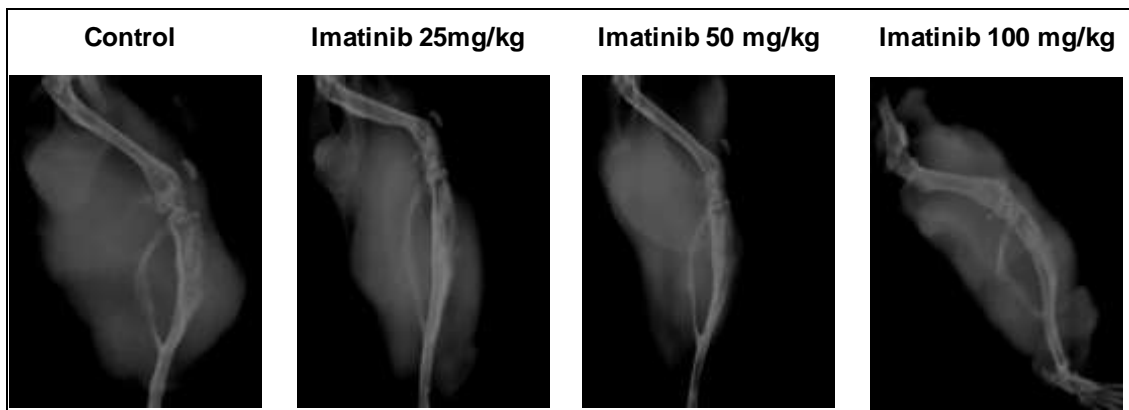


Figure 13 : Evaluation de l'effet de l'Imatinib en radiographie.

Ces observations sont confirmées par l'analyse microscanner (figure 14). Les radiographies des pattes de souris ayant reçu un traitement par l'Imatinib (25, 50 et 100 mg/kg) montrent une réduction de la destruction de l'os cortical ainsi qu'une diminution quantitative de tissu calcifié tumoral (figure 13). Ces effets qualitatifs sont confirmés par l'analyse au microscanner (figure 14) où nous pouvons observer que l'Imatinib améliore l'architecture osseuse.

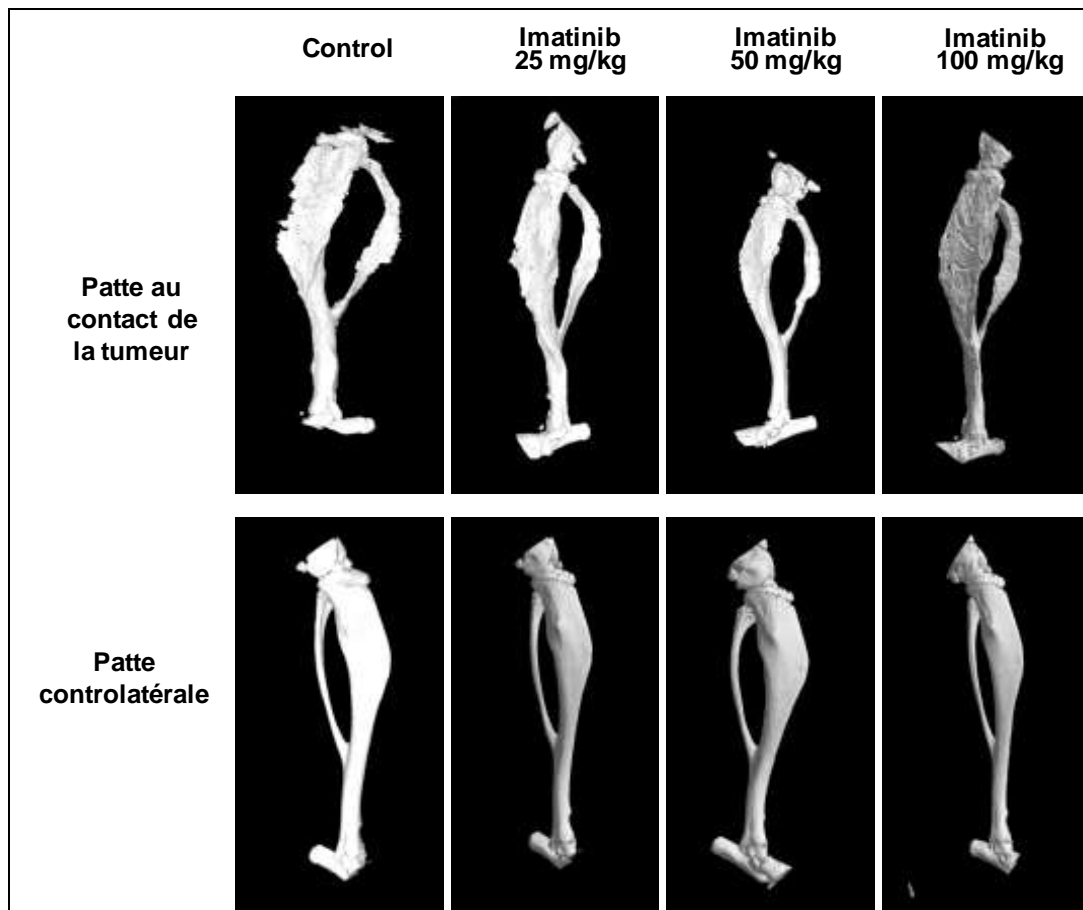


Figure 14 : Evaluation de la microarchitecture osseuse par microscanner.

Dans un second modèle d'ostéosarcome murin induit par la transplantation de fragment tumoral POS-1, l'Imatinib a également induit une diminution du volume tumoral et de la progression tumorale (figure 15). Dans ce modèle, seules les concentrations de 50 et 100 mg/kg réduisent le volume tumoral avec des volumes moyens de 1660 et 1100 mm³ pour les groupes 50 et 100 mg/kg versus 2500 mm³ pour le groupe CT (figure 15 A). Le même profil est observable pour la progression tumorale où seules les concentrations de 50 et 100 mg/kg diminuent la progression tumorale entre les jours 14 et 42 avec des volumes de progression de 1500 et 953 mm³ pour les groupes 50 et 100 mg/kg versus 2150 mm³ pour le groupe CT (figure 15 B).

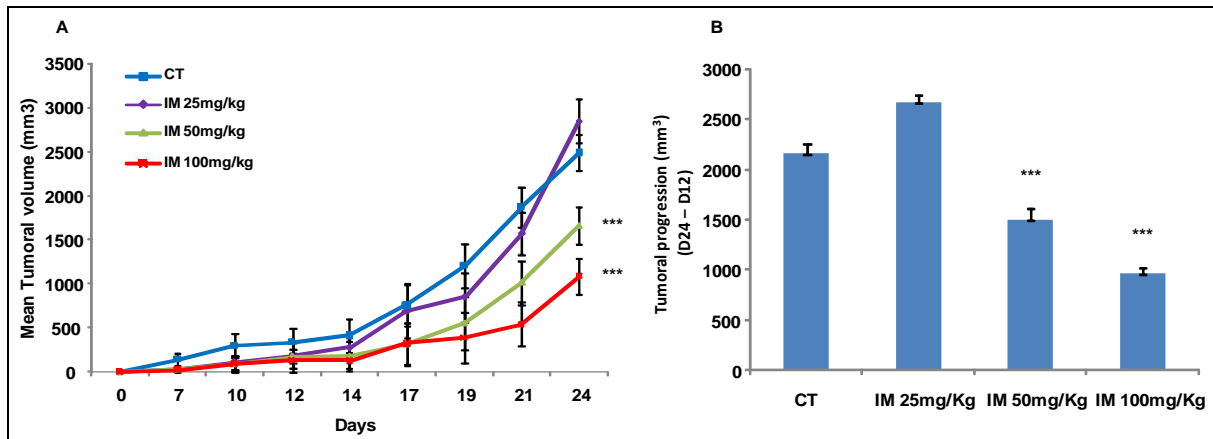


Figure 15 A et B : Effet de l'Imatinib sur le volume et la progression tumorale dans un modèle d'ostéosarcome murin induit par transplantation de fragment POS-1. *** : test Anova $p < 0,0001$ suivi du test de Bonferroni (multiples comparaisons) $p < 0,001$

Au vue des résultats obtenus dans deux modèles d'ostéosarcome syngéniques murin, nous avons étudié l'effet de l'Imatinib dans un protocole curatif dans un modèle d'ostéosarcome induit par l'injection de cellules MOS-J. Pour ce faire, nous avons commencé les traitements lorsque la tumeur était palpable (J7 après le début du modèle). Dans ce modèle, le traitement 100 mg/kg d'Imatinib a permis de réduire considérablement le volume et la progression tumorale (figure 16) avec des volumes moyens tumoraux de 1670 mm³ pour le groupe 100 mg/kg versus 2600 mm³ pour le groupe CT et des volumes progressions tumorales de 1470 mm³ pour le groupe 100 mg/kg versus 2130 mm³ pour le groupe CT (figure 16 A et B).

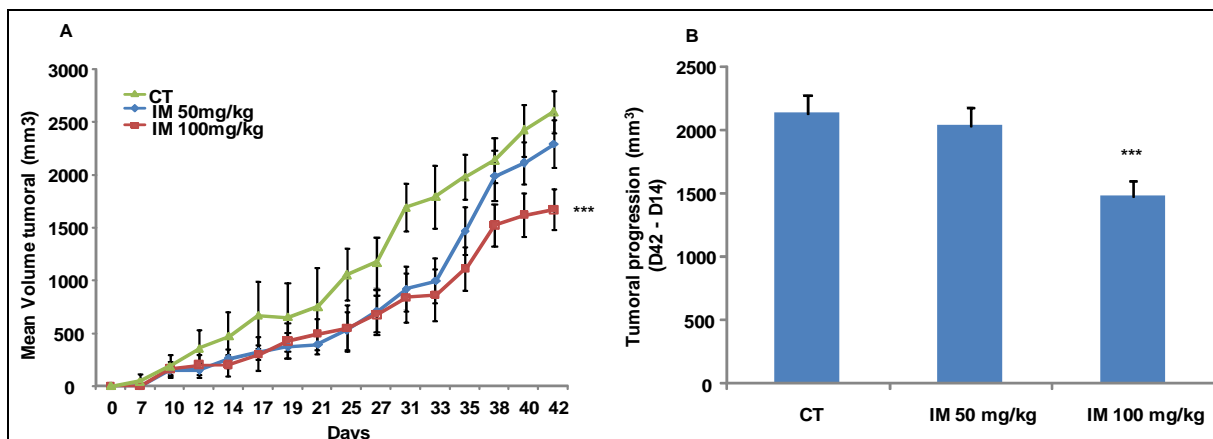


Figure 16 A et B : Effet de l'Imatinib sur le volume et la progression tumorale dans un modèle d'ostéosarcome murin induit par l'injection de cellules MOS-J dans le cadre d'un protocole curatif. *** : test Anova $p < 0,0001$ suivi du test de Bonferroni (multiples comparaisons) $p < 0,001$

DISCUSSION

Bien qu'il y ait des avancées au niveau chimiothérapie et chirurgie, le taux de survie des patients atteints d'ostéosarcome n'a pas évolué depuis 30 ans. Actuellement, le traitement de l'ostéosarcome est basé sur la polychimiothérapie très toxique vis-à-vis de laquelle un échappement thérapeutique est fréquemment observé, il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

Des travaux récents ont montré l'impact de l'Imatinib sur les cellules osseuses. L'Imatinib a un effet anti-résorption car il a un impact sur les ostéoclastes *via* la voie du récepteur au M-CSF (Dewar et al, 2005). En effet, la liaison de M-CSF à son récepteur est indispensable à l'adhérence des précurseurs, à la prolifération et à la survie des précurseurs ostéoclastiques. L'imatinib inhibe l'activité du récepteur c-fms, induit l'apoptose des ostéoclastes et donc par répercussion diminue la résorption osseuse (El Hajj Dib et al, 2006). Parallèlement, l'étude de l'Imatinib sur l'ostéoblastogenèse a révélé que l'Imatinib induit une différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes *via* une inhibition de la voie de signalisation liée au PDGFR (O'Sullivan et al, 2007; Tibullo et al, 2009) responsable d'une augmentation de la capacité de minéralisation osseuse. Cette augmentation de différenciation des cellules souches mésenchymateuses est associée à une augmentation d'expression des marqueurs ostéoblastiques tels que la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine et de la sialoprotéine osseuse (BSP). De récentes données du laboratoire étayent ces résultats (figure 17 et 18).

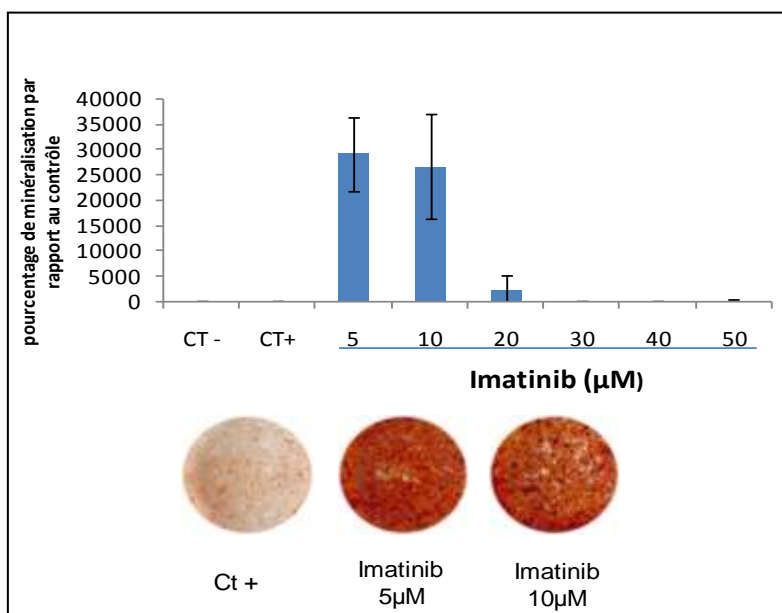


Figure 17 : Effet de l'imatinib sur l'ostéoblastogenèse

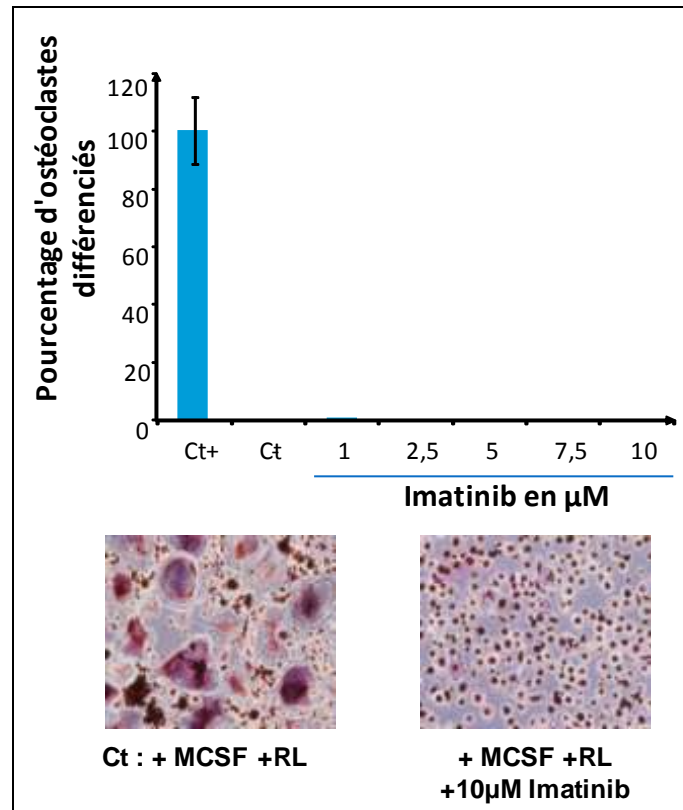


Figure 18 : Effet de l'Imatinib sur l'ostéoclastogénèse

Lors d'études cliniques, la relation Imatinib/tissu osseux s'est précisée. En effet, l'Imatinib (400 mg/jour), utilisé à long-terme (17 à 62 mois, médiane = 25 mois), induit une dérégulation du remodelage osseux comme par exemple une augmentation du volume trabéculaire osseux (TVB) (Fitter et al, 2008) ou bien une augmentation de marqueurs ostéoblastiques sériques telle que l'ostéocalcine (Tibullo et al, 2009).

L'effet de cet agent thérapeutique sur les cellules tumorales type sarcome ainsi que son effet sur les cellules osseuses nous a incités à étudier l'impact de l'Imatinib sur le principal sarcome des tissus calcifiés, l'ostéosarcome. Nous avons réalisé cette étude sur quatre types cellulaires d'ostéosarcomes : MG63 (humaines), OSRGA (rat), MOS-J et POS-1 (souris). Nos résultats montrent que l'Imatinib a un impact anti-tumoral sur les cellules d'ostéosarcome étudiées. En effet, l'Imatinib inhibe et la prolifération et la migration des cellules d'ostéosarcome. De plus, l'Imatinib induit un blocage des cellules en phase S du cycle cellulaire avec une augmentation de cellules en sub G0. L'Imatinib a également un impact sur la mort cellulaire des cellules d'ostéosarcome. Nos résultats attestent que cette induction de mort implique l'activation de la caspase 3.

Parmi la diversité des protéines à activité TK, certaines cibles de l'Imatinib sont prédominantes : PDGF récepteur (Kubo et al, 2008), c-KIT (Buchdunger et al, 2000), Abl (Mauro et Drucker, 2001) et le récepteur au M-CSF (Dewar et al, 2005a). L'analyse transcriptionnelle de ces récepteurs dans les cellules d'ostéosarcome révèle la présence des gènes codant pour le récepteur au PDGF (a et b) ainsi que pour la protéine TK (tyrosine kinase) Abl. Les cellules OSRGA possèdent en plus le gène codant pour c-KIT, le récepteur au stem cell factor (SCF). Aucune cellule d'ostéosarcome ne possède le gène codant pour le récepteur au M-CSF (c-fms). La cible moléculaire de l'Imatinib dans les cellules d'ostéosarcome reste à déterminer. L'utilisation de ligand permettant d'activer la voie suivie d'un traitement à l'Imatinib permettrait d'orienter nos recherches. L'utilisation de siRNA ciblant la protéine à activité TK étayerait cette hypothèse de l'implication d'une telle protéine dans la signalisation éteinte par l'Imatinib. En associant nos résultats obtenus et les données de la littérature le PDGFR et c-Kit qui signalisent par PI3K/Akt sont deux cibles à privilégier. En effet l'Imatinib induit une diminution de l'activité de mTOR alors que celle d'Akt augmente. L'inhibition du récepteur cible par l'Imatinib réduit l'activation de mTOR. mTOR est une protéine clé dans la régulation de la synthèse protéique et de la prolifération (Ory et al, 2008). Par conséquent, si mTOR est inhibé, il paraît logique que les cellules ne prolifèrent plus et donc qu'elles soient dirigées vers la mort cellulaire. De plus, cette inhibition de mTOR engendrerait une boucle de rétrocontrôle qui augmenterait la phosphorylation de Akt (O'reilly et al, 2006). L'Imatinib engendre une inhibition de la synthèse protéique et donc de la prolifération cellulaire via notamment la voie PI3K. Kubo et son équipe (2008) ont montré que l'expression du récepteur au PDGF et de son ligand pourrait être un marqueur de mauvais pronostic pour l'ostéosarcome, ce qui permet d'émettre l'hypothèse que la voie de signalisation PI3K apparaîtrait comme principale dans l'effet cytotoxique de l'Imatinib sur les ostéosarcomes. La voie des MAPK pourrait également être importante dans cet effet cytotoxique car elle découle elle aussi de l'activation du récepteur au PDGF par son ligand.

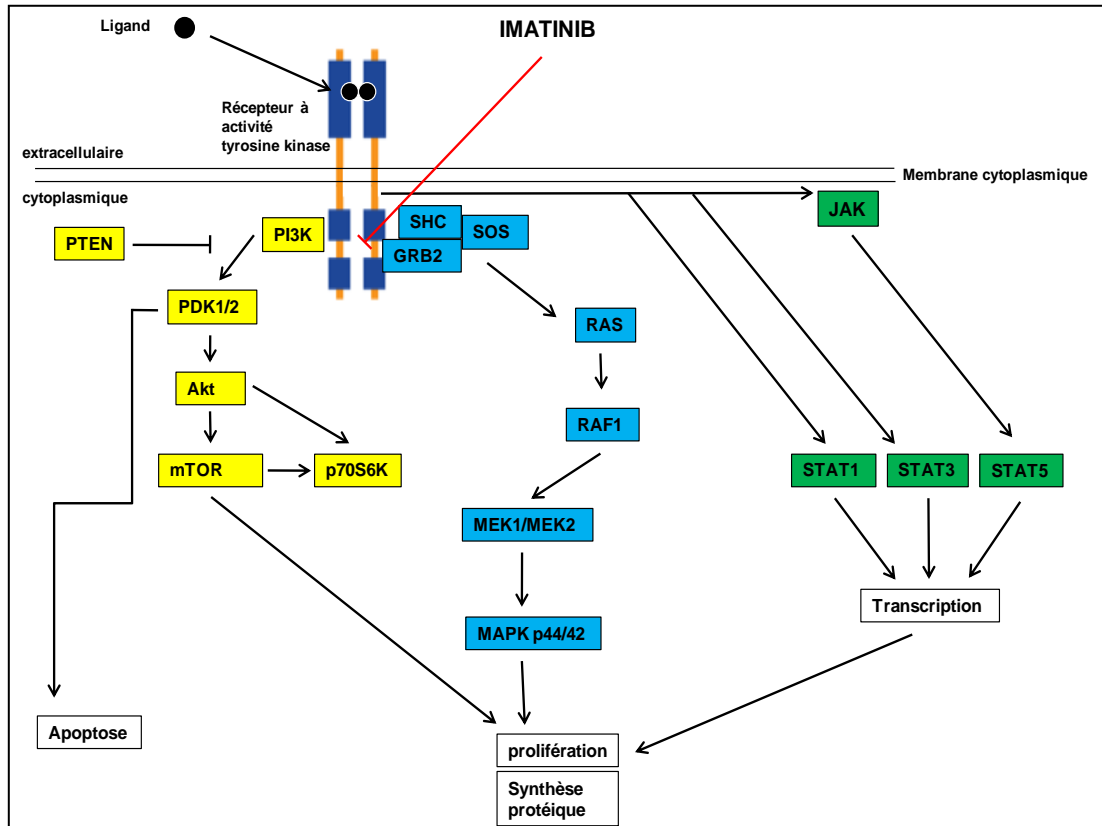


Figure 19 : Schéma représentant les voies de signalisation activées par l'interaction ligand/récepteur : PI3K (en jaune), MAPK (bleu) et JAK/STAT (en vert). L'Imatinib inhibe le récepteur sur les domaines tyrosines kinases intra-cytoplasmiques.

Dans nos modèles expérimentaux d'ostéosarcome murin, l'utilisation de l'Imatinib permet d'obtenir des résultats significatifs encourageants. Il est observé que le volume tumoral est significativement réduit de plus de 50% en présence 100 mg/kg d'Imatinib. De même, la progression tumorale est également réduite après un traitement de 100 mg/kg d'Imatinib. De plus, l'analyse architecturale des tibias des souris ayant une masse tumorale montre une dégradation de l'os cortical associée à une néoformation calcique, induite par la tumeur ostéoblastique. L'Imatinib inhibe la dégradation de l'os cortical. En effet, un cercle vicieux s'établit entre la tumeur et le tissu osseux : des facteurs tumoraux activent les ostéoclastes qui permettent le relargage de facteurs piégés dans la matrice osseuse et induisent à leur tour la croissance tumorale. Deux possibilités sont envisageables : l'Imatinib a un effet direct sur la cellule tumorale (certainement la voie principale) ou un effet indirecte *via* son impact sur le tissu osseux en inhibant l'ostéoclastogenèse (Dewar et al, 2006 ; El Hajj et al, 2006) et en induisant la différenciation des MSC en ostéoblastes (stimulation de la

minéralisation) (Tibullo et al, 2009). De plus, les effets obtenus de l'Imatinib dans un protocole curatif confortent nos résultats des précédents modèles.

Des récepteurs à activité tyrosine kinase étant exprimés par de nombreux types cellulaires, l'Imatinib peut potentiellement agir sur d'autres cellules du microenvironnement tumoral. Bien que cet aspect n'ait pas beaucoup été étudié dans la littérature, l'Imatinib est capable d'affecter les cellules de lignées monocytaires, musculaires lisses et endothéliales. L'Imatinib réduit la capacité de phagocytose des macrophages et par ce biais peut impacter directement la réponse immunitaire contre les infections nécessitant l'intervention des macrophages (Dewar et al, 2005b). De plus, l'impact de l'Imatinib sur les cellules musculaires lisses et endothéliales a été étudié. L'Imatinib permettrait d'inhiber la prolifération cellulaire des cellules musculaires lisses et pourrait induire la prolifération des cellules endothéliales (Vallière et al, 2009). Ces observations ont été obtenues *in vitro* à des concentrations faibles : chez l'homme, l'Imatinib est utilisé à 400 mg/jour (Vallière et al, 2009). Par ailleurs, ces données sont controversées puisque Rocha et al (2007) n'ont pas observé d'effet modulateur de l'Imatinib sur la prolifération des cellules endothéliales. Même si il est vrai que certaines des données ne sont pas en adéquation avec un effet anti-tumoral de l'Imatinib, elles démontrent la capacité de cet agent à moduler potentiellement l'environnement de la tumeur et une analyse précise des cytokines et facteurs de croissance modulés apporterait un regard nouveau sur ce point.

Certaines questions restent donc en suspens. Il est nécessaire d'identifier la cible thérapeutique de l'Imatinib dans le cadre des ostéosarcomes. L'expression protéique des récepteurs cibles sera analysée par western blot. Les voies de signalisation seront approfondies en étudiant l'effet des facteurs de croissance sur les cellules tumorales et analysant l'effet de l'Imatinib sur des cellules dans lesquelles chaque récepteur aura été réprimé par une technologie siRNA. L'étude histologique des tumeurs traitées par l'Imatinib est en cours actuellement et permettra de mieux appréhender l'effet de cet agent sur le tissu osseux, sur l'environnement tumoral et sur l'angiogenèse. Enfin, des combinaisons de traitements [verticales (plusieurs drogues ciblant la même voie de signalisation mais pas la même cible de la voie) ou horizontales (ciblage de voies de signalisations différentes)] seront effectuées, avec, par exemple, des agents de chimiothérapie (Ifosfamide), afin d'optimiser l'impact de l'Imatinib et donc le traitement de l'ostéosarcome. Le risque d'apparition dans les cellules d'ostéosarcome de processus de résistance à l'Imatinib sera recherché en cultivant à long terme ces cellules sous pression de sélection par des faibles doses d'Imatinib (Stegmeier

et al, 2010). En cas de résistance, un autre inhibiteur de tyrosine kinase peut être envisagé, le nilotinib plus puissant que l'Imatinib et à spectre plus large d'activité. Cette molécule est en cours d'essai au laboratoire. En conclusion, au vu des résultats encourageants obtenus *in vitro* et *in vivo*, il apparaît clairement que l'Imatinib est un agent anti-tumoral prometteur dans le traitement de l'ostéosarcome.

Conclusions générales et perspectives

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre de deux mécanismes: la formation et la résorption osseuse. Tout déséquilibre entre ces processus est à l'origine de pathologies qui peuvent être ostéocondensantes ou ostéolytiques, bénignes ou malignes. L'ostéosarcome est une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales précédé d'une phase d'ostéolyse importante (Schajowicz et al, 1993). Les traitements actuels, qui consistent en une résection chirurgicale de la tumeur et en une polychimiothérapie (associant principalement le méthotrexate, le cisplatine, la doxorubicine et l'ifosfamide), ont permis d'améliorer les taux de survie des patients. Mais la forte toxicité des molécules de chimiothérapie utilisées, souvent mal tolérées chez les jeunes patients, le mauvais pronostic associé à la détection de métastases pulmonaires, ainsi que l'apparition de résistance font qu'il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies des ostéosarcomes.

Les différentes stratégies thérapeutiques étudiées dans cette thèse permettent d'identifier de nouvelles pistes dont l'efficacité pourrait être évaluée lors d'études cliniques. En effet, les différentes combinaisons médicamenteuses réalisées, à savoir l'association entre le Zol et RAD001 et entre l'Apomine et la Lovastatine ont éteint la signalisation impliquée pour chaque combinaison permettant ainsi le contrôle de la prolifération des cellules tumorales. Ces associations ont ensuite été validées dans différents modèles murin d'ostéosarcome où une diminution du volume et de la progression tumorale ont été observés. De plus, l'utilisation de l'Imatinib a aussi montré l'intérêt d'utiliser une molécule ciblant des cellules tumorales où leur prolifération est gouvernée par des protéines à activité tyrosine kinase.

Les stratégies combinatoires ciblées seront les futures thérapies anti-cancéreuses s'appuyant sur une meilleure connaissance de la biologie des cancers et permettront d'une part de cibler la ou les protéines impliquées dans la prolifération anarchique des cellules tumorales et d'autre part, permettront d'éviter les boucles de rétrocontrôle compensatoire et les résistances métaboliques acquises. En effet de nombreuses molécules sont en essai et ciblent des protéines connues pour être impliquées dans différents types de cancers (Giamas et al, 2010) (figure 39).

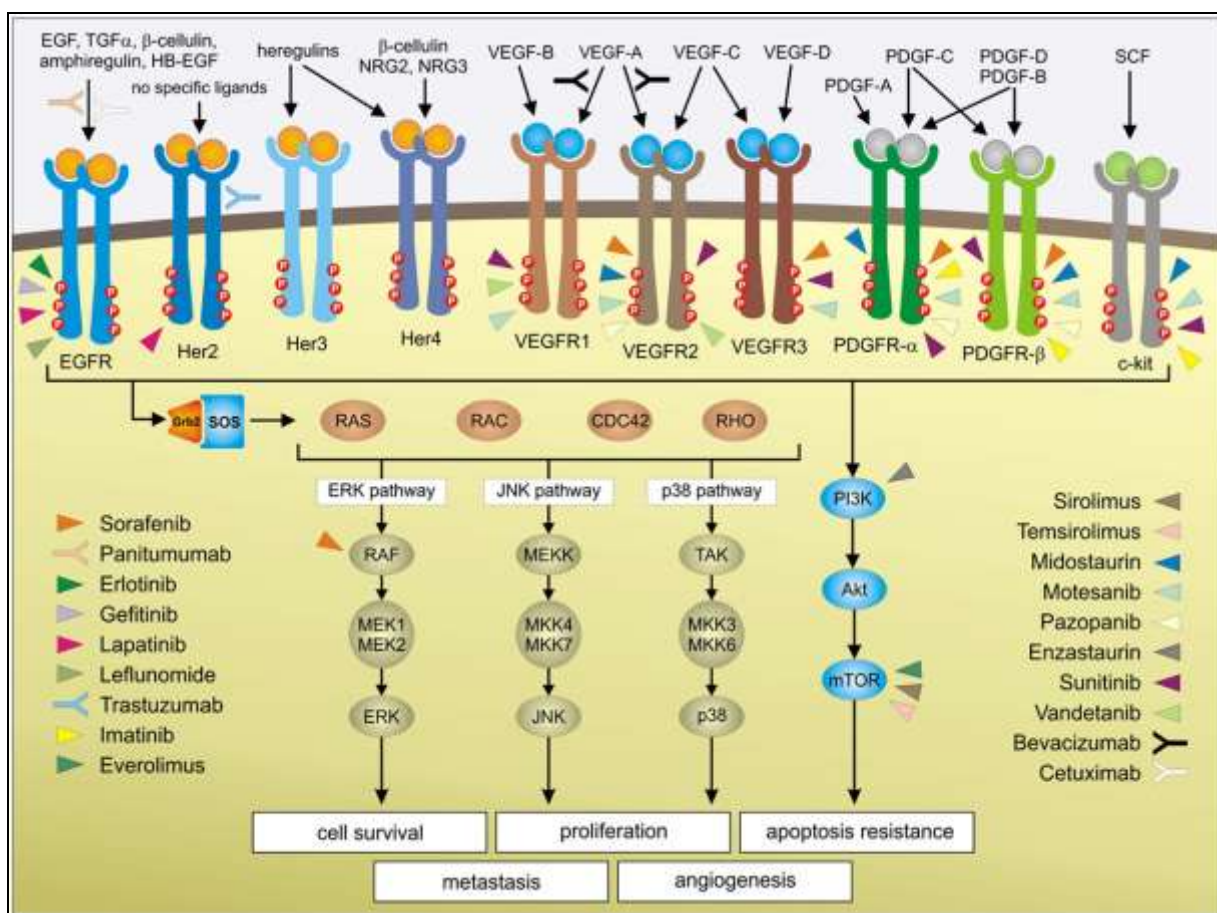


Figure 39 : Liste non exhaustive de molécules ciblant des protéines kinases clés impliquées de différents cancers (Giamas et al, 2010).

L'exemple le plus concret est l'utilisation de l'Imatinib, spécialement conçu pour inhiber une protéine BCR-Abl, responsable de la LMC. Le traitement par l'Imatinib des patients atteints de LMC s'intègre dans les stratégies ciblées et permet de restaurer une réponse hématologique complète (retour à la normale des hémogrammes, les signes et symptômes qui étaient possiblement présents au diagnostic ne sont plus apparents). Cependant, des résistances apparaissent à cet agent et l'élaboration de molécules plus puissantes semble indispensable ou sa combinaison avec d'autres molécules permettant soit de restaurer une sensibilité à cet agent soit de potentialiser son effet.

L'insuffisance des traitements actuels peut aussi résulter de l'incapacité de cibler efficacement les cellules initiant la tumeur (TIC) ou les cellules souches cancéreuses. Les TICs représentent une petite fraction de la population cellulaire tumorale, capable de générer de nouvelles tumeurs de composition cellulaire identique à la première. Perrot et ces

collaborateurs (2010) ont décrit le cas d'une patiente en rémission complète d'un ostéosarcome télangiectasique de l'humérus qui après trois injections de graisse autologue pour reconstruction a de nouveau développé un ostéosarcome. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette récurrence : 1) la capacité tumorigène des cellules adipeuses injectées, 2) la réactivation d'une cellule souche tumorale quiescente par la modulation du microenvironnement osseux induit par les cellules injectées. La première hypothèse n'a pas été démontrée et les préparations de cellules adipeuses riches en cellules souches mésenchymateuses (MCS) n'ont pas induit de tumeurs après injection chez l'animal. L'hypothèse deux est la plus probable. Ainsi, l'injection simultanée et co-localisée chez la souris de cellules adipeuses et de cellules d'ostéosarcome accroît la croissance tumorale et le processus métastatique en comparaison avec l'injection de cellules tumorales seules (Perrot et al, 2010). Ces cellules tumorales quiescentes pourraient elles être des cellules souches tumorales ? En effet, Wang et ces collaborateurs (2010) ont récemment montré la présence de cellules souches cancéreuses dans un modèle d'ostéosarcome murin induit par l'injection de cellules d'ostéosarcome OS99-1. Ces cellules présentent les marqueurs OCT3/4A, Nanog et Sox-2 caractéristiques des cellules souches et ne représentent que 3% de la population tumorale (Wang et al, 2010). Wilson et ces collaborateurs (2008) ont eux aussi isolé et caractérisé ces cellules souches tumorales provenant d'un ostéosarcome canin. Ces données suggèrent la présence de cellules souches tumorales dans le microenvironnement tumorale et ouvrent de nouvelles perspectives de recherches.

Le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans le développement tumoral et le devenir des cellules tumorales. La compréhension de ce microenvironnement tumoral apparaît indispensable pour améliorer l'efficacité des traitements et devient une cible thérapeutique. Dans ce contexte, de nouveaux inhibiteurs spécifiques tels le Bevacizumab (Avastin) ou ceux ciblant les récepteurs tyrosine kinase du VEGF et du PDGF sont en essais cliniques et ont été validés pour les traitements des cancers à faible pronostic (André et al, 2010). En effet, l'inhibition de la néovascularisation tumorale permettra le contrôle des signaux de prolifération et permettra en association avec la chimiothérapie conventionnelle d'améliorer l'efficacité des traitements (Sanchez-Munoz et al, 2009). HIF1 α qui contrôle l'expression du VEGF peut aussi être inhibé par le NVP-AEW541 qui est un inhibiteur spécifique du récepteur à l'IGF. C'est ce que montre Gariboldi et ces collaborateurs (2010) qui en utilisant cette molécule éteint la signalisation IGF-STAT3-HIF1 qui inhibe l'expression du VEGF.

Les stratégies combinatoires ciblées ouvrent une nouvelle ère dans la recherche spécifique de molécules dirigées contre une cible spécifique d'un type de cancer. Dans un futur proche (dans l'idéal), les patients atteints d'un cancer se verront proposés une thérapie qui leur est propre et qui ciblera les facteurs responsables de cette prolifération anarchique tumorale tenant compte du microenvironnement tumoral. Cette thérapie combinera différentes molécules permettant l'amélioration du traitement et permettra surtout d'éviter l'acquisition de résistance métabolique ou de boucles de rétrocontrôle compensatoire responsable soit des échecs des traitements soit des rechutes. Dans la même optique, l'immunothérapie s'intègre parfaitement dans ces stratégies thérapeutiques et est basé sur le fait qu'une cellule tumorale produit un certain nombre de cytokines qui vont induire une anergie des lymphocytes et finalement aboutir à une immunodéficience locale d'où la non réponse du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur. Deux types d'immunothérapies existent : i) l'immunothérapie passive ou adoptive qui consiste à injecter aux patients soit une population polyclonale TIL (polyclonal Tumor-Infiltrating Lymphocytes), fortement enrichie en lymphocytes de spécificité connue, soit une population clonale de lymphocytes T spécifiques ; ii) l'immunothérapie active qui est basée sur un traitement par cellules dendritiques ou par cytokines permettant d'activer efficacement des lymphocytes T naïfs, CD4⁺ auxiliaires ou CD8⁺ cytotoxiques. (Mori et al, 2006).

Dans le cadre de l'ostéosarcome, plusieurs antigènes tumoraux tels MAGE (Melanoma-Associated Antigen), SART1 (Squamous cell carcinoma Antigen Recognized by T cells), SART3 et des facteurs fixant les papillomavirus sont exprimés dans l'ostéosarcome justifiant le développement de thérapies cellulaires. Tsuda et ces collaborateurs (2001) ont démontré que l'anti-gène SART3 est surexprimé et que des peptides dérivés de SART3 seraient capables d'induire une réponse des lymphocytes T cytotoxiques. De plus Rivoltini et ces collaborateurs (1992) ont après analyse phénotypique de 37 tumeurs pédiatriques, incluant 12 ostéosarcomes révélés que les TIL étaient de prédominance CD8⁺. De plus, Theoleyre et ces collaborateurs (2005) ont montré que les TIL extraits d'ostéosarcome de rat étaient très sensibles aux antigènes tumoraux exprimés par les cellules tumorales autologues.

Une modulation des macrophages semble également possible. Ainsi, la combinaison de la chimiothérapie avec un peptide bactérien, le L-MTP-PE permet d'améliorer la survie des patients atteints d'un ostéosarcome (78% de survie à 5 ans). Le L-MTP-PE agit comme activateur du système immunitaire *via* la lignée monocytaire/macrophagique et permet d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie (Mori et al, 2008) (figure 40).

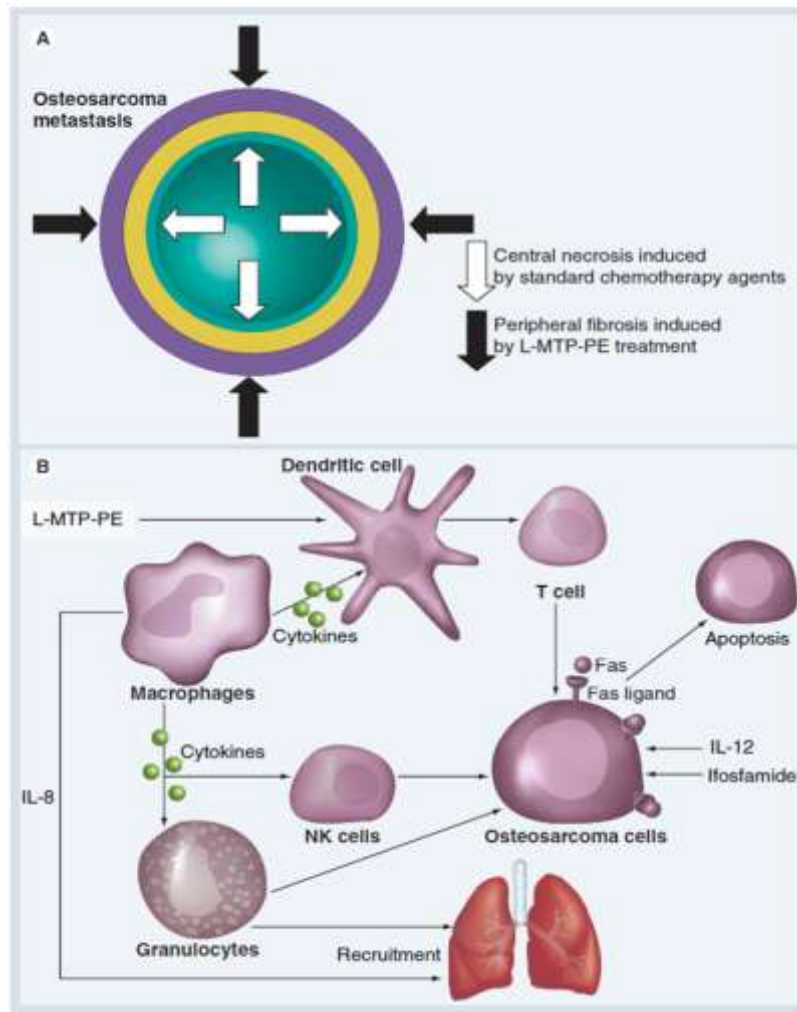


Figure 40 : Présentation thématique macroscopique (A) et microscopique (B) de l'effet anti-tumoral du L-MTP-PE en association avec des agents de chimiothérapie (Mori et al, 2008).

L'utilisation du Rituximab est un autre exemple concret de la modulation du système immunitaire. Le Rituximab (Mabthéra™ ou Rituxan™) est un anticorps chimérique murin humanisé contre l'antigène CD 20, comportant d'une part les régions constantes d'une IgG1 humaine et d'autre part les régions variables des chaînes légères et lourdes d'origine murine. La partie Fc de l'IgG humaine a été sélectionnée pour sa capacité à fixer le complément et entraîner une cytotoxicité de type ADCC (Antibody Dependant Cell Mediated Cytotoxicity). Le Rituximab est actuellement utilisé pour traiter les lymphomes B non hodgkiniens de type folliculaire ou des lymphomes plus agressifs (lymphome B à grandes cellules (Sibilia et al, 2004). Il est capable de détruire les LB tumoraux par trois mécanismes distincts : il peut induire l'apoptose dépendant de la voie mitochondriale aboutissant à l'activation de la caspase 3, d'activer le complément *via* sa portion Fc et aussi d'induire une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) où différentes cellules (monocytes, macrophages, cellules

NK et aussi polynucléaires) sont capables de fixer la portion Fc du Rituximab (Sibilia et al, 2004).

Malgré des résultats encourageants obtenus à partir des modèles expérimentaux, plusieurs obstacles inhérents persistent, notamment celui du décryptage du conflit entre le système immunitaire et le micro-environnement tumoral. Outre l'instabilité génétique tumorale et l'influence des phénomènes épigénétiques dans l'oncogenèse, plusieurs arguments indiquent que la tumeur entretient une relation très complexe avec son micro-environnement stromal, ainsi qu'avec le système immunitaire lui-même (Chouaib et al, 2003). Il est clairement établi que la tumeur est constituée de cellules néoplasiques et d'un micro-environnement constitué de capillaires, de cellules de soutien (péricytes, cellules musculaires lisses, fibroblastes) et de cellules inflammatoires (macrophages, polynucléaires, neutrophiles et mastocytes). De ce fait, l'infiltrat inflammatoire d'une tumeur joue un rôle essentiel dans son développement, à travers la production de facteurs mitogéniques, angiogéniques et destructeurs de la matrice cellulaire (Donj et al, 2004). Une tumeur ne peut en effet croître au sein de l'hôte que jusqu'à un certain seuil, au-delà duquel elle est menacée d'asphyxie et de nécrose. Pour exécuter leur programme invasif, les tumeurs développent des stratégies complexes et efficaces pour modifier, à leur profit, les tissus sains de l'hôte dans lesquels elles se nichent. Il se forme ainsi autour d'elles un cocon interactif et protecteur, le stroma. Dans ce contexte, les approches d'immunothérapie doivent cibler les cellules tumorales dans le contexte d'un micro-environnement hostile au système immunitaire et favorable à l'invasion tumorale (Perdrizet et al, 1990). Ainsi, l'analyse du rôle de certains éléments immunologiques, inflammatoires et vasculaires du micro-environnement d'une tumeur dans le contrôle du dialogue entre les systèmes tumoral et immunitaire, ainsi que dans l'échec ou l'efficacité du système effecteur et l'invasivité tumorale, est cruciale pour l'élaboration de stratégies innovantes en immunothérapie.

Toute cette diversité de stratégies thérapeutiques apportent de réels compléments aux thérapies conventionnelles anticancéreuses, permettent d'optimiser les traitements et offrent aux patients des alternatives intéressantes en cas d'échec de traitement ou de rechute. Une connaissance fine de la biologie des cancers ainsi que de leur microenvironnement permettront l'élaboration de nouvelles molécules toujours plus spécifiques et plus efficaces.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Alakangas A, Selander K, Mulari M, Halleen J, Lehenkari P, Monkkonen J, Salo J, Vaananen K. Alendronate disturbs vesicular trafficking in osteoclasts. *Calcif. Tissue Int.* 2002; 70: 40-7.

Alberts DS, Hallum AV, Stratton-Custis M, Garcia DJ, Gleason-Guzman M, Salmon SE, et al Phase I pharmacokinetic trial and correlative in vitro phase II tumor kinetic study of Apomine (SR-45023A), a novel oral biphosphonate anticancer drug. *Clin. Cancer Res.* 2001 ;7(5):1246-1250.

Amato RJ, Jac J, Giessinger S, Saxena S, Willis JP. A phase 2 study with a daily regimen of the oral mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) in patients with metastatic clear cell renal cell cancer. *Cancer.* 2009 1;115(11):2438-2446.

Andela VB, Pirri M, Schwarz EM, Puzas EJ, O'Keefe RJ, Rosenblatt JD, et al The mevalonate synthesis pathway as a therapeutic target in cancer. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2003;(415 Suppl):S59-66.

André N, Verschuur A, Rossler J, Sterba J. Anti-Angiogenic Therapies for Children with Cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010.

Bacci G., Briccoli A., Rocca M., Ferrari S., Donati D., Longhi A., Bertoni F., Bacchini P., Giacomini S., Forni C., et al (2003). Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the RizZoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Ann Oncol* 14, 1126-1134.

Baggetto LG. Biochemical, genetic, and metabolic adaptations of tumor cells that express the typical multidrug-resistance phenotype. Reversion by new therapies. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1997;29(4):401-413.

Baldini N., Scotlandi K., Serra M., Picci P., Bacci G., Sottili S. and Campanacci M. (1999). P-glycoprotein expression in osteosarcoma: a basis for risk-adapted adjuvant chemotherapy. *J Orthop Res* 17(5): 629-32.

Banerjee D, Ercikan-Abali E, Waltham M, Schnieders B, Hochhauser D, Li WW, et al. Molecular mechanisms of resistance to antifolates, a review. *Acta Biochim. Pol.* 1995;42(4):457-464.

Bellahcene A, Chaplet M, Bonjean K, Castronovo V. Zoledronate Inhibits α v β 3 and α v β 5 Integrin Cell Surface Expression in Endothelial Cells. *Endothelium* 2007; 14: 123-30.

Benassi M. S., Molendini L., Gamberi G., Ragazzini P., Sollazzo M. R., Merli M., Asp J., Magagnoli G., Balladelli A., Bertoni F. and Picci P. (1999). Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma. *Int J Cancer* 84(5): 489-93.

Benford H.L, McGowan N.W, Helfrich M.H, Nuttall M.E, Rogers M.J. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone* 2001; 28: 465-73.

Bengochea-Alonso MT, Ericsson J. A phosphorylation cascade controls the degradation of active SREBP1. *J. Biol. Chem.* 2009 27;284(9):5885-5895.

Beretta G. L., Gatti L., Tinelli S., Corna E., Colangelo D., Zunino F. and Perego P. (2004). Cellular pharmacology of cisplatin in relation to the expression of human copper transporter CTR1 in different pairs of cisplatin-sensitive and -resistant cells. *Biochem Pharmacol* 68(2): 283-91.

Berkhout TA, Simon HM, Patel DD, Bentzen C, Niesor E, Jackson B, et al The novel cholesterol-lowering drug SR-12813 inhibits cholesterol synthesis via an increased degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* 1996 14;271(24):14376-14382.

Bertermann O., Marcove R. C. and Rosen G. (1985). Effect of intensive adjuvant chemotherapy on wound healing in 69 patients with osteogenic sarcomas of the lower extremities. *Recent Results Cancer Res* 98: 135-41.

Biedler J. L. and Riehm H. (1970). Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 30(4): 1174-84.

Bhaskar PT, Hay N. The two TORCs and Akt. *Dev. Cell.* 2007;12(4):487-502.

Blay J. Updating progress in sarcoma therapy with mTOR inhibitors. *Ann Oncol.* 2010 29.

Breuil, V., Cosman, F., Stein, L., Horbert, W., Nieves, J., Shen, V., Lindsay, R. and Dempster, D. W. (1998). Human osteoclast formation and activity in vitro: effects of alendronate. *J Bone Miner Res* 13(11): 1721-9.

Brounais B, David E, Chipoy C, Trichet V, Ferré V, Charrier C, et al. Long term oncostatin M treatment induces an osteocyte-like differentiation on osteosarcoma and calvaria cells. *Bone*. 2009;44(5):830-839.

Brown KT, Kattapuram SV, Rosenthal DI. Computed tomography analysis of bone tumors: patterns of cortical destruction and soft tissue extension. *Skeletal Radiol*. 1986;15(6):448-451.

Brown MS, Faust JR, Goldstein JL, Kaneko I, Endo A. Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. *J. Biol. Chem*. 1978 25;253(4):1121-1128.

Bruder J.M, Ma J.Z, Wing N, Basler J, Katselnik D. Effects of alendronate on bone mineral density in men with prostate cancer treated with androgen deprivation therapy. *J. Clin. Densitom*. 2006; 9: 431-7.

Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, et al Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2000;295(1):139-145.

Byfield MP, Murray JT, Backer JM. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J. Biol. Chem*. 2005 23;280(38):33076-33082.

Cannon CP. The next step in cardiovascular protection. *Atheroscler Suppl*. 2003;4(5):3-9.

Capasso L. (2005). Antiquity of cancer. *Int J Cancer* 113(1): 2-13.

Chauveinc L., Mosseri V., Quintana E., Desjardins L., Schlienger P., Doz F., and Dutrillaux B. (2001). Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet* 22, 77-88.

Chellaiah MA. Regulation of podosomes by integrin α v β 3 and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling. *Eur. J. Cell Biol*. 2006;85(3-4):311-317.

Chou A. J. and Gorlick R. (2006). Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. *Expert Rev Anticancer Ther* 6(7): 1075-85.

Chouaib S. Integrating the quality of the cytotoxic response and tumor susceptibility into the design of protective vaccines in tumor immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 2003;111(5):595-597.

Coxon F. P. and Rogers M. J. (2003). The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 72(1): 80-4.

Coxon F.P., Thompson K, and Rogers M.J. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006; 6: 307-12.

Cvitkovic E, D. J., Armand JP, Khoury S (1993). Handbook of chemotherapy in clinical oncology. Scientific Communication International: 221-345.

Dalton W. S. and Scheper R. J. (1999). Lung resistance-related protein: determining its role in multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 91(19): 1604-5.

David J. P., Mehic D., Bakiri L., Schilling A. F., Mandic V., Priemel M., Idarraga M. H., Reschke M. O., Hoffmann O., Amling M. and Wagner E. F. (2005). Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. *J Clin Invest* 115(3): 664-72.

DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res.* 2008;18(6):609-621.

Deiters A. Small molecule modifiers of the microRNA and RNA interference pathway. *AAPS J.* 2010;12(1):51-60.

Dengler J, von Bubnoff N, Decker T, Peschel C, Duyster J. Combination of imatinib with rapamycin or RAD001 acts synergistically only in Bcr-Abl-positive cells with moderate resistance to imatinib. *Leukemia.* 2005;19(10):1835-1838.

Desandes E., Clavel, J., Berger C., Bernard J. L., Blouin P., de Lumley L., Demeocq F., Freycon F., Gembara P., Goubin A., Le Gall E., Pillon P., Sommelet D., Tron I. and Lacour B. (2004). Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr Blood Cancer* 43(7): 749-57.

Dewar AL, Zannettino ACW, Hughes TP, Lyons AB. Inhibition of c-fms by imatinib: expanding the spectrum of treatment. *Cell Cycle*. 2005;4(7):851-853.

Diel I.J, Solomayer E.F, Costa S.D, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M, Bastert G. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 357-63.

Di Nicolantonio F, Mercer SJ, Knight LA, Gabriel FG, Whitehouse PA, Sharma S, et al. Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC Cancer*. 2005;5:78.

Doggrell S.A. Statins in the 21st century: end of the simple story? *Expert. Opin. Investig. Drugs* 2001; 10: 1755-66.

Dong J, Grunstein J, Tejada M, Peale F, Frantz G, Liang W, et al. VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *EMBO J.* 2004 21;23(14):2800-2810.

Dönmez Y, Akhmetova L, İşeri OD, Kars MD, Gündüz U. Effect of MDR modulators verapamil and promethazine on gene expression levels of MDR1 and MRP1 in doxorubicin-resistant MCF-7 cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010.

Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood.* 2008 15;112(13):4808-4817.

Duivenvoorden W.C, Vukmirovic-Popovic S, Kalina M, Seidlitz E, Singh G. Effect of Zoledronic acid on the doxycycline-induced decrease in tumour burden in a bone metastasis model of human breast cancer. *Br. J. Cancer* 2007.

Dunford J. E., Thompson K., Coxon F. P., Luckman S. P., Hahn F. M., Poulter C. D., Ebetino F. H. and Rogers M. J. (2001). Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 296(2): 235-42.

Dunlop EA, Tee AR. Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell. Signal.* 2009;21(6):827-835.

Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid. Res.* 1992; 33: 1569-82.

Evdokiou A, Labrinidis A, Bouralexis S, Hay S, Findlay DM. Induction of cell death of human osteogenic sarcoma cells by Zoledronic acid resembles anoikis. *Bone* 2003; 33: 216-28.

Fakih MM. KRAS mutation screening in colorectal cancer: From paper to practice. *Clin Colorectal Cancer*. 2010;9(1):22-30.

Flach J, Antoni I, Villemin P, Bentzen CL, Niesor EJ. The mevalonate/isoprenoid pathway inhibitor apomine (SR-45023A) is antiproliferative and induces apoptosis similar to farnesol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000 2;270(1):240-246.

Fouladi M, Laningham F, Wu J, O'Shaughnessy MA, Molina K, Broniscer A, et al Phase I study of everolimus in pediatric patients with refractory solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 2007 20;25(30):4806-4812.

Foster KG, Fingar DC. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J. Biol. Chem.* 2010 7;285(19):14071-14077.

Frith J. C., Monkkonen J., Auriola S., Monkkonen H. and Rogers M. J. (2001). The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum* 44(9): 2201-10.

Frith J. C., Monkkonen J., Blackburn G. M., Russell R. G. and Rogers M. J. (1997). Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res* 12(9): 1358-67.

Frost H. M. (1969). Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* 3(3): 211-37.

García-Martínez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J.* 2008 15;416(3):375-385.

Gariboldi MB, Ravizza R, Monti E. The IGFR1 inhibitor NVP-AEW541 disrupts a pro-survival and pro-angiogenic IGF-STAT3-HIF1 pathway in human glioblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 2010;80(4):455-462.

Garwood ER, Kumar AS, Baehner FL, Moore DH, Au A, Hylton N, et al Fluvastatin reduces proliferation and increases apoptosis in women with high grade breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010;119(1):137-144.

Gauthaman K, Manasi N, Bongso A. Statins inhibit the growth of variant human embryonic stem cells and cancer cells in vitro but not normal human embryonic stem cells. *Br. J. Pharmacol.* 2009;157(6):962-973.

Giamas G, Man YL, Hirner H, Bischof J, Kramer K, Khan K, et al. Kinases as targets in the treatment of solid tumors. *Cell. Signal.* 2010 Jul;22(7):984-1002.

Gillespy T., 3rd, Manfrini M., Ruggieri P., Spanier S. S., Pettersson H., and Springfield D. S. (1988). Staging of intraosseous extent of osteosarcoma: correlation of preoperative CT and MR imaging with pathologic macroslices. *Radiology* 167, 765-767.

Glantschnig H, Fisher JE, Wesolowski G, Rodan GA, Reszka AA. M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ.* 2003;10(10):1165-1177.

Glowacki J., Rey, C., Glimcher M. J., Cox K. A., and Lian J. (1991). A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 45, 292-302.

Goldie J. H. and Coldman A. J. (1979). A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep* 63(11-12): 1727-33.

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 1990 1;343(6257):425-430.

Goorin A. M., Schwartzentruber D. J., Devidas M., Gebhardt M. C., Ayala A. G., Harris M. B., Helman L. J., Grier H. E., and Link M. P. (2003). Presurgical chemotherapy compared with immediate surgery and adjuvant chemotherapy for nonmetastatic osteosarcoma: Pediatric Oncology Group Study POG-8651. *J Clin Oncol* 21, 1574-1580.

Gomes, C. M., van Paassen, H., Romeo, S., Welling, M. M., Feitsma, R. I., Abrunhosa, A. J., Botelho, M. F., Hogendoorn, P. C., Pauwels, E. and Cleton-Jansen, A. M. (2006). Multidrug resistance mediated by ABC transporters in osteosarcoma cell lines: mRNA analysis and functional radiotracer studies. *Nucl Med Biol* 33(7): 831-40.

Gottesman M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu. Rev. Med.* 2002; 53: 615-27.

Gotzos B., Schöni-Affolter F., et Celio M. 2007. Os compact et spongieux Page consultée le. Adresse: <http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/francais/stuetzgewebe/knochen/aufbau/f-aufbau.php> (2 of 2) 20.10.2008 23:52:10

Gouin F, Ory B, Redini F, Heymann D. Zoledronic acid slows down rat primary chondrosarcoma development, recurrent tumor progression after intralesional curettage and increases overall survival. *Int. J. Cancer* 2006; 119: 980-4.

Green J.R. Bisphosphonates in cancer therapy. *Curr. Opin. Oncol.* 2002; 14: 609-15.

Green J. R. (2004). Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist* 9 Suppl 4: 3-13.

Grem J. L., King S. A., Wittes R. E. and Leyland-Jones B. (1988). "The role of methotrexate in osteosarcoma." *J Natl Cancer Inst* 80(9): 626-55.

Grigoriadis A. E., Schellander K., Wang Z. Q., and Wagner E. F. (1993). Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol* 122, 685-701.

Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, et al Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev. Cell.* 2006;11(6):859-871.

Guinebretière JM, L. C. A., Le péchoux C, Missenard G, Bonvalot S, Terrier P and Vanel D (2001). Ostéosarcome de forme commune. *Encycl Méd Chir* 13p: 14-704.

Guruswamy S, Rao CV. Synergistic effects of lovastatin and celecoxib on caveolin-1 and its down-stream signaling molecules: Implications for colon cancer prevention. *Int. J. Oncol.* 2009;35(5):1037-1043.

Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem. Sci.* 2005;30(1):35-42.

Hauben E. I., Arends J., Vandenbroucke J. P., van Asperen C. J., Van Marck E., and Hogendoorn P. C. (2003). Multiple primary malignancies in osteosarcoma patients. Incidence and predictive value of osteosarcoma subtype for cancer syndromes related with osteosarcoma. *Eur J Hum Genet* 11, 611-618.

Hauschka P. V., Mavrakos A. E., Iafrati M. D., Doleman S. E., and Klagsbrun M. (1986). Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem* 261, 12665-12674.

Heymann D., and Lepreux S. (2008). Le tissu osseux, In *Histologie - Bases fondamentales* OmniScience, ed.

Heymann D., and Rousselle A. V. (2000). gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine* 12, 1455-1468.

Heymann D, Ory B, Gouin F, Green J.R, Redini F. Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors. *Trends Mol. Med.* 2004 ; 10: 337-43.

Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann M.F, Coipeau P, Charrier C, Couillaud S, Thierry 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.

Hill P. A. (1998). Bone remodelling. *Br J Orthod* 25, 101-107.

Holliday LS, Bubb MR, Jiang J, Hurst IR, Zuo J. Interactions between vacuolar H⁺-ATPases and microfilaments in osteoclasts. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2005;37(6):419-423.

Houghton PJ. Everolimus. *Clin. Cancer Res.* 2010 1;16(5):1368-1372.

Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem. J.* 2008 1;412(2):179-190.

Huang G., Mills L. and Worth L. L. (2007). Expression of human glutathione S-transferase P1 mediates the chemosensitivity of osteosarcoma cells. *Mol Cancer Ther* 6(5): 1610-9.

Huvos A. G., Rosen G., and Marcove R. C. (1977). Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. *Arch Pathol Lab Med* 101, 14-18.

Ito T, Ikeda U. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003;2(3):257-265.

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, et al SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*. 2006 6;127(1):125-137.

Jain MK, Ridker PM. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(12):977-987.

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* 2002,16:223-8.

Jones KD, Couldwell WT, Hinton DR, Su Y, He S, Anker L, et al Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1994 30;205(3):1681-1687.

Julien L, Carriere A, Moreau J, Roux PP. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol. Cell. Biol*. 2010;30(4):908-921.

Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Hayashi K, Yamauchi M, Sugimoto T. Inhibition of the mevalonate pathway rescues the dexamethasone-induced suppression of the mineralization in osteoblasts via enhancing bone morphogenetic protein-2 signal. *Horm. Metab. Res*. 2009;41(8):612-616.

Kantharidis, P., El-Osta, S., Silva, M., Lee, G., Hu, X. F. and Zalcborg, J. (2000). Regulation of MDR1 gene expression: emerging concepts. *Drug Resist Updat* 3(2): 99-108.

Kavanagh K. L., Guo K., Dunford J. E., Wu X., Knapp S., Ebetino F. H., Rogers M. J., Russell R. G. and Oppermann U. (2006). The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(20): 7829-34.

Keyomarsi K, Sandoval L, Band V, Pardee AB. Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res*. 1991 1;51(13):3602-3609.

Khaidakov M, Wang W, Khan JA, Kang B, Hermonat PL, Mehta JL. Statins and angiogenesis: is it about connections? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009 25;387(3):543-547.

Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan K. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* 2008;10(8):935-945.

Kneissel M, Luong-Nguyen N, Baptist M, Cortesi R, Zumstein-Mecker S, Kossida S, et al Everolimus suppresses cancellous bone loss, bone resorption, and cathepsin K expression by osteoclasts. *Bone.* 2004;35(5):1144-1156.

Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell.* 1984;37(3):1035-1042.

Krocker D, Perka C, Tuischer J, Funk J, Tohtz S, Buttgereit F, et al Effects of tacrolimus, cyclosporin A and sirolimus on MG63 cells. *Transpl. Int.* 2006;19(7):563-569.

Kruh, G.D. Introduction to resistance to anticancer agents. *Oncogene* 2003; 22: 7262-4.

Krycer JR, Sharpe LJ, Luu W, Brown AJ. The Akt-SREBP nexus: cell signaling meets lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 2010;21(5):268-276.

Kubista B, Trieb K, Sevelde F, Toma C, Arrich F, Heffeter P, Elbling L, Sutterluty H, Scotlandi K, Kotz R, Micksche M, Berger W. Anticancer effects of Zoledronic acid against human osteosarcoma cells. *J. Orthop. Res.* 2006; 24: 1145-52.

Kuroda J, Kimura S, Segawa H, Sato K, Matsumoto S, Nogawa M, Yuasa T, Kobayashi Y, Yoshikawa T, Ottmann OG, Maekawa T. p53-independent anti-tumor effects of the nitrogen-containing bisphosphonate Zoledronic acid. *Cancer Sci.* 2004; 95: 186-92.

Labrinidis A, Hay S, Liapis V, Ponomarev V, Findlay DM, Evdokiou A. Zoledronic Acid Inhibits Both the Osteolytic and Osteoblastic Components of Osteosarcoma Lesions in a Mouse Model. *Clinical Cancer Research.* 2009 15;15(10):3451-3461.

Laezza C, Fiorentino L, Pisanti S, Gazzero P, Caraglia M, Portella G, et al Lovastatin induces apoptosis of k-ras-transformed thyroid cells via inhibition of ras farnesylation and by modulating redox state. *J. Mol. Med.* 2008;86(12):1341-1351.

Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358(6381): 15-6.

Lane HA, Wood JM, McSheehy PMJ, Allegrini PR, Boulay A, Brueggen J, et al mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.* 2009 1;15(5):1612-1622.

Lehenkari P. P., Kellinsalmi M., Napankangas J. P., Ylitalo K. V., Monkkonen J., Rogers, M. J., Azhayevev A., Vaananen H. K. and Hassinen I. E. (2002). Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol* 61(5): 1255-62.

Lewis KD, Thompson JA, Weber JS, Robinson WA, O'Day S, Lutzky J, et al. A phase II open-label trial of apomine (SR-45023A) in patients with refractory melanoma. *Invest New Drugs.* 2006;24(1):89-94.

Li Y, Yuan H, Yang K, Xu W, Tang W, Li X. The structure and functions of P-glycoprotein. *Curr. Med. Chem.* 2010;17(8):786-800.

Liegl-Atzwanger B, Fletcher JA, Fletcher CDM. Gastrointestinal stromal tumors. *Virchows Arch.* 2010;456(2):111-127.

Linnet M. S., Ries L. A., Smith M. A., Tarone R. E., and Devesa S. S. (1999). Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst* 91, 1051-1058.

Link M. P., Goorin A. M., Miser A. W., Green A. A., Pratt C. B., Belasco J. B., Pritchard J., Malpas J. S., Baker A. R., Kirkpatrick J. A., and et al (1986). The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med* 314, 1600-1606.

Liu Y. Y., Han T. Y., Giuliano A. E. and Cabot M. C. (2001). Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *Faseb J* 15(3): 719-30.

Lopez-Guerrero J. A., Lopez-Gines C., Pellin, A., Carda C. and Llombart-Bosch A. (2004). Deregulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagn Mol Pathol* 13(2): 81-91.

Lourda M., Trougakos I. P. and Gonos E. S. (2007). Development of resistance to chemotherapeutic drugs in human osteosarcoma cell lines largely depends on up-regulation of Clusterin/Apolipoprotein J. *Int J Cancer* 120(3): 611-22.

Lowe S. W., Ruley H. E., Jacks T. and Housman D. E. (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74(6): 957-67.

Lowe LC, Senaratne SG, Colston KW. Induction of apoptosis in breast cancer cells by apomine is mediated by caspase and p38 mitogen activated protein kinase activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005 8;329(2):772-779.

Lubet RA, Boring D, Steele VE, Ruppert JM, Juliana MM, Grubbs CJ. Lack of efficacy of the statins atorvastatin and lovastatin in rodent mammary carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2009;2(2):161-167.

Lynch C. C., Hikosaka A., Acuff H. B., Martin M. D., Kawai N., Singh R. K., Vargo-Gogola T. C., Begtrup J. L., Peterson T. E., Fingleton B., et al (2005). MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell* 7, 485-496.

Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009;10(5):307-318.

Maehama T, Tanaka M, Nishina H, Murakami M, Kanaho Y, Hanada K. RalA functions as an indispensable signal mediator for the nutrient-sensing system. *J. Biol. Chem.* 2008 12;283(50):35053-35059.

Mancini M, Corradi V, Petta S, Martinelli G, Barbieri E, Santucci MA. mTOR inhibitor RAD001 (Everolimus) enhances the effects of imatinib in chronic myeloid leukemia by raising the nuclear expression of c-ABL protein. *Leuk. Res.* 2010;34(5):641-648.

Mankin H. J., Mankin C. J., and Simon M. A. (1996). The hazards of the biopsy, revisited. Members of the Musculoskeletal Tumor Society. *J Bone Joint Surg Am* 78, 656-663.

Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007 29;129(7):1261-1274.

Manolagas S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21(2): 115-37.

Marie P. J. (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 473, 98-105.

Marieb E. 1998 *Human Anatomy and Physiology*

Marina N. M., Pratt C. B., Rao B. N., Shema S. J., and Meyer W. H. (1992). Improved prognosis of children with osteosarcoma metastatic to the lung(s) at the time of diagnosis. *Cancer* 70, 2722-2727.

McKillop J. H., Etcubanas E., and Goris M. L. (1981). The indications for and limitations of bone scintigraphy in osteogenic sarcoma: a review of 55 patients. *Cancer* 48, 1133-1138.

Mensah-Osman E. J., Thomas D. G., Tabb M. M., Larios J. M., Hughes D. P., Giordano T. J., Lizyess M. L., Rae J. M., Blumberg B., Hollenberg P. F. and Baker L. H. (2007). Expression levels and activation of a PXR variant are directly related to drug resistance in osteosarcoma cell lines. *Cancer* 109(5): 957-65.

Meyers P. A., Heller G., Healey J. H., Huvos A., Applewhite A., Sun M., and LaQuaglia M. (1993). Osteogenic sarcoma with clinically detectable metastasis at initial presentation. *J Clin Oncol* 11, 449-453.

Monkkonen H., Auriola S., Lehenkari P., Kellinsalmi M., Hassinen I. E., Vepsalainen J. and Monkkonen J. (2006). A new endogenous ATP analog (ApppI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol* 147(4): 437-45.

Mori K, Ando K, Heymann D. Liposomal muramyl tripeptide phosphatidyl ethanolamine: a safe and effective agent against osteosarcoma pulmonary metastases. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008 Fév;8(2):151-159.

Mori K, Rédini F, Gouin F, Cherrier B, Heymann D. Osteosarcoma: current status of immunotherapy and future trends (Review). *Oncol. Rep.* 2006;15(3):693-700.

Moriceau G, Ory B, Gobin B, Verrecchia F, Gouin F, Blanchard F, Rédini F, Heymann D. Therapeutic approach of primary bone tumours by bisphosphonates. *Current pharmaceutical design*, in press. 2010

Moriceau G, Ory B, Mitrofan L, Riganti C, Blanchard F, Brion R, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, Denis M, Shultz L.D, Mönkkönen J, Rédini F, Heymann D. Zoledronic acid potentiates mTOR inhibition and abolishes the resistance of osteosarcoma cells to RAD001 (Everolimus): pivotal role of the prenylation process. *Cancer research*, in revision. 2010

Mosende C., Gutierrez M., Caparros B. and Rosen G. (1977). Combination chemotherapy with bleomycin, cyclophosphamide and dactinomycin for the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer* 40(6): 2779-86.

Nakanishi M, Goldstein JL, Brown MS. Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Mevalonate-derived product inhibits translation of mRNA and accelerates degradation of enzyme. *J. Biol. Chem.* 1988 25;263(18):8929-8937.

Noble B.S., Peet N., Stevens H.Y., Brabbs A., Mosley J.R., Reilly G.C., Reeve J., Skerry T.M., et Lanyon L.E. 2003. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(4): C934-943.

Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, et al Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005 4;102(40):14238-14243.

Notarnicola M, Messa C, Cavallini A, Bifulco M, Tecce M.F, Eletto D, Di Leo A, Montemurro S, Laezza C, Caruso M.G. Higher farnesyl diphosphate synthase activity in human colorectal cancer inhibition of cellular apoptosis. *Oncology* 2004; 67: 351-8.

O'Donnell A, Faivre S, Burris HA, Rea D, Papadimitrakopoulou V, Shand N, et al Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 2008 1;26(10):1588-1595.

Ortiz-Gomez A, Jimenez C, Estevez A.M, Carrero-Lerida J, Ruiz-Perez L.M, Gonzalez-Pacanowska D. Farnesyl diphosphate synthase is a cytosolic enzyme in *Leishmania major* promastigotes and its overexpression confers resistance to risedronate. *Eukaryot. Cell* 2006; 5: 1057-64.

Ory B, Blanchard F, Battaglia S, Gouin F, Redini F, Heymann D. Zoledronic acid activates the DNA S-phase checkpoint and induces osteosarcoma cell death characterized by apoptosis-inducing factor and endonuclease-G translocation independently of p53 and retinoblastoma status. *Mol. Pharmacol.* 2007; 71: 333-43.

Ory B, Heymann M, Kamijo A, Gouin F, Heymann D, Redini F. Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer.* 2005 1;104(11):2522-2529.

Ory B, Moriceau G, Trichet V, Blanchard F, Berreur M, Rédini F, et al. Farnesyl diphosphate synthase is involved in the resistance to Zoledronic acid of osteosarcoma cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2008;12(3):928-941.

Ory B, Moriceau G, Redini F, Heymann D. mTOR inhibitors (rapamycin and its derivatives) and nitrogen containing bisphosphonates: bi-functional compounds for the treatment of bone tumours. *Curr. Med. Chem.* 2007;14(13):1381-1387.

Ottewell 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(16):1167-1178.

Owen M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10, 63-76.

Pacifici R. (1998). Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology* 139, 2659-2661.

Pandha H, Birchall L, Meyer B, Wilson N, Relph K, Anderson C, Harrington K. Antitumor effects of aminobisphosphonates on renal cell carcinoma cell lines. *J. Urol.* 2006; 176: 2255-61.

Papachristou D. J., Batistatou A., Sykiotis G. P., Varakis I. and Papavassiliou A. G. (2003). Activation of the JNK-AP-1 signal transduction pathway is associated with pathogenesis and progression of human osteosarcomas. *Bone* 32(4): 364-71.

Papapoulos S.E, Eekhoff E.M and Zwinderman A.H Acquired Resistance to Bisphosphonates in Paget's Disease of Bone. *J. Bone Miner. Res.* 2006; 21: 88-91.

Panicek D. M., Gatsonis C., Rosenthal D. I., Seeger L. L., Huvos A. G., Moore S. G., Caudry D. J., Palmer W. E., and McNeil B. J. (1997). CT and MR imaging in the local staging of primary malignant musculoskeletal neoplasms: Report of the Radiology Diagnostic Oncology Group. *Radiology* 202, 237-246.

Parfitt A. M. (1994). Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55, 273-286.

Park IH, Kim JY, Jung JI, Han J. Lovastatin overcomes gefitinib resistance in human non-small cell lung cancer cells with K-Ras mutations. *Invest New Drugs* [Internet]. 2009 17.

Penault-Llorca F, Etessami A, Bourhis J. Principales utilisations thérapeutiques des anticorps monoclonaux en cancérologie Possibilities for using monoclonal antibodies in oncology. *Cancer/Radiothérapie*. 2002; 6 :24-28.

Perdrizet GA, Kaneko H, Buckley TM, Fishman MA, Schweizer RT. Heat shock protects pig kidneys against warm ischemic injury. *Transplant. Proc.* 1990;22(2):460-461.

Perrot P, Rousseau J, Bouffaut A, Rédini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, et al. Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS ONE*. 2010;5(6):e10999.

Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, et al DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 2009 29;137(5):873-886.

Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosc, J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., and Marshak D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

Polak P, Hall MN. mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009 Avr;21(2):209-218.

Pourpak A, Dorr RT, Meyers RO, Powell MB, Stratton SP. Cytotoxic activity of Apomine is due to a novel membrane-mediated cytolytic mechanism independent of apoptosis in the A375 human melanoma cell line. *Invest New Drugs*. 2007;25(2):107-114.

Ratnam M, Hao H, Zheng X, Wang H, Qi H, Lee R, et al Receptor induction and targeted drug delivery: a new antileukaemia strategy. *Expert Opin Biol Ther.* 2003;3(4):563-574.

Régent D, Tamisier JN, Féry A, Bernard C, Delagoutte JP, Pourel J, et al. [The value of data processing in the computerized scanning of benign focal lesions of bone]. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1986 Fév;53(2):77-82.

Riggins RB, Zwart A, Nehra R, Clarke R. The nuclear factor kappa B inhibitor parthenolide restores ICI 182,780 (Faslodex; fulvestrant)-induced apoptosis in antiestrogen-resistant breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2005;4(1):33-41.

Rivoltini L, Arienti F, Orazi A, Cefalo G, Gasparini M, Gambacorti-Passerini C, et al. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating paediatric tumours, with a characterization of the tumour phenotype. *Cancer Immunol. Immunother.* 1992;34(4):241-251.

Rogers M. J. (2003). "New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates." *Curr Pharm Des* 9(32): 2643-58.

Roitelman J, Masson D, Avner R, Ammon-Zufferey C, Perez A, Guyon-Gellin Y, et al Apomine, a novel hypocholesterolemic agent, accelerates degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and stimulates low density lipoprotein receptor activity. *J. Biol. Chem.* 2004 279(8):6465-6473.

Roelofs AJ, Edwards CM, Russell RGG, Ebetino FH, Rogers MJ, Hulley PA. Apomine enhances the antitumor effects of lovastatin on myeloma cells by down-regulating 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007;322(1):228-235.

Rondeau J. M., Bitsch F., Bourgier E., Geiser M., Hemmig R., Kroemer M., Lehmann S., Ramage P., Rieffel S., Strauss A., Green J. R. and Jahnke W. (2006). Structural basis for the exceptional in vivo efficacy of bisphosphonate drugs. *ChemMedChem* 1(2): 267-73.

Rosen G., Murphy M. L., Huvos A. G., Gutierrez M., and Marcove R. C. (1976). Chemotherapy, en bloc resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer* 37, 1-11.

Rosner M, Fuchs C, Siegel N, Valli A, Hengstschläger M. Functional interaction of mammalian target of rapamycin complexes in regulating mammalian cell size and cell cycle. *Hum. Mol. Genet.* 2009 1;18(17):3298-3310.

Ruoslahti E. (1991). "Integrins." *J Clin Invest* 87(1): 1-5.

Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, et al PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol. Cell.* 2007 23;25(6):903-915.

Sánchez-Muñoz A, Pérez-Ruiz E, Mendiola Fernández C, Alba Conejo E, González-Martín A. Current status of anti-angiogenic agents in the treatment of ovarian carcinoma. *Clin Transl Oncol.* 2009;11(9):589-595.

Sandberg A. A. and Bridge J. A. (2003). "Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors." *Cancer Genet Cytogenet* 145(1): 1-30.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005 18;307(5712):1098-1101.

Sassano A, Platanius LC. Statins in tumor suppression. *Cancer Lett.* 2008 18;260(1-2):11-19.

Sato M. and Grasser W. (1990). Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. *J Bone Miner Res* 5(1): 31-40.

Schajowicz F. (1993). *Histological typing of bone tumor.* Springer-Verlag(2nd ed): 10-13.

Scheffer G. L., Schroeijer , A. B., Izquierdo M. A., Wiemer E. A. and Scheper R. J. (2000). Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Curr Opin Oncol* 12(6): 550-6.

Schönbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? *Circulation.* 2004 1;109(21 Suppl 1):II18-26.

Schöffski P, Reichardt P, Blay J, Dumez H, Morgan JA, Ray-Coquard I, et al. A phase I-II study of everolimus (RAD001) in combination with imatinib in patients with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Ann Oncol .* 2010.

Serra M., Pasello M., Manara M. C., Scotlandi K., Ferrari S., Bertoni F., Mercuri M., Alvegard T. A., Picci P., Bacci G. and Smeland S. (2006). May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol. *Int J Oncol* 29(6): 1459-68.

Sever N, Song B, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, DeBose-Boyd RA. Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J. Biol. Chem.* 2003 26;278(52):52479-52490.

Sibilia J et Sordet C. Le Rituximab : une biothérapie originale dans les maladies auto-immunes. Encyclopédie Orphanet. Avril 2004 : <http://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-rituximab.pdf>

Swaminathan R. (2001). Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 313, 95-105.

Synold T. W., Dussault I. and Forman B. M. (2001). The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med* 7(5): 584-90.

Tanaka-Kamioka, K., Kamioka, H., Ris, H., and Lim, S. S. (1998). Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J Bone Miner Res* 13, 1555-1568.

Théoleyre S, Mori K, Cherrier B, Passuti N, Gouin F, Rédini F, et al. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating osteolytic tumors: use as a possible therapeutic approach of osteosarcoma. *BMC Cancer.* 2005;5:123.

Thompson K, Rogers MJ, Coxon FP, Crockett JC. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Mol. Pharmacol.* 2006;69(5):1624-1632.

Toppets V., Pastoret V., De Behr V., Antoine N., Dessy C., Gabriel A. 2004. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann. Méd. Vét* 148: 1-13.

Tsuda N, Murayama K, Ishida H, Matsunaga K, Komiya S, Itoh K, et al. Expression of a newly defined tumor-rejection antigen SART3 in musculoskeletal tumors and induction of HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by SART3-derived peptides. *J. Orthop. Res.* 2001;19(3):346-351.

Turner C. H, and Pavalko F. M. (1998). Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci* 3, 346-355.

Uesugi M, Koshino T, Mitsugi N. and Hiruma T. (2000). Predictive value of serum immunosuppressive acidic protein for lung metastasis after amputation of murine osteosarcoma of the lower limb. *Cancer Letter* 155: 169-172.

Van Beek E.R, Cohen L.H, Leroy I.M, Ebetino F.H, Lowik C.W, Papapoulos S.E. Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone* 2003; 33: 805-11.

Vrhovac R., Delmer A., Tang R., Marie J. P., Zittoun R. and Ajchenbaum-Cymbalista, F. (1998). Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* 91(12): 4694-700.

Wagner E. F. (2002). Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 2, ii40-42.

Wang C, Shui H, Chang T. In vivo evidence of duality effects for lovastatin in a nude mouse cancer model. *Int. J. Cancer*. 2010 15;126(2):578-582.

Wang L. (2005). Biology of osteogenic sarcoma. *Cancer J* 11(4): 294-305.

Wang L, Park P, Zhang H, La Marca F, Lin C. Prospective identification of tumorigenic osteosarcoma cancer stem cells in OS99-1 cells based on high aldehyde dehydrogenase activity. *Int J Cancer*. 2010.

Wang Z. Q., Ovitt C., Grigoriadis A. E., Mohle-Steinlein U., Ruther U. and Wagner E. F. (1992). Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 360, 741-745.

Wei N, Mi MT, Zhou Y. Influences of Lovastatin on membrane ion flow and intracellular signaling in breast cancer cells. *Cell Mol Biol Lett*. 2006 11;12(1):1-15.

Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, Young KM, Friedrichs K, Argyle DJ. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet. J*. 2008;175(1):69-75.

Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, et al Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*. 2002 23;110(4):489-500.

Yee KWL, Zeng Z, Konopleva M, Verstovsek S, Ravandi F, Ferrajoli A, et al Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin. Cancer Res*. 2006 1;12(17):5165-5173.

Young D. R., and Kobluk C. N. (1995). Disease of Bone. *The horse: disease and clinical management*, 737-790.

Yuasa T, Kimura S, Ashihara E, Habuchi T, Maekawa T. Zoledronic acid - a multiplicity of anti-cancer action. *Curr. Med. Chem*. 2007;14(20):2126-2135.

Liste des publications

Articles originaux acceptés dans des journaux internationaux à comité de lecture

Ory B, **Moriceau G**, Trichet V, Blanchard F, Berreur M, Rédini F, et al. Farnesyl diphosphate synthase is involved in the resistance to Zoledronic acid of osteosarcoma cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2008;12(3):928-941.

Articles originaux soumis dans des journaux internationaux à comité de lecture

Moriceau G, Ory B, Mitrofan L, Riganti C, Blanchard F, Brion R, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, Denis M, Shultz L.D, Mönkkönen J, Rédini F, Heymann D. Zoledronic acid potentiates mTOR inhibition and abolishes the resistance of osteosarcoma cells to RAD001 (Everolimus): pivotal role of the prenylation process. *Cancer research*, in revision. 2010

Moriceau G, Roelofs A.J, Brion R, Ebetino F. H, Redini F., Rogers M.J, Heymann D. Apomine potentiates the effect of Lovastatin on osteosarcoma cell growth and decreases the tumoral progression, in preparation

Reuves acceptées dans des journaux internationaux à comité de lecture

Moriceau G, Ory B, Gobin B, Verrecchia F, Gouin F, Blanchard F, Rédini F, Heymann D. Therapeutic approach of primary bone tumours by bisphosphonates. *Current pharmaceutical design*, in press. 2010

Lamoureux F, **Moriceau G**, Picarda G, Rousseau J, Trichet V, Rédini F. Regulation of osteoprotegerin pro- or anti-tumoral activity by bone tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010 Jan;1805(1):17-24.

Ory B, **Moriceau G**, Redini F, Heymann D. mTOR inhibitors (rapamycin and its derivatives) and nitrogen containing bisphosphonates: bi-functional compounds for the treatment of bone tumours. *Curr. Med. Chem.* 2007;14(13):1381-1387.

Revue citée dans le manuscrit

mTOR Inhibitors (Rapamycin and its Derivatives) and Nitrogen Containing Bisphosphonates: Bi-Functional Compounds for the Treatment of Bone Tumours

Benjamin Ory^{1, 2}, Gatien Moriceau^{1,2}, Françoise Redini^{1,2} and Dominique Heymann^{*,1,2,3}

¹INSERM, ERI 7, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, F-44035 France

²Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, F-44035 France

³CHU de Nantes, Nantes, F-44035 France

Abstract: N-BP, rapamycin and its derivatives have been originally developed respectively as anti-resorptive and anti-fungal agents. In fact, *in vitro* and *in vivo* experiments demonstrated that these compounds are multi-functional molecules exerting their effects on tumour cell growth and bone remodelling. The major challenge in treating cancer relates to mutations in key genes such as p53, Rb or proteins affecting caspase signalling carried by many tumour cells. Whether nitrogen containing bisphosphonates (N-BP) are potent bone inhibitors, they also inhibit tumour cell proliferation and increase atypical apoptosis of bone tumour cells regardless of the p53 and Rb status. N-BP may be then considered as effective therapeutic agents in clinical trials of bone tumours. Rapamycin and its derivatives inhibit mTOR dependent mRNA translation both in osteoclasts and tumour cells. Cellular physiological mechanisms regulated by mTOR integrate many environmental parameters including growth factors, hormones, cytokines, amino acids, energy availability and cellular stresses that are coupled with cell cycle progression and cell growth. Rapamycin and its derivatives as well as N-BP must be considered as bi-(multi) functional molecules affecting simultaneously bone and tumour metabolisms. The present survey describes these two molecular families and discusses their therapeutic interests for primary bone tumours and bone metastases.

Keywords: Rapamycin, bisphosphonate, bone, osteolysis, bone remodelling, primary bone tumours, metastases.

I. INTRODUCTION

Bone tumours can be divided into primary and secondary bone diseases. Malignant primary bone tumours are rare pathologies, among them osteosarcoma being the most frequent tumour in children (56% of all malignant tumours of bone) and adults with a poor prognosis due to its propensity to metastasis. Current therapeutic strategies of osteosarcoma are based on tumour resection associated with highly toxic chemotherapy [1]. Survival is closely related to the response of the tumour cells to anti-mitotic drugs, reaching 70% at 5 years in the best series and only 30% when pulmonary metastases are detected at the time of diagnostic. These data demonstrate that the response to the conventional treatment (chemotherapy) is disappointing, showing questionable benefit in terms of improvement in disease-free survival. The second type of bone tumours is composed by bone metastases from non osseous primary origin and unfortunately, the development of bone metastatic disorders are very often associated with a fatal outcome. In all series reported, the most common site of first cancer relapse is bone as more than 50% of patients will develop bone metastases at the time of first recurrence [2]. Bone metastases are usually osteolytic tumours, and may be expected to complicate the course of up to 80% of patients with disseminated disease, with pathologic fracture and/or hypercalcemia.

The combinatorial chemistry allows the emergence of new molecular families targeting specifically key enzymes of cellular metabolism and signalling pathways. The present survey focuses on two molecular families derived from rapamycin and endogenous pyrophosphate, which represent future therapeutic approaches of tumour osteolytic diseases.

II. COMPOUNDS DERIVED FROM ENDOGENOUS PYROPHOSPHATE AND RAPAMYCIN: TWO CLASSES OF THERAPEUTIC AGENTS TARGETING BONE RESORPTION AND TUMOUR GROWTH

Histological analyses of osteolytic primary and secondary bone tumours reveal that bone destruction is mediated by osteoclasts rather than by tumour cells themselves. The interactions between tumour cells, soluble tumour-derived factors and bone microenvironment are crucial for the initiation and promotion of skeletal malignancies. These observations suggest the existence of a vicious cycle driving the formation of osteolytic bone tumours. In short, tumour cells and modified bone microenvironment induce the recruitment of osteoclast progenitors which in turn destroy bone tissue and release growth factors favourable to the proliferation of tumour cells [3]. As the activators of bone resorption and tumour growth are involved in a common vicious cycle, the modulation of bone resorption by biological and chemical agents may interfere with the tumour growth and reciprocally. To block this vicious cycle that takes place during tumour development in bone site, molecules exerting a bi-functional activity (anti-bone resorption and anti-tumour cell proliferation) are now envisaged.

1. The Nitrogen Containing Bisphosphonates Derived from Endogenous Pyrophosphate

Bisphosphonates are simple chemical compounds which structure is based on a phosphorus-carbon-phosphorus template. These compounds are characterized by their strong affinity for bone hydroxyapatite crystals and their anti-resorptive potency [4]. Three main groups of bisphosphonates are described (see review in [1]): (i) the first generation is constituted by simple substituents attached to the central carbon and weakly inhibits the bone resorption; (ii) the second generation possesses an aliphatic side chain containing a single nitrogen atom and exerts a more potent anti-resorptive activity compared to the first generation; (iii) the compounds of the third generation contain a heterocyclic substituent with one or two nitrogen atoms and are powerful bone resorption inhibitors

*Address correspondence to this author at the Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, F-44035 France; Tel: +33 2 40 41 28 45; Fax: +33 2 40 41 28 60; E-mail: dominique.heyman@univ-nantes.fr

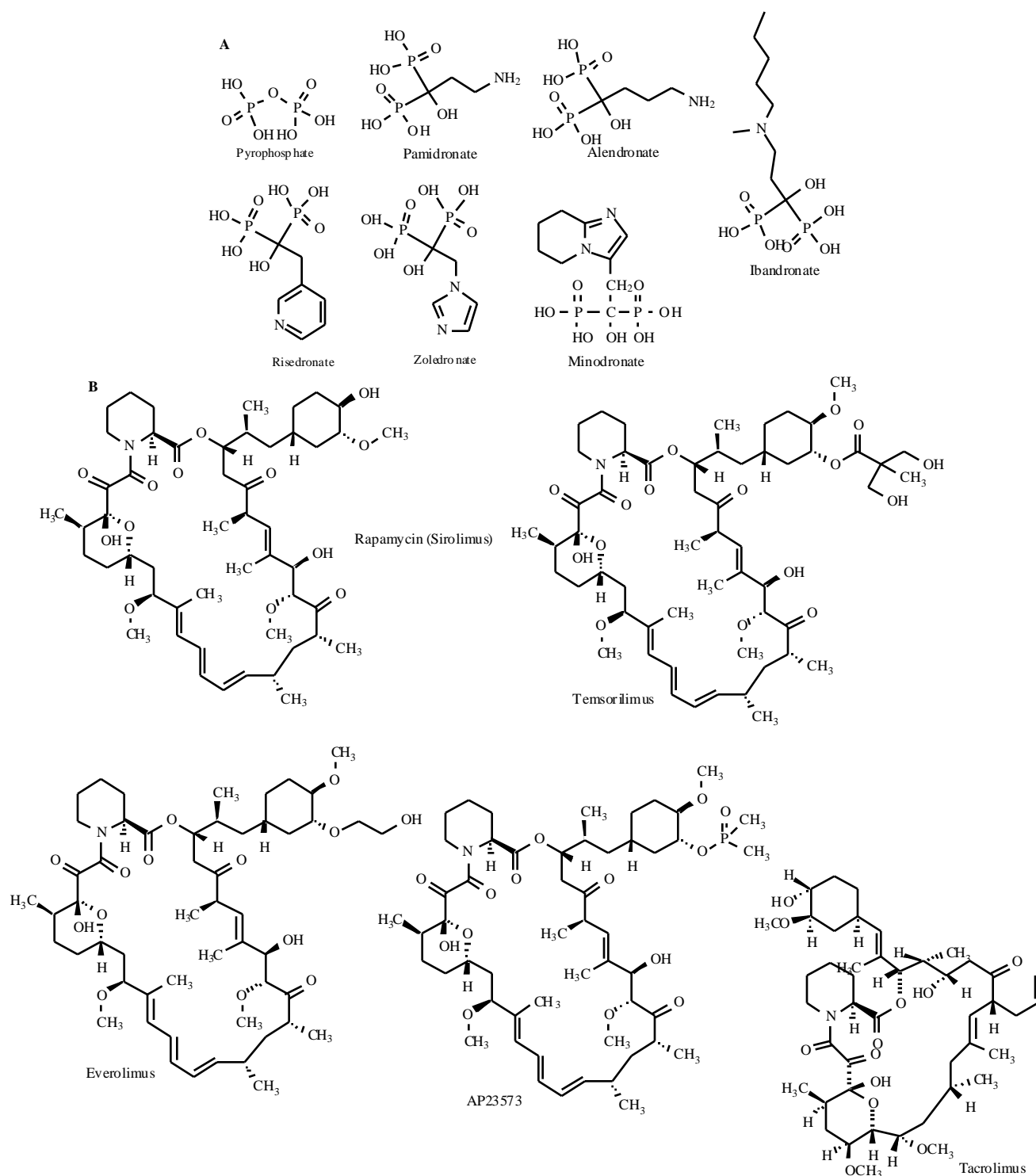


Fig. (1). Chemical structures of mTOR inhibitors (rapamycin and derivatives) and N-BP.

(A) N-BP structure compared to pyrophosphate. Pamidronate, alendronate and ibandronate belong to the second-generation of bisphosphonate characterized by a nitrogen atom in their side chain. Pamidronate has a relative potency of 100; alendronate, 100–1000 and ibandronate, 1000–10 000. Risedronate, minodronate and zoledronate belong to the third-generation of bisphosphonates characterized by a heterocyclic side chain with one or two nitrogen atoms. Risedronate has a relative potency of 1000–10 000; zoledronic acid and minodronate >10 000.

(B) chemical structures of rapamycin and their derivatives. Despite its similar name and chemical structure, tacrolimus is not a mTOR inhibitor, but binds to FKBP12 to inhibit calcineurin similarly to cyclosporine.

and anti-tumour agents (Fig. 1A). Although all bisphosphonates induce the apoptosis of osteoclasts, they precociously affect osteoclast function (Fig. 2A). Thus, in contrast to the first generation of bisphosphonates which are metabolised in cytotoxic analogues of ATP, the N-BP inhibit

the activity of two enzymes involved in the mevalonate pathway: farnesyl diphosphate synthase (FPP) and geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPP) [5] (Fig. 2B). The inhibition of FPP and GGPP is responsible to the loss of the ruffled border and modifications of the cytoplasmic actin ring.

These alterations then induce the apoptosis of osteoclasts primarily due to loss of geranylgeranylated small GTPases [6]. FPP and GGPP are required for the posttranslational lipid modification (prenylation) of small GTPases (i.e. Ras, Rho, and Rac). Prenylation involves the transfer of a farnesyl or geranylgeranyl lipid group onto a cysteine residue in carboxy-terminal domains, giving rise to farnesylated and geranylgeranylated proteins. Such biochemical reactions are essential for the anchorage of small GTPases to cell membranes and to protein-protein interactions. Therefore, the inhibition of the mevalonate pathway is associated with the loss of prenylation of small GTPases including Rho, Rac, cdc42 and Rab which could account for the numerous effects observed on cancer cells (see following paragraph). Although the molecular mechanism by which bisphosphonates affect osteoclasts are now evident, the potential route by which they are internalised by cells has been very recently elucidated [7]. Using a novel fluorescently labelled analog of alendronate, Thompson *et al.* revealed that labelled bisphosphonate was rapidly internalised into intracellular vesicles in J774 macrophages and rabbit osteoclasts [7]. These results demonstrated that cellular uptake

of nitrogen bisphosphonates requires fluid-phase endocytosis whereas transfer from endocytic vesicles into the cytosol requires endosomal acidification [7]. More recently, Saltel *et al.* described a new property of mature multinucleated osteoclasts to transmigrate through various cell types of the bone microenvironment. Such activity can be activated by bone metastatic breast cancer cells and is abolished by bisphosphonate treatment. In this context, the blockade of osteoclast transmigration by bisphosphonates represents a new therapeutic strategy for bone diseases associated with an excessive osteoclast resorption [8].

Although bisphosphonates are powerful agents to treat degenerative bone diseases such as osteoporosis, recent *in vitro*, pre-clinical and clinical data demonstrated that N-BP exert anti-tumour activities especially in breast, prostate, lung renal, osteosarcoma and chondrosarcoma [4, 9, 10]. This phenomenon can be explained by induction of tumour-cell apoptosis [10], inhibition of cell proliferation [11], modulation of tumour-cell adhesion and inhibition of tumour-cell dissemination [12]. In fact, even if these anti-tumour activities

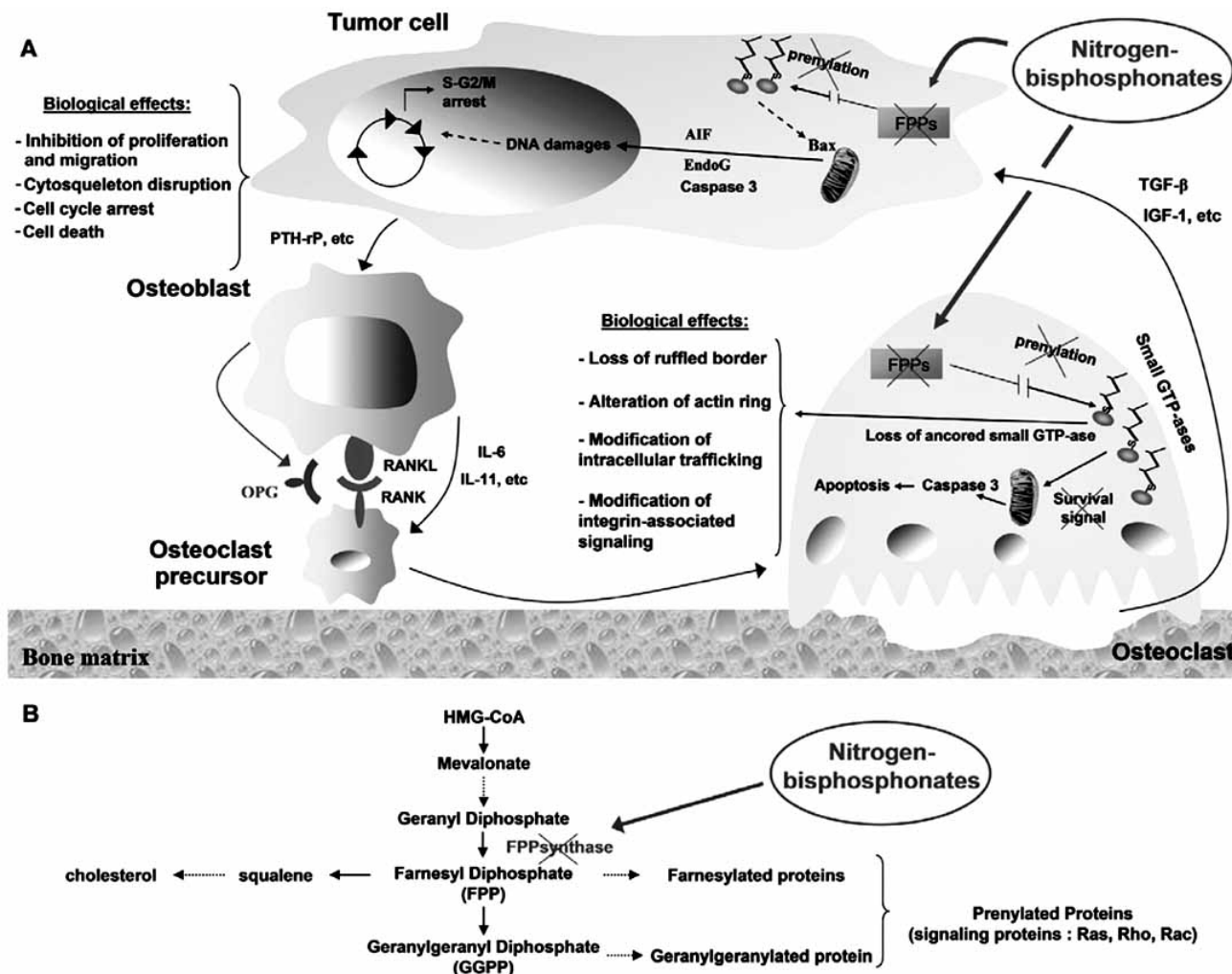


Fig. (2). N-BP: bi-functional compounds in osteolytic bone tumours context.

The main mechanism of action of N-BP is to inhibit the mevalonate pathway, especially farnesyl diphosphate (FPP) synthase and geranylgeranyl diphosphate (GGPP) synthase activities (B). Consequently the posttranslational lipid modification (prenylation) of small GTPase is abolished, then inhibiting their cell membrane anchorage. Several cellular pathways are affected by N-BP that induce lots of biological effects on osteoclast including apoptosis (A). The inhibition of the mevalonate pathway inhibition also affects the tumour cell growth characterized by cycle arrest and induction of apoptosis. IGF1: Insulin Growth Factor-1; TGF-b: Transforming Growth Factor-b; IL-6, -11: Interleukin-6, -11; PTH-rP: ParaThyroid Hormone related Protein.

are not fully understood, the data of the literature reveal that N-BP such as zoledronic acid induce tumour cell death, block the cell cycle in S-G2/M phases and modify the cyclin expression [13-15]. Furthermore, very recent data revealed that zoledronic acid induces atypic apoptosis of osteosarcoma cells characterised by nuclear alterations and modification of the Bax/Bcl2 equilibrium in favour of Bax [15]. Cell death induced by zoledronic acid is also associated with increased mitochondrial permeability and translocation of Apoptosis Inducing Factor (AIF) and Endonuclease-G (Endo-G), independently of caspase activation [16]. Furthermore, zoledronic acid also disturbs cytoskeletal organization and cell junctions, down regulates phosphorylation of focal adhesion kinases resulting in a slow down of cell migration, cell shape alterations and inhibition of cell spreading [15, 16]. Interestingly, zoledronic acid associated cell death bypasses the mutations of p53 and Rb, two key genes frequently mutated in tumour cells [16, 17]. Thus, the p53-, Rb-independent anti-tumour activities of zoledronic acid suggest that it may be an attractive agent for treating cancers, especially those with chemoresistance resulting from the loss of p53 or Rb function. Indeed, several mutations or inactivations of the anti-oncogenes p53 and Rb are detected in 50% of patients suffering from osteosarcoma [17, 18].

Preclinical [4, 9, 10, 16] and clinical [19-21] data demonstrated the therapeutic interest to associate N-BP and conventional chemotherapeutic drugs in terms of survival, tumour progression and tissue repair. Indeed, the N-BP increase the effects of anti-cancer drugs in various cell lines [22-25] and *in vivo* combination of bisphosphonates with anti-cancer agents such as uracil and tegafur causes an enhanced reduction of bone metastases compared to UFT (tegafur/uracil) alone [26]. Similarly, we reported recently the enhancement of tumour regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma [9]. Furthermore, zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma lung metastase-bearing mice [27]. Synergistic effect of the combination of zoledronic acid and radiation has been also revealed recently *in vitro* on breast cancer cells [28]. These observations led to investigate the effects of a N-BP alone or in combination with anti-cancer drugs on tumor cells in clinical context. Thus, clinical trials established the benefit to use such therapeutic approach in cancer diseases [19-21, 29, 30] as well as in the treatment of osteoporosis [31, 32] and. However, clinical trials using zoledronic acid also pointed out the potential risk of osteonecrosis of the jaw in treated patients, length of exposure appearing to be the most important risk factor for this complication [33, 34]. This question is still open, as the patients diagnosed with jaw osteonecrosis probably had a concurrent infection, being aggressively treated with antibiotics [34]. Further clinical evaluations are needed before stating definitively on the adverse effects of N-BP.

Overall, as the literature clearly demonstrated that the N-BP can be used as very efficient anti-resorption agents and as anti-tumour molecules with some limits, these compounds can be then considered as bi-functional agents useful for the treatment of tumour bone diseases.

2. The Compounds Derived from Rapamycin

Sirolimus is a macrolide antibiotic first discovered as a product of the bacterium *Streptomyces hygroscopicus* in a soil sample from an island called Rapa Nui, better known as Easter Island [35] (Fig. 1B). Sirolimus is also known as rapamycin and has been originally developed as an antifungal agent. However, this application was abandoned when it was discovered that rapamycin had potent immunosuppressive and anti-proliferative properties. Rapamycin is a specific inhibitor of the target of rapamycin (TOR), initially identified in screening

assay for rapamycin-resistant yeast mutant. The mammalian orthologue called mTOR, is a conserved ser/thr kinase, a member of the phosphoinositide 3-kinase-related kinase (PIKK) family such as other central protein like Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) and Ataxia Telangiectasia Related (ATR) proteins which are involved in DNA repair [36]. This ser/thr kinase has a broad impact on cellular function including control of cell growth [37, 38], cytoskeletal organization [39, 40], autophagy [41, 42], transcription activities and initiation and regulation of translation [43, 44].

To regulate these cellular physiological mechanisms, mTOR integrates many environmental parameters including growth factors, hormones, cytokines, amino acids, energy availability and cellular stresses. The knowledge of mTOR signalling has been greatly improved by studying the insulin receptor/Akt signalling network. Indeed, the insulin/insulin-like growth factor (IGF) system control cell and organismal growth similarly to nutrients [45] (Fig. 3). Insulin and IGF bind to the insulin receptor, inducing Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) and class I PhosphoInositide 3 Kinase (PI3K) activation. PI3K then converts PIP2 to PIP3 (phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate) in contrast to the phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue deleted on chromosome 10) which is considered as a tumour suppressor gene mutated in many human cancers involving the mTOR pathway [46-47-50]. PIP3 recruits both Phosphoinositide Dependent Kinase 1 (PDK1) and Akt to the plasma membrane and subsequently PDK1 activates Akt by Thr 308 phosphorylation [46]. Thereafter, phospho-Akt phosphorylates lots of targets to increase cell survival and growth, including Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) [51]. Akt disrupts the TSC complexes (composed by TSC1 and TSC2) inactivating TSC2 GTPase-activity which enables the conversion of active GTP-Rheb into inactive GDP-Rheb (mTOR activator) [52].

mTOR is also strongly linked to the energy cell status by the 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway [53]. Indeed, changes in the intracellular ATP/AMP ratio activate Leukotoxin translocation ATP-binding protein-1 (LKBP1) and AMPK that is able to activate TSC2 or not, thereby inhibiting mTOR activation or not in response to energy status. Moreover, amino acids are also able to directly regulate mTOR activity [54]. Subsequently, protein synthesis is regulated by mTOR complex 1 [composed by mTOR, Regulatory Associated Protein of mTOR (raptor) and G-protein β subunit-like (G β L)] which phosphorylates several substrates including ribosomal S6 kinase (S6K) and the eukaryote initiation factor 4E binding protein-1 (4EBP-1) [55]. Once activated, S6K phosphorylates the ribosomal protein S6, resulting in the translation of a subset of mRNAs encoding for essential ribosome proteins, including eukaryotic initiation factor-4B (eIF4B) and increasing translation mechanisms. The second target of mTOR is the translational repressor 4EBP-1. After phosphorylation, 4EBP-1 becomes unable to inhibit the cap-dependent initiation factor eIF-4E which then directly increases cell growth through the regulation of key oncogenic proteins such as c-Myc, Cyclin D1, FGF and VEGF [56]. Therefore, mTOR plays a key role in cell metabolism and is able to regulate cell entry into G1 phase which depends on numerous environmental factors. Another mTOR complex called mTOR complex 2, insensitive to Rapamycin has been also evidenced and is composed by mTOR, Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR (rictor) and G β L. This second complex may control the cytoskeletal organization [57].

In light of these data, rapamycin exerts its activities on cellular metabolism and inhibits the growth of a broad spectrum of cancer including breast and colon carcinomas, rhabdomyosarcoma and osteosarcoma [58-63]. Rapamycin (Rapamune®, Wyeth Ayerst) and its analogues (Fig. 1B)

temserolimus (CCI-779, Wyeth Ayerts, PA, USA), everolimus (RAD001, Novartis, Switzerland) or AP23573 (Ariad, Pharmaceuticals, MA, USA) do not directly inhibit mTOR but bind to the cytosolic protein FK-binding protein 12 (FKBP12) to form a complex inhibiting mTOR [64].

These compounds have shown promise in preclinical models and clinical trials including patients suffering from carcinomas, solid malignancies, hematologic disorders and sarcomas such as osteosarcoma [65-69]. Thus, rapamycin reduces tumour cell metastases in a murine model of osteosarcoma [67]. Furthermore, immuno-suppression maintenance with the mTOR inhibitors, sirolimus and everolimus, is associated with a significantly reduced risk of developing any posttransplant de novo malignancy and non-skin solid malignancy [70]. Despite its similar name and chemical structure, tacrolimus (FK506, Prograf®, Fujisawa, Japan) (Fig. 1B) is not a mTOR inhibitor like sirolimus and everolimus, but binds to FKBP12 to inhibit calcineurin similarly to cyclosporine. However, it has a similar suppressive effect on the immune system *via* different pathways. Sirolimus inhibits the response to interleukin-2 thereby blocking T- and B-cell activation, while tacrolimus and cyclosporine inhibit the production of interleukin-2. Although most immuno-suppressive treatments are known to potentiate neoplastic diseases, data of the literature support the use of rapamycin derivatives in the face of prior malignancy [71]. Similarly to N-

BP, inhibitors of rapamycin have been already envisaged in therapeutic combination with anti-cancer drugs. Thus, recently, Treeck *et al.* studied the *in vitro* effects of combined treatment of RAD001 and tamoxifen on growth and apoptosis of human cancer cells [72]. They demonstrated that mTOR inhibition is able to restore tamoxifen response in tamoxifen-resistant breast cancer cells and moreover that these therapeutic agents exert an additive anti-tumour effect on ovarian and breast cancer cells. Similar results have been observed in xenograft models of human pancreatic cancer based on a combination of gemcitabine and CCI-779 [73] which has achieved clinical response in a patient with metastatic leiomyosarcoma [74]. Combination of rapamycin, or sirolimus with HER1/epidermal growth factor receptor inhibitors has been assessed *in vitro* and *in vivo* with success [75-77]. Such combinatory therapies reduce the potential risk of acquired resistance mechanisms already observed with mTOR inhibitors [78].

Rapamycin and derivatives (excepted tacrolimus) also influence bone tissues. Indeed, mTOR appears as an essential signalling pathway engaged in the stimulation of osteoclast survival [79] and affects osteoblast differentiation [80]. Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α), Receptor Activator of Nuclear Factor B Ligand (RANKL) and Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) promote osteoclast survival by signalling through mTOR/S6K [70]. Furthermore, the signalling intermediates for mTOR/S6K activation include

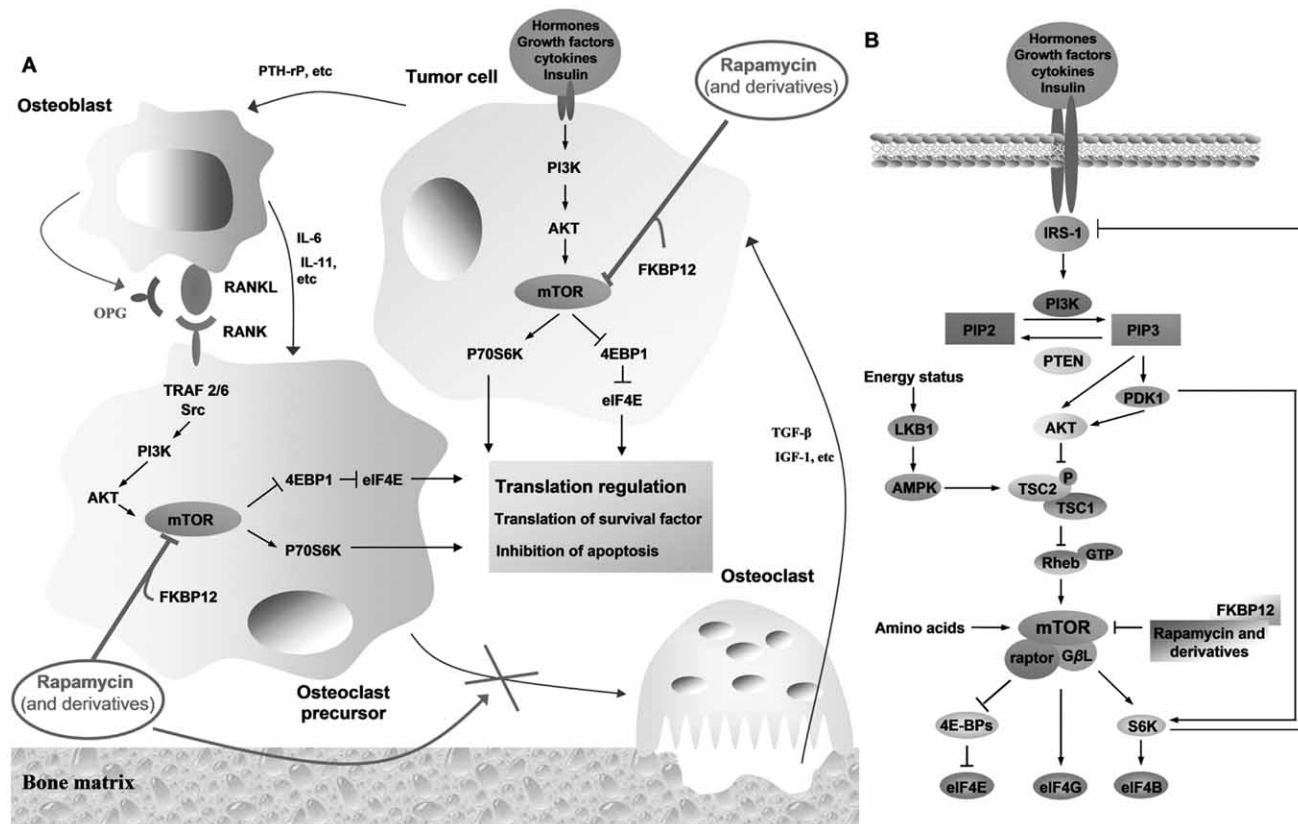


Fig. (3). Rapamycin and their derivatives: bi-functional compounds in osteolytic bone tumours context.

(A) Rapamycin derivatives (mTOR inhibitors) affect tumour cell biology and bone remodelling. Indeed, rapamycin derivatives disturb osteoclast differentiation and survival in agreement with the involvement of mTOR in RANKL, TNF and M-CSF signalling pathways. They also induce tumour cell apoptosis by disrupting cell cycle progression and cell growth. (B) Rapamycin and their derivatives bind to the cytosolic protein FK-binding protein 12 (FKBP12). mTOR pathway regulates cell growth, cytoskeletal organization, autophagy, transcription, translation initiation and regulation. To regulate these cellular mechanisms, mTOR integrates many environmental parameters: growth factors, hormones and cytokines by PI3K/Akt pathway, energy status by LKB1/AMPK pathway and amino acid availability. Consequently, mTOR regulates the translation of essential ribosome proteins, including eIF4B and translational repressor, 4EBP-1.

phosphatidylinositol-3 kinase, Akt, Erk and geranylgeranylated proteins, and inhibitors of these intermediates suppress S6K activation associated with osteoclast apoptosis. In this context, Rapamycin derivatives disturb osteoclast differentiation and survival. Thus, everolimus is a potent inhibitor of bone resorption and reduces osteoclastic differentiation [79]. Similarly, Sugutani and Hruska [81] demonstrated that mTOR stimulation by M-CSF leading to Bim inhibition plays a pivot function for cell survival in isolated osteoclast precursors.

Although further experiments are necessary to determine the real impact of mTOR inhibitors in bone metabolism (appropriate dose, period of administration) [82], they appear as bi-functional molecules able to target tumour cells and bone-resorptive cells. Similarly to bisphosphonates, first evidence emerge and reveal the interest to associate mTOR inhibitors with conventional chemotherapeutic drugs which can synergize together [83, 84].

III. CONCLUSIONS

Primary and secondary bone tumours frequently associate tumour growth and alterations of bone remodelling process. New therapeutic strategies of bone tumours target on the two main cellular protagonists strongly involved in these pathologies, tumour cells and osteoclasts. Taken together, the data presented above demonstrate that N-BP derived from endogenous pyrophosphate and rapamycin derivatives might be considered as bi (multi)-functional molecules that exert both endogenous anti-tumour and anti-osteolytic activities through distinct mechanisms and can be envisaged for the treatment of tumour bone diseases. However, if N-BP are powerful anti-resorptive agents with secondary activities on cancer cells, rapamycin derivatives are powerful anti-tumour compounds with complementary activities on bone tissue. Although both therapeutic agents are bi-functional, recent clinical data point out the interest to associate these molecules together or with other chemotherapeutic agents. Such associations demonstrated the synergistic effects of these compounds which target the tumour cells and osteoclasts through distinct biological pathways. These associations have also other interests, especially to limit the risk of therapeutic resistance developed by tumour cells. Indeed, several tumour cells develop resistance to many chemotherapeutic agents, mainly associated with the multidrug resistant phenotype. For instance, some rapamycin derivatives are substrates for cytochrome 3A4 and P-gp, known to influence the pharmacokinetics and bioavailability of many drugs that become ineffective on tumour cells presenting this multidrug resistant phenotype. In this context, the association of these two bi-functional compounds targeting tumour cells and bone cells through distinct pathways may limit the risk of drug resistances and represent a future therapeutic approach of tumour osteolytic diseases.

REFERENCES

- Rosen, G.; Murphy, M.L.; Huvos, A.G.; Gutierrez, M.; Marcove, R.C. *Cancer*, **1976**, *37*, 1.
- Harris, J.; Hellman, S.; Henderson, I.C.; Kinne, D.W. *Bone diseases*. Lippincott JB, Philadelphia, **1987**.
- Wittrant, Y.; Théoleyre, S.; Chipoy, C.; Padrines, M.; Blanchard, F.; Heymann, D.; Rédini, F. *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, *1704*, 49.
- Heymann, D.; Ory, B.; Gouin, F.; Green, J.R.; Rédini, F. *Trends Mol. Med.*, **2004**, *10*, 337.
- Kavanagh, K.L.; Guo, K.; Dunford, J.E.; Wu, X.; Knapp, S.; Ebetino, F.H.; Rogers, M.J.; Russell, R.G.; Oppermann, U. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, *103*, 7829.
- Coxon, F.P.; Helfrich, M.H.; Van't Hof, R.; Sebti, S.; Ralston, S.H.; Hamilton, A.; Rogers, M. *J. Bone Miner. Res.*, **2000**, *15*, 1467.
- Thompson, K.; Rogers, M.J.; Coxon, F.P.; Crockett, J.C. *Mol. Pharmacol.*, **2006**, *69*, 1624.
- Saltel, F.; Chabanel, A.; Zhao, Y.; Lafage-Proust, M.H.; Clézardin, P.; Jurdic, P.; Bonnellye, E. *J. Bone Miner. Res.*, **2006**, *21*, 1913.
- Heymann, D.; Ory, B.; Blanchard, F.; Heymann, M.F.; Coipeau, P.; Charrier, C.; Couillaud, S.; Thiery, J.P.; Gouin, F.; Redini, F. *Bone*, **2005**, *37*, 74.
- Gouin, F.; Ory, B.; Rédini, F.; Heymann, D. *Int. J. Cancer*, **2006**, *119*, 980.
- Senaratne, S.G.; Pirianov, G.; Mansi, J.L.; Arnett, T.R.; Colston, K.W. *Br. J. Cancer*, **2000**, *82*, 1479.
- Lee, M.V.; Fong, E.M.; Singer, F.R.; Guenette, R.S. *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 2602.
- Boissier, S.; Ferreras, M.; Peyruchaud, O.; Magnetto, S.; Ebetino, F.H.; Colombel, M.; Delmas, P.; Delaisse, J.M.; Clezardin, P. *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 2949.
- Evdokiou, A.; Labrinidis, A.; Bouralexis, S.; Hay, S.; Findlay, D.M. *Bone*, **2003**, *33*, 216.
- Kubista, B.; Trieb, K.; Sevelde, F.; Toma, C.; Arrich, F.; Heffeter, P.; Elbling, L.; Sutterluty, H.; Scotlandi, K.; Kotz, R.; Micksche, M.; Berger, W. *J. Orthop. Res.*, **2006**, *24*, 1145.
- Ory, B.; Blanchard, F.; Battaglia, S.; Gouin, F.; Rédini, F.; Heymann, D. *Mol. Pharmacol.*, **2006**, *71*, 333.
- Fuchs, B.; Pritchard, D.J. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, **2002**, *397*, 40.
- Wadayama, B.; Toguchida, J.; Shimizu, T.; Ishizaki, K.; Sasaki, M.S.; Kotoura, Y.; Yamamuro, T. *Cancer Res.*, **1994**, *54*, 3042.
- Kuroda, J.; Kimura, S.; Segawa, H.; Sato, K.; Matsumoto, S.; Nogawa, M.; Yuasa, T.; Kobayashi, Y.; Yoshikawa, T.; Ottmann, O.G.; Maekawa, T. *Cancer Sci.*, **2004**, *95*, 186.
- Carteni, G.; Bordonaro, R.; Giotta, F.; Lorusso, V.; Scalone, S.; Vinaccia, V.; Rondena, R.; Amadori, D. *Oncologist*, **2006**, *11*, 841.
- Michaelson, M.D.; Kaufman, D.S.; Kantoff, P.; Oh, W.K.; Smith, M.R. *Cancer*, **2006**, *107*, 530.
- Kuroda, J.; Kimura, S.; Segawa, H.; Kobayashi, Y.; Yoshikawa, T.; Urasaki, Y.; Ueda, T.; Enjo, F.; Tokuda, H.; Ottmann, O.G.; Maekawa, T. *Blood*, **2003**, *102*, 2229.
- Matsumoto, S.; Kimura, S.; Segawa, H.; Kuroda, J.; Yuasa, T.; Sato, K.; Nogawa, M.; Tanaka, F.; Maekawa, T.; Wada, H. *Lung Cancer*, **2005**, *47*, 31.
- Yuasa, T.; Nogawa, M.; Kimura, S.; Yokota, A.; Sato, K.; Segawa, H.; Kuroda, J.; Maekawa, T. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*, 853.
- Neville-Webe, H.L.; Evans, C.A.; Coleman, R.E.; Holen, I. *Tumour Biol.*, **2006**, *27*, 92.
- Hiraga, T.; Ueda, A.; Tamura, D.; Hata, K.; Ikeda, F.; Williams, P.J.; Yoneda, T. *Int. J. Cancer*, **2003**, *106*, 973.
- Ory, B.; Heymann, M.F.; Blanchard, F.; Kamijo, A.; Gouin, F.; Heymann, D.; Rédini, F. *Cancer*, **2005**, *104*, 2522.
- Tannir, N.; Jonasch, E.; Pagliaro, L.C.; Mathew, P.; Siefker-Radtke, A.; Rhines, L.; Lin, P.; Tibbs, R.; Do, K.A.; Lin, S.H.; Tu, S.M. *Cancer*, **2006**, *107*, 497.
- Kiagia, M.; Karapanagiotou, E.; Charpidou, A.; Dilana, K.; Dionellis, G.; Damos, I.; Georgiou, E.; Syrigos, K.N. *Anticancer Res.*, **2006**, *26*, 3133.
- Andrizky, B.; Schuch, G.; Thoem, I.; Goern, M.; Brandl, S.; Bokemeyer, C.; Laack, E. *Onkologie*, **2006**, *29*, 206.
- Kishimoto, H.; Fukunaga, M.; Kushida, M.; Shiraki, M.; Itabashi, A.; Nawata, H.; Nakamura, T.; Ohta, H.; Takaoka, K.; Oahshi, Y.; Risedronate Phase III research group. *J. Bone Miner. Res.*, **2006**, *24*, 405.
- De Nijs, R.N.; Jacobs, J.W.; Lems, W.F.; Laan, R.F.; Algra, A.; Huisman, A.M.; Buskens, E.; De Laet, C.E.; Oostveen, A.C.; Geusen, P.P.; Bruyn, G.A.; Dijkmans, B.A.; Bijlsma, J.W.; STOP investigators. *N. Engl. J. Med.*, **2006**, *355*, 675.
- Ural, A.U.; Avcu, F.; Candir, M.; Guden, M.; Ozcan, M.A. *Breast Cancer Res.*, **2006**, *8*, R52.
- Bamias, A.; Kastiris, E.; Bamia, C.; Moulouopoulos, L.A.; Melakopoulos, I.; Kozas, G.; Koutsoukou, V.; Gika, D.; Anagnostopoulos, A.; Pappimitriou, C.; Terpos, E.; Dimopoulos, M.A. *J. Clin. Oncol.*, **2005**, *23*, 8580.
- Thakkar, S.G.; Isada, C.; Smith, J.; Karam, M.A.; Reed, J.; Tomford, J.W.; Englund, K.; Richmond, M.; Licata, M.; Hatch, C.; Hussein, M.A. *Med. Oncol.*, **2006**, *23*, 51.
- Vezina, C.; Kudelski, A.; Sehgal, S.N. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **1975**, *28*, 721.
- Wullschlegel, S.; Loewith, R.; Hall, M.N. *Cell*, **2006**, *124*, 471.
- De Virgilio, C.; Loewith, R. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2006**, *38*, 1476.
- Reiling, J.H.; Sabatini, D.M. *Oncogene*, **2006**, *25*, 6373.
- Jiang, X.; Yeung, R.S. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 5258.
- Petiot, A.; Patingre, S.; Arico, S.; Meley, D.; Codgno, P. *Cell Struct. Funct.*, **2002**, *27*, 431.
- Heymann, D. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **2006**, *7*, 443.
- Mamame, Y.; Petroulakis, E.; LeBacquer, O.; Sonenberg, N. *Oncogene*, **2006**, *25*, 6416.
- Averous, J.; Proud, C.G. *Oncogene*, **2006**, *25*, 6423.
- Avruch, J.; Hara, K.; Lin, Y.; Liu, M.; Long, X.; Ortiz-Vega, S.; Yonezawa, K. *Oncogene*, **2006**, *25*, 6361.
- Vivanco, I.; Sawyers, C.L. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 489

- [47] Tsuruta, H.; Kishimoto, H.; Sasaki, T.; Horie, Y.; Natsui, M.; Shibata, Y.; Hamada, K.; Yajima, N.; Kawahara, K.; Sasaki, M.; Tsuchiya, N.; Enomoto, K.; Mak, T.W.; Nakano, T.; Habuchi, T.; Suzuki, A. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 8389.
- [48] Anai, S.; Goodison, S.; Shiverick, K.; Iczkowski, K.; Tanaka, M.; Rosser, C.J. *Hum. Gene Ther.*, **2006**, *17*, 975.
- [49] Cao, C.; Sbhawong, T.; Albert, J.M.; Kim, K.W.; Geng, L.; Sekhar, K.R.; Gi, Y.J.; Lu, B. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 10040.
- [50] Schmidt, H.; DeAngelis, G.; Eltze, E.; Gockel, I.; Semjonow, A.; Brandt, B. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 8959.
- [51] Inoki, K.; Li, Y.; Zhu, T.; Wu, J.; Guan, K.L. *Nat. Cell Biol.*, **2002**, *4*, 648.
- [52] Zhang, Y.; Gao, X.; Saucedo, L.J.; Ru, B.; Edgar, B.A.; Pan, D. *Nat. Cell Biol.*, **2003**, *5*, 578.
- [53] Inoki, K.; Ouyang, H.; Zhu, T.; Lindvall, C.; Wang, Y.; Zhang, X.; Yang, Q.; Bennett, C.; Harada, Y.; Stankunas, K.; Wang, C.Y.; He, X.; MacDougald, O.A.; You, M.; Williams, B.O.; Guan, K.L. *Cell*, **2006**, *126*, 955.
- [54] Avruch, J.; Hara, K.; Lin, Y.; Liu, M.; Long, X.; Ortiz-Vega, S.; Yonezawa, K. *Oncogene*, **2006**, *25*, 6361.
- [55] Hara, K.; Yonezawa, K.; Weng, Q.P.; Kozlowski, M.T.; Belham, C.; Avruch, J. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 14484.
- [56] Mamane, Y.; Petroulakis, E.; LeBacquer, O.; Sonenberg, N. *Oncogene*, **2006**, *25*, 6416.
- [57] Jacinto, E.; Loewith, R.; Schmidt, A.; Lin, S.; Ruegg, M.A.; Hall, A.; Hall, M.N. *Nat. Cell Biol.*, **2004**, *6*, 1122.
- [58] Huang, S.; Houghton, P.J. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **2002**, *3*, 295.
- [59] Rowinsky, E.K. *Curr. Opin. Oncol.*, **2004**, *16*, 564.
- [60] Thomas, G.V. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2006**, *16*, 78.
- [61] Young, D.A.; Nickerson-Nutter, C.L. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2005**, *5*, 418.
- [62] Rubio-Viqueira, B.; Hidalgo, M. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **2006**, *7*, 501.
- [63] Witzig, T.E.; Kaufmann, S.H. *Curr. Treat. Options Oncol.*, **2006**, *7*, 285.
- [64] Cruz, M.C.; Cavallo, L.M.; Gorch, J.M.; Cox, G.; Perfect, J.R.; Cardenas, M.E.; Heitman, J. *Mol. Cell Biol.*, **1999**, *19*, 4101.
- [65] Khariwala, S.S.; Kjaergaard, J.; Lorenz, R.; Van Lente, F.; Shu, S.; Strome, M. *Laryngoscope*, **2006**, *116*, 814.
- [66] Wan, X.; Mendoza, A.; Khanna, C.; Helman, L.J. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 2406.
- [67] Cutler, C.; Antin, J.H. *Cancer*, **2004**, *100*, 657.
- [68] Kauffman, H.M.; Cheriak, W.S.; Cheng, Y.; Hanto, D.W.; Kahan, B.D. *Transplantation*, **2005**, *80*, 883.
- [69] Reddy, G.K.; Mughal, T.I.; Rini, B.I. *Clin. Genitourin Cancer*, **2006**, *5*, 110.
- [70] Glantschig, H.; Fisher, J.E.; Wesolowski, G.; Rodan, G.A.; Reszka, A.A. *Cell Death Diff.*, **2003**, *10*, 1165.
- [71] Easton, J.B.; Houghton, P.J. *Oncogene*, **2006**, *25*, 6436.
- [72] Treeck, O.; Wackwitz, B.; Haus, U.; Ortmann, O. *Gynecol. Oncol.*, **2006**, *102*, 292.
- [73] Ito, D.; Fujimoto, K.; Mori, T.; Kami, K.; Koizumi, M.; Toyoda, E.; Kawaguchi, Y.; Doi, R. *Int. J. Cancer*, **2006**, *118*, 2337.
- [74] Merimski, O. *Int. J. Mol. Med.*, **2004**, *14*, 931.
- [75] Adjei, A.A. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*, 4446s.
- [76] Birle, D.C.; Hedley, D.W. *Mol. Cancer Ther.*, **2006**, *5*, 2494.
- [77] Reardon, D.A.; Quinn, J.A.; Vredenburgh, J.J.; Gururangan, S.; Friedman, A.H.; Desjardins, A.; Sathornsumetee, S.; Herndon, J.E. 2nd; Dowell, J.M.; McLendon, R.E.; Provenzale, J.M.; Sampson, J.H.; Smith, R.P.; Swaisland, A.J.; Ochs, J.S.; Lyons, P.; Tourt-Uhlig, S.; Bigner, D.D.; Friedman, H.S.; Rich, J.N. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*, 860.
- [78] Kurmasheva, R.T.; Huang, S.; Houghton, P.J. *Br. J. Cancer*, **2006**, *95*, 955.
- [79] Kneissel, M.; Luong-Nguyen, N.H.; Baptist, M.; Cortesi, R.; Zumstein-Mecker, S.; Kossida, S.; O'Reilly, T.; Lane, H.; Susa, M. *Bone*, **2004**, *35*, 1144.
- [80] Krock, D.; Perka, C.; Tuischer, J.; Funk, J.; Tohtz, S.; Buttgerit, F.; Matziolis, G. *Transpl. Int.*, **2006**, *19*, 563.
- [81] Sugatani, T.; Hruska, K.A. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 3583.
- [82] Kaihara, S.; Bessho, K.; Okubo, Y.; Sonobe, J.; Kusumoto, K.; Ogawa, Y.; Iizuka, T. *Life Sci.*, **2002**, *72*, 247.
- [83] Pacey, S.; Rea, D.; Steven, N.; Brock, C.; Knowlton, N.; Shand, N.; Hazell, K.; Zoellner, U.; O'Donnell, A.; Judson I. *J. Clin. Oncol.*, **2004**, *16S*, 3007.
- [84] Avellino, R.; Romano, S.; Parasole, R.; Bisogni, R.; Lamberti, A.; Poggi, V.; Venuta, S.; Romano, M.F. *Blood*, **2005**, *106*, 1400.

NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES DES OSTEOSARCOMES PAR DES STRATEGIES COMBINATOIRES CIBLEES.

Mots clés : Ostéosarcome, thérapie, évérolimus, acide zolédronique, apomine et lovastatine.

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes. Malgré les progrès réalisés en chirurgie et en chimiothérapie, le problème de la non réponse à la chimiothérapie est un problème persistant et met en jeu le pronostic vital impliquant la recherche de nouvelles stratégies thérapeutique. Afin d'améliorer la survie des patients et contrôler la progression tumorale, de nouvelles stratégies combinatoires ciblées sont développées dans le but de diminuer l'émergence de phénomène de résistance et de potentialiser l'efficacité du traitement. Les stratégies thérapeutiques envisagées ont consisté à cibler simultanément plusieurs voies de signalisation dans les cellules d'ostéosarcome (thérapies combinatoires ciblées horizontales) ou à cibler une voie majeure de la cellule par deux molécules différentes ayant des modes d'action différents. Ces combinaisons ont induit une diminution significative de la viabilité des cellules d'ostéosarcome et ont permis une diminution du volume et de la progression tumorale dans des modèles murins d'ostéosarcome. Enfin, ces traitements ont également permis une amélioration des paramètres de la microarchitecture osseuse au contact de la tumeur et une réparation tissulaire observée dans la masse résiduelle tumorale. Les thérapies ciblées permettront une alternative aux protocoles actuels et ouvrent la porte à une nouvelle ère dans la recherche de nouveaux agents thérapeutiques dans le traitement des ostéosarcomes.

NEWS THERAPEUTIC APPROACHES OF OSTEOSARCOMA BY TARGETED COMBINATORY STRATEGIES

Keywords: Osteosarcoma, therapy, everolimus, zoledronic acid, apomine and lovastatin.

Osteosarcoma is the most common primary malignant bone tumors. Despite advances in surgery and chemotherapy, the problem of non-response to chemotherapy is a persistent problem and involves life-threatening leading to look for new therapeutic strategies. New targeted combinatory strategies are developed to reduce the emergence of resistance, to potentiate the effectiveness of treatment and then to improve patient survival and tumor growth control. The therapeutic strategies envisaged have been to target multiple signaling pathways in tumor cells (horizontal targeted combinatory therapies) or to target a major target of the cell by two different molecules characterized by different modes of action. These combinations induced a significant decrease in cell viability of osteosarcoma and allowed a decrease of volume and tumor progression in mice models of osteosarcoma. Finally, these treatments have also resulted in improved parameters of bone microarchitecture in contact with the tumor and tissue repair observed in the residual tumor mass. Targeted therapies will allow an alternative to existing protocols and open the door to a new era in development of new therapeutic approaches of osteosarcoma.