

Thèse de Doctorat

Audrey LAMORA

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

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*

Spécialité : *Biologie des organismes*

Unité de recherche : *INSERM UMR957 LPRO*

Soutenue le *22 juin 2015*

Thèse N° :

Evaluation du potentiel anti-tumoral des inhibiteurs de la voie de signalisation du TGF- β dans l'ostéosarcome

JURY

Rapporteurs :	Nathalie THERET , Directrice de Recherche, INSERM U1085 - IRSET Daniel BOUVARD , Chargé de Recherche, INSERM - Institut Albert Bonniot
Examineurs :	Natacha ENTZ-WERLE , Professeur Universitaire - Praticien Hospitalier, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg Alain MAUVIEL , Directeur de Recherche, INSERM - Institut Curie
Directeur de Thèse :	Franck VERRECCHIA , Directeur de Recherche, INSERM UMR957 LPRO
Co-directeur de Thèse :	Françoise REDINI , Directrice de Recherche, INSERM UMR957 LPRO



Instituts
thématiques

Inserm
Institut National
de la santé et de la recherche médicale



UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE ET PHARMACIE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

EVALUATION DU POTENTIEL ANTI-TUMORAL DES INHIBITEURS DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU TGF- β DANS L'OSTEOSARCOMME

THESE DE DOCTORAT
Biologie – Médecine – Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Audrey LAMORA

Le 22 Juin 2015

Jury

Rapporteurs

Dr. Nathalie THERET
Dr. Daniel BOUVARD

Examineurs

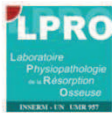
Pr. Natacha ENTZ-WERLE
Dr. Alain MAUVIEL

Directeurs de Thèse

Dr. Françoise REDINI
Dr. Franck VERRECCHIA

Remerciements

Remerciements



Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale



Ce travail a été réalisé au sein du **Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapies des Tumeurs Osseuses Primitives INSERM UMR957** sous la direction des docteurs **Franck VERRECCHIA** et **Françoise REDINI** et grâce au soutien financier de **la Ligue contre le Cancer**.

Je tiens à remercier particulièrement :

Mes directeurs de thèse **Franck VERRECCHIA** et **Françoise REDINI**. Merci d'avoir donné à la petite étudiante en pharmacie que j'étais l'opportunité de travailler sur ce sujet qui me tient particulièrement à cœur. Merci de m'avoir lancée sur ce projet passionnant et de m'avoir fait confiance tout au long de sa progression. Je vous remercie pour la qualité de votre encadrement, pour avoir su m'expliquer et me guider tout en me laissant beaucoup de libertés et d'autonomie. Merci de m'avoir inculqué votre passion pour la recherche et de m'avoir accompagnée dans tous les bons moments (et les difficultés également) qu'elle peut nous apporter. Merci pour votre grande motivation, votre disponibilité et votre soutien qui m'ont énormément encouragée tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir permis de présenter ces travaux dans de nombreux congrès et de m'avoir enseigné les joies de la rédaction d'articles (et de sa publication !). Je n'aurais pas pu espérer avoir de meilleurs directeurs de thèse et je suis très heureuse de poursuivre ce projet par la suite avec vous. Merci à **Françoise** pour ses précieux conseils rédactionnels et pour les manip vivo. Un grand merci à toi **Franck** pour m'avoir formée, aidée et soutenue au cours de ce travail de longue haleine, pour tes conseils scientifiques indispensables et aussi pour ton humour qui a égayé nos manip et réunions. Un énorme merci à vous deux pour vos grandes qualités scientifiques mais aussi humaines que j'ai pu apprécier à maintes reprises.

Dominique HEYMANN pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour les discussions intéressantes autour de ce projet et pour son soutien qui m'a permis de participer à des congrès et d'effectuer cette thèse dans des conditions idéales.

Nathalie THERET et **Daniel BOUVARD** qui me font un grand honneur en acceptant d'être rapporteurs de ces travaux de thèse.

Natacha ENTZ-WERLE pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Alain MAUVIEL pour avoir accepté de juger ces travaux de thèse mais également pour les discussions constructives que nous avons pu avoir avec **Agnès AUBRY** lors de mes comités de thèse.

La Ligue contre le Cancer qui a permis de financer cette thèse ainsi que tous **les donateurs** sans qui ces travaux n'auraient pas été possibles.

Arnaud TESSIER, Nicolas PELLETIER et **Jacques LEBRETON** de l'UMR6230 CEISAM pour la synthèse du SD-208.

Je tiens à remercier tous les membres (actuels ou des années précédentes) du laboratoire pour leur gentillesse, leur soutien, leur aide précieuse, leur bonne humeur et leur humour qui ont fait de ces années de thèse des moments mémorables : **Anne-Laure** (une fille super, reine des complexes... et des roulés au chorizo pour notre plus grand bonheur !), **Annie**, l'extraordinaire **Aude** (merci encore pour ta gentillesse, ta sincérité, ton humour et tous ces bons moments passés en congrès ici ou ailleurs. Merci à ma coach au grand cœur. Dans l'impatience de te revoir sur la côte ouest, plein de bonheur et de réussite pour la suite...mais attention aux poteaux ☺), **Audrey R** (pour nous avoir souvent fourni en MSC), **Béné** (et ses supers idées en matière d'organisation. Merci pour les virus et les figures WNT), **Bénédicte**, **Benjam** (ou Tigrou le génie de l'informatique), **Benjamin** (le pro des miRNA), **Benoit**, **Bérengère** (la reine du Western Blot qui chante *le coq est mort mieux que personne*), **Camille** (vive l'analyse d'images histo du soir en musique et nos conversations dans le bureau), **Cyril** (son bon goût pour le vin et la guitare et sa présence au MEB), **David**, l'incroyable **Eric** (alias MacGyver. A nos discussions treks), **François** (qui a survécu malgré le fait de prendre l'avion 2 fois avec moi ! Merci pour tes précieux conseils et ton humour qui nous a accompagnés au quotidien à Prague), le **Professeur François GOUIN** (pour m'avoir permis d'assister aux RCP sarcomes), **Fred B** (pour tes questions pertinentes, ton implication, les soirées en congrès et pour nous avoir supportées dans le bureau Camille-Marta-Audrey et cédé les chauffages d'appoint), **Fred L** (Monsieur Dlx), **Gaëlle**, **Guillaume**, **Guylaine** (pour tout ton travail à l'animalerie et nos discussions à côté de la salle nude), **Jimmy** (à nos discussions sciences et médecine), **Julie C** (notre princesse qui m'a beaucoup aidée), **Julien T** (et sa bombassitude), **Kévin** (à ton aide précieuse notamment sur ImageJ. Merci d'avoir partagé la galère de la quantification en histo. Merci pour les sessions David Guetta en 122. « Et encore félicitations ! »), **Laetitia** (bon courage pour ta thèse !), **Laurent** (le roi du bricolage), **Lidia** (ou comment nous évitâmes de nous faire tuer par un voisin armé de son fusil ! A tes supers

encouragements depuis l'Espagne), **Luis** (et sa grande famille), **Malika**, **Manue**, **Marco** (le meilleur des pharmaciens-chercheurs qui défend nos couleurs!), **Marguerite**, **Marie-Astrid** (pour sa gentillesse et ses gâteaux succulents. Tes discussions d'IL-36/38 avec **Fred** et **Benoit** dans le bureau vont finir par me manquer!), **Marta** (pour avoir fait de notre bureau un véritable sauna. Bon courage pour la suite!), **Martine** (Super-héroïne de la qPCR. Profite bien de ta retraite amplement méritée), **Mathias** (et ses blagues censurées), **Meadhbh**, **Nathalie**, **Pierre G**, **Pierre L**, **Sandrine**, **Séverine** (et ses conseils avisés en matière de microscanner), **Steven** (Le plus sympa des briérons nous ayant fait entrer dans cette zone de non-droit sans encombre. Merci de m'avoir fait l'immense honneur de reprendre ma figure du TGF- β dans ta thèse, j'essaierai d'être à la hauteur du grand Monsieur Georges le jour J), **Thibault** (et ses réponses à mes questions existentielles en matière de rédaction), **Thierry** (le tueur de brebis à l'humour débordant), **Valérie** (Merci pour tes nombreux conseils. A nos longues discussions, en espérant avoir pu apporter l'aide nécessaire). Merci également à **Greig** (le nouveau spécialiste des stéréotypies de la souris) et **Mick**. Sans oublier de remercier les souris qui m'ont accompagnée au quotidien malgré elles mais sans qui ce travail n'aurait été possible.

La « team de choc TGF- β ». Merci à ma « grande sœur Verrecchia » **Julie T** pour m'avoir encadrée et pris sous son aile dès mon arrivée. A toutes mes premières manipulations au sein de ce laboratoire que j'ai eu la chance de faire avec toi et toujours dans la bonne humeur (spéciale dédicace à ton rire qui résonne encore dans les couloirs du labo)! Merci pour ta disponibilité qui a perduré même après ton départ en post-doc. Un grand merci pour tes précieux conseils en tant que docteur aguerrie. A tous ces bons moments passés en ta compagnie. Je te souhaite plein de belles choses pour la suite, en espérant que nous pourrions bientôt retravailler ensemble ! Merci à **Mathilde** qui assure merveilleusement bien la relève. Merci pour ton investissement dans les manipulations (à toute heure du jour et de la nuit notamment lors de nos temps de traitements foireux 😊) et en dehors (vive la collecte de bouchons en liège). Merci pour ta bonne humeur et tes encouragements. Je suis très heureuse de continuer à travailler avec toi et impatiente de voir l'avancée de nos nouveaux projets. Fais-toi confiance Mathilde, tu t'en sors très bien ! Merci à **Gwenola** pour son aide. Merci aux stagiaires de tous niveaux qui ont pu travailler sur ce projet et bonne chance pour la suite à **Sarah** qui vient juste de débiter. Merci encore à **Franck** pour avoir orchestré ce petit monde. Il faudrait néanmoins songer à recruter un géant de manière à ce que je me débarrasse une bonne fois pour toute du rôle d'Averell quand nous marchons en rang dans le couloir 😊.

La « team histo » pour leur précieuse aide. Merci **Jérôme** pour ton investissement dans ce projet et ta motivation communicative. Je croise les doigts pour nos résultats à venir dans un futur très proche et vivement nos prochaines interventions en lycée. Merci à **Céline** (et nos « sessions TRAP »), **Rachel** et **Florian** (pour votre aide +++). Un grand merci également à **Marie-Françoise** pour nous avoir fourni des lames de patients qui nous sont très précieuses !

Mes compagnons de thèse très bientôt diplômés. Merci à **Romain** et **Pierre**, fournisseurs officiels de cellules (vive les HOS 1547 !). Merci pour votre dévouement pour le collectif et votre humour qui ont contribué à la bonne ambiance du laboratoire. Parce que le désormais légendaire « Bienvenue à l'épreuve... d'immunité » résonnera encore longtemps dans ma tête (Denis Brogniart, sors de ce corps !), c'est avec le sourire que je repense à toutes vos grandes qualités (notamment d'acteur-studio et de monteur). Un grand merci pour les « instants-culture générale » que vous nous avez fait partager. A nos très bonnes soirées (mais n'oubliez pas que l'abus de Chouffe est dangereux pour la santé ☺). Bonne chance pour vos thèses respectives (la fin n'a jamais été aussi proche). Ce fut un plaisir de partager ces années avec vous alors bonne continuation ! Je n'oublie bien évidemment pas **Olivier** alias grand chbeb, le seul breton 100% pur beurre ayant une définition bien à lui de la Bretagne sans en connaître ses célèbres galettes. Merci d'avoir osé adresser la parole à la « banlieusarde » que j'étais et mis les pieds dans le Morbihan (le repère des parisiens d'ailleurs). A ta capacité à me supporter, au « poum-poum short » et aux « godets ». Je ne sais pas si tu digèreras un jour le fait que Nabila t'ait volé ton fameux « allo allo » mais à défaut d'un avenir parmi les shampooings, je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse au pays des « chico***** » comme tu le répètes. « Terminé bonsoir ».

Un grand merci aux meilleurs ortho tourangeaux pour leur gentillesse et leur humour. Merci **Louis-Romée** pour ton aide, tes conseils, ton écoute et nos discussions en tous genres lors de nos déjeuners et en dehors. A **Julien**, entre autre pour m'avoir sauvé un pied dans l'histoire. Je vous souhaite à tous les deux plein de belles choses pour la suite aussi bien professionnelles que personnelles et bon courage pour vos (deuxièmes !) thèses respectives.

Un ENOORME merci à **Régis** ! Comment faire original pour l'homme ayant fait couler le plus d'encre dans les remerciements de thèse ? Il n'y a pas de mots assez justes (même l'emploi de superlatifs serait insuffisant) pour résumer ces merveilleuses années d'amitié. Merci pour tout le temps passé à mes côtés (ou au téléphone !), merci pour ta capacité d'écoute (surdimensionnée), merci de m'avoir toujours accompagnée et soutenue dans les bons

moments comme dans les (très) mauvais. *La petite parisienne embrassant la Tour Eiffel* n'aurait pu espérer trouver mieux en arrivant en pays nantais. Saches que tu as su faire disparaître de mon visage *ce regard nostalgique à la Ratatouille* (et c'était loin d'être gagné !). C'est désormais bel et bien ici que nous poursuivrons nos incroyables aventures (pour ton plus grand désespoir ?). Alors à nos multiples soirées (au resto ou en appart, repas vin-fromage ou apéro-dinette, sérieuses ou délirantes, en tête à tête ou à plusieurs), à nos discussions (scientifiques...ou pas !), à tes conseils (pour les manips et personnels), à nos délires, à nos secrets, à ton anniversaire et ta boum (no comment ☺), à la *cuvée Louise*, au pied écrasé, à nos deux séjours au bureau des plaintes du commissariat (« Epelez-le SVP ! » « Un paquet de S-C-H-T-R-O-U-M-P-F, un paquet de... »), à tes « origines douteuses », à ton sale caractère (si si ça arrive), à ton humour (et au comique de répétition), à ton dévouement (professionnel et pour ceux que tu aimes) et surtout à ton grand cœur. Merci de m'avoir supportée (dans tous les sens du terme... et une baleine ça pèse son poids !!). Je ne te remercierai jamais assez alors à tous nos souvenirs, tous ces moments (passés et futurs) et *toutes ces choses qu'on ne s'est pas dites*. P.S. : *Il vaut peut être mieux déboucher le champagne à la main qu'avec le tire-bouchon anti-pop si l'on veut avoir un jour (le 22 juin ?) une chance de trinquer ☺*

Je remercie également particulièrement :

Madame Busnel, la première à m'avoir inculqué les joies des Sciences et à avoir essayé de me donner confiance en moi. *Je sais désormais que j'ai fait le bon choix*. Le **Professeur Jean-Louis LAPLANCHE** pour son aide dans la constitution de mon dossier pour le concours de l'Ecole de l'INSERM, **Madame le Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris V Martine AIACH** et **Madame le Doyen de la Faculté de Médecine de Nantes Pascale JOLLIET** pour leur soutien et leur confiance. Merci à **L'Ecole de l'INSERM** au grand complet sans qui je n'aurais jamais pu réaliser ce double-cursus. Merci au comité pédagogique, **Messieurs CHOTTARD, ASCHER, AMBLARD** et **TALABARD**, de m'avoir sélectionnée et ainsi permis de vivre cette magnifique expérience humaine, scientifique, pharmaceutique et médicale. Merci pour vos conseils, votre soutien et votre dévouement pour les doubles-cursus. Je garde en mémoire votre maxime : « Il faut repousser les frontières de la connaissance pour vaincre celles de la maladie ». Merci à **Barro** pour sa disponibilité et ses grandes qualités d'organisation, c'est toujours un plaisir d'échanger avec vous. Merci à **tous les étudiants des doubles-cursus Médecine et Pharmacie-Sciences** et bon courage dans ce parcours du combattant. Un grand merci à la fine équipe (**Promo 2009 et 2010**). Les années passent et c'est à chaque fois un plaisir de vous retrouver. A tous ces super souvenirs ! Merci **Valentine, Pierre-Guillaume,**

Arthur, Nico, Simon, Romain... et tous les autres. Mention spéciale à **Sophie** qui m'a pris sous son aile et toujours bien conseillée (dans tous les domaines), **Julia** et **Daphnée** mes deux copines de promo (A nos soirées Pharma ou Master-Sushis. Plein de belles choses pour la suite, je ne vous oublie pas ☺), **Marc** l'interne le plus impressionnant (Un grand merci pour ton soutien et tes encouragements qui m'ont beaucoup aidée ainsi que tes conseils en matière d'avenir ☺ et vive l'AMPS « Mister President »), et enfin ma petite **Julie** (merci pour tout !!!).

Merci à **Julie PLASTINO** et toute l'équipe de l'Institut Curie qui m'ont formée à mes débuts.

Une petite pensée pour ma belle et gentille jument **Olga** sur le dos de laquelle j'ai pu oublier les petits soucis du quotidien. Merci à **Laure** et ses parents pour les bons soins prodigués et leur dynamisme qui fait du bien.

Un grand merci à mes amis **Thibault, Pablo** et **Ludmilla**. En souvenir de tous nos bons moments (et de *Crep'Suzette*), merci pour votre grand cœur et votre soutien. Merci d'avoir essayé de comprendre ce « cursus étrange ». *Promis, désormais j'arrête de faire compliqué!* Bonne continuation dans vos vies personnelles et professionnelles respectives et à très vite pour fêter toutes ces bonnes nouvelles !

Aux deux meilleures, extraordinaires, fantastiques, fabuleuses et géniallissimes amies que j'ai la chance d'avoir **Elsa** et **Marie** (merci à vos moitiés **Axel** et **Pierre** également !). Merci d'être présentes à chaque instant, dans les bons moments comme dans les mauvais. Merci pour votre soutien et vos encouragements dans tous les domaines de ma vie. Merci d'exercer sur moi cet incroyable pouvoir qui me rebooste et me remonte le moral. Je n'aurais pu rêver d'amies plus formidables que vous alors encore une fois **MERCI POUR TOUT !**

Un énorme merci général à toute ma famille au sens large, aux « copains d'armée », à la famille de Pierre-Antoine et nos amis d'ici et d'ailleurs pour m'avoir accompagnée au cours de ce long chemin. Vous êtes indispensables à mon équilibre et mon bonheur. A **Mélodie, Marie-Claude** et **Jean-Pierre** qui m'ont toujours soutenue, particulièrement pendant cette thèse. *Votre force fait ma motivation.*

Merci aux plus géniaux des grands-parents **René, Lucette** et **Colette**. A vous qui avez suivi avec la plus grande assiduité mon cheminement aussi bien depuis toute petite que durant cette thèse. Vous êtes une de mes plus grandes sources de motivation alors mille merci pour vos encouragements, votre soutien sans faille et votre amour débordant. Merci également à la merveilleuse petite sœur que tu es **Sophie**. A tout ce que tu as toujours fait pour moi, à

tous ces souvenirs et à ce lien unique qui nous unit. Merci de m'avoir toujours encouragée, merci de m'avoir toujours relevée, merci d'être toi tout simplement... Bon courage pour l'ECN qui t'attend l'année prochaine. Aies confiance, tu seras une super médecin j'en suis certaine ! Merci, merci, merci à mes parents **Dominique** et **Hervé** pour tout ce qu'ils ont fait pour moi durant toutes ces années et pour leur présence au quotidien. Merci d'avoir été les parents exemplaires dont tout le monde rêverait. Je n'ai pas toujours été facile (même plutôt souvent compliquée) alors merci de m'avoir supportée. Merci pour tout ce que vous avez pu m'enseigner (à commencer très certainement par le goût des études), pour votre aide et vos précieux conseils. Merci de m'avoir guidée tout en me laissant toujours libre dans mes choix. Merci de m'avoir toujours épaulée. Vos encouragements et tout votre amour m'ont toujours poussée à me dépasser de manière à ne jamais rien regretter. Alors aujourd'hui plus que jamais MERCI car vous êtes en grande partie responsables de mon bonheur et de mes petites victoires. Je vous aime.

Enfin, LE moment tant attendu qui termine ces remerciements et marque la fin de ma rédaction de thèse. Une page va bientôt se tourner et c'est avec beaucoup d'émotion que j'écris donc ces dernières lignes. Parce que j'en ai rêvé pendant ces 1000 jours durant lesquels nous avons supporté la distance. Parce que la vie sans toi c'était comme *un trek au Kirghizstan sans loup* ou comme *une expédition en Islande sans volcan*. Parce que les 550 heures de train ou 79200 km parcourus n'auront pas eu raison de nous. Parce que nous avons surmonté toutes les difficultés et qu'elles nous ont rendus plus forts. Parce que malgré la complexité de la préparation de ton concours et la fatigue tu as continué à être à l'écoute, m'encourager, me soutenir, me rassurer et croire en moi. Parce que nous avons vécu des moments extraordinairement forts, des instants magiques et des minutes hors du temps. Parce que chaque seconde passée à tes côtés n'est que bonheur. Parce que le compte à rebours que j'ai tant scruté va bientôt sonner et que désormais nous sommes enfin *réunis pour l'éternité*. Parce que tout simplement « nous l'avons fait ». Alors à notre tant attendue libération, à nous, à notre amour démesuré, à nos voyages et aventures passés et à venir, à nos projets...

A toi **Pierre-Antoine**.

M.O.A

À Damien

Sommaire

LISTE DES FIGURES.....	1
LISTE DES TABLEAUX.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
AVANT-PROPOS	5

INTRODUCTION GENERALE

I. LE TISSU OSSEUX	7
1. STRUCTURE MACROSCOPIQUE	8
1.1. <i>Le périoste</i>	9
1.2. <i>L'os cortical</i>	9
1.3. <i>L'os trabéculaire</i>	10
2. STRUCTURE MICROSCOPIQUE	11
2.1. <i>Classifications « des tissus osseux »</i>	11
2.2. <i>La matrice extracellulaire</i>	12
a. La phase organique	12
b. La phase minérale	16
2.3. <i>Les cellules osseuses</i>	17
a. Les cellules souches mésenchymateuses	17
b. Les ostéoblastes	20
c. Les cellules bordantes	21
d. Les ostéocytes.....	22
e. Les ostéoclastes.....	23
3. CROISSANCE ET REMODELAGE OSSEUX	26
3.1. <i>La croissance osseuse</i>	26
a. L'ossification endochondrale.....	26
b. Autres types d'ossification	27
3.2. <i>Le remodelage osseux</i>	27
a. Rôle des ostéocytes	28
b. Système RANK/RANKL/OPG	28
c. Etapes du remodelage osseux	30
II. OSTEOSARCOMES	32
1. ORIGINE	34
2. DEFINITION	34
3. EPIDEMIOLOGIE, ETIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE.....	36
3.1. <i>Croissance et ostéosarcome</i>	37
3.2. <i>Pathologies prédisposant à l'ostéosarcome</i>	37

3.3 Anomalies cytogénétiques fréquentes.....	37
4. CLINIQUE	38
5. BILAN PARA-CLINIQUE	38
5.1. Diagnostic positif.....	38
5.2. Diagnostic différentiel	41
a. Radiologique.....	41
b. Anatomopathologique	42
5.3. Bilan d'extension	42
a. Local	42
b. A distance.....	43
6. PRISE EN CHARGE	43
6.1. Traitement actuel.....	43
6.2. Traitements en développement.....	44
a. Ciblage du microenvironnement	45
b. Ciblage de la voie de signalisation Hedgehog, Notch et WNT	46
c. Ciblage des récepteurs à activité tyrosine kinase	47
d. Ciblage des molécules de signalisation intracellulaire	48
e. Immunothérapies.....	48
7. SUIVI ET PRONOSTIC	51
7.1. Surveillance et tolérance	51
7.2. Pronostic.....	52
8. IMPORTANCE DE LA NICHE OSSEUSE DANS L'OSTEOSARCOME	52
8.1. Théorie du « seed and soil » de Paget (1889).....	52
8.2. Concept de niche.....	53
8.3. Application à l'ostéosarcome	53
a. Un environnement propice à la croissance tumorale.....	53
b. Cas particulier des cellules souches cancéreuses (CSC)	56
c. Cercle vicieux entre prolifération tumorale et ostéolyse	57
III. TGF-B	59
1. PRESENTATION.....	59
2. ACTIVATION	60
3. VOIES DE SIGNALISATION.....	62
3.1. Voie de signalisation par les Smads	62
3.2. Voies de signalisation non canoniques.....	67
a. Signalisation par le récepteur de type II	68
b. Voie de signalisation Erk-MAPK.....	68
c. Voie JNK/p38-MAPK	69
d. Voie PI3K/Akt	69

e.	Petites GTPases et TGF- β	70
f.	Voie des intégrines.....	71
g.	Protéines Smad et microARN	71
4.	ROLES PHYSIOLOGIQUES DU TGF-B ET PATHOLOGIES ASSOCIEES	72
4.1.	<i>Cas particulier du TGF-β et de l'os</i>	72
a.	Effets de TGF- β sur l'ostéoblastogenèse et l'ostéoformation	73
b.	Effets de TGF- β sur l'ostéoclastogenèse et l'ostéorésorption.....	73
5.	TGF-B ET CANCER.....	74
5.1.	<i>Généralités</i>	74
5.2.	<i>Rôle tumeur-suppresseur du TGF-β</i>	75
5.3.	<i>Rôle pro-tumoral du TGF-β</i>	76
a.	Rôle de TGF- β dans la transition épithélio-mésenchymateuse	77
b.	TGF- β et processus métastatique.....	78
c.	TGF- β et angiogenèse	81
d.	TGF- β et échappement au système immunitaire	82
5.4.	<i>TGF-β et ostéosarcomes</i>	83
5.5.	<i>Approches thérapeutiques anticancéreuses inhibant le TGF-β</i>	84
a.	Ciblage du ligand	84
b.	Ciblage de l'interaction ligand-récepteur.....	85
c.	Ciblage de la transduction du signal	86
IV.	OBJECTIFS DE LA THESE	88

RESULTATS

PARTIE I : INTERETS DU CIBLAGE DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU TGF-B DANS L'OSTEOSARCOME

I.	COMPLEMENT D'INTRODUCTION ET RATIONNEL DE L'ETUDE	90
1.	SMAD7 : SMAD-INHIBITEUR	90
1.1.	<i>Régulation de la voie de signalisation du TGF-β par Smad7</i>	90
1.2.	<i>Intérêt du ciblage de Smad7 en cancérologie</i>	91
2.	LE SD-208, INHIBITEUR CHIMIQUE DE TBRI	93
2.1.	<i>Notions chimiques et mécanisme d'action du SD-208</i>	93
2.2.	<i>SD-208 et cancérologie</i>	93
II.	ARTICLE 1 : CLINICAL CANCER RESEARCH (PUBLIE)	95
III.	CONCLUSION PARTIELLE ET PERSPECTIVE	112

PARTIE II : EVALUATION DU POTENTIEL ANTI-TUMORAL DE L'HALOFUGINONE DANS L'OSTEOSARCOME

I.	COMPLEMENT D'INTRODUCTION ET RATIONNEL DE L'ETUDE	113
1.	DECOUVERTE DE L'HALOFUGINONE	113
2.	HALOFUGINONE ET CANCERS.....	114
3.	HALOFUGINONE ET APOPTOSE.....	115
4.	HALOFUGINONE ET ESSAIS CLINIQUES	115
II.	ARTICLE 2 : ONCOTARGET (ACCEPTÉ POUR PUBLICATION)	117
III.	CONCLUSION PARTIELLE.....	138

DISCUSSION GENERALE

I.	LE TGF-B, FACTEUR PRONOSTIC DANS L'OSTEOSARCOME ?	139
II.	EFFETS DIRECTS ET/OU INDIRECTS DE L'INHIBITION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU TGF-B SUR LA CROISSANCE TUMORALE DES OSTEOSARCOMES.....	143
1.	PROLIFERATION ET APOPTOSE	143
2.	MICROENVIRONNEMENT TUMORAL ET REMODELAGE OSSEUX.....	148
2.1.	<i>Effets sur l'ostéolyse.....</i>	<i>149</i>
2.2.	<i>Effets sur l'ostéof ormation.....</i>	<i>152</i>
III.	EFFETS DE L'INHIBITION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU TGF-B SUR LE PROCESSUS METASTATIQUE DANS L'OSTEOSARCOME.....	157
IV.	PERSPECTIVES	163

<u>CONCLUSION GENERALE.....</u>	165
--	------------

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	167
-----------------------------------	------------

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation structurale d'un os long 8

Figure 2 : Jonction entre l'os trabéculaire et l'os cortical..... 9

Figure 3 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuses 17

Figure 4 : La différenciation ostéoblastique 19

Figure 5 : Voies de signalisation WNT 19

Figure 6 : Effets de la voie WNT- β -caténine sur les cellules osseuses 20

Figure 7 : Ostéoblastes tapissant la trame osseuse au microscope électronique à balayage 20

Figure 8 : Observation d'un ostéocyte en microscopie électronique à balayage 22

Figure 9 : Vue d'un ostéoclaste résorbant la matrice osseuse au microscope électronique à balayage 24

Figure 10 : La différenciation ostéoclastique 24

Figure 11 : Schéma d'un ostéoclaste actif 26

Figure 12 : Triade RANK/RANKL/OPG 29

Figure 13 : Les différentes étapes du remodelage osseux 30

Figure 14 : Localisations préférentielles de l'ostéosarcome 35

Figure 15 : Les différentes étapes du diagnostic et de la prise en charge de l'ostéosarcome 39

Figure 16 : Aspects radiologiques des différentes lésions osseuses associées à l'ostéosarcome 40

Figure 17 : Aspect histologique d'un ostéosarcome 41

Figure 18 : Ciblage de certaines voies de signalisation dans l'ostéosarcome 45

Figure 19 : Voie de signalisation Hedgehog/Gli 47

Figure 20 : Rôle de l'hypoxie dans le développement tumoral 54

Figure 21 : Cercle vicieux entre prolifération tumorale et ostéolyse 57

Figure 22 : Représentation schématique de la superfamille du TGF- β 59

Figure 23 : Premières étapes de l'activation du TGF- β 60

Figure 24 : Le TGF- β latent 61

Figure 25 : Voie de signalisation canonique du TGF- β par les Smads 62

Figure 26 : Relations schématiques entre les ligands de la famille du TGF- β et les acteurs régulant l'accès à leurs récepteurs chez les vertébrés 63

Figure 27 : Structure des Smads 65

Figure 28 : Voies de signalisation canonique et non canoniques du TGF- β 67

Figure 29 : Voie de signalisation non canonique Erk 69

Figure 30 : Voie de signalisation non canonique PI3K/Akt 70

Figure 31 : Voie non canonique des petites GTPases 71

Figure 32 : Rôle tumeur suppresseur du TGF- β par le contrôle de la progression du cycle cellulaire 75

Figure 33 : Rôles bivalents du TGF- β selon le stade du développement tumoral 76

Figure 34 : Régulation transcriptionnelle de l'EMT par le TGF- β 77

Figure 35 : Modèle de l'évolution de la niche métastatique 79

Figure 36 : Approches thérapeutiques anticancéreuses à l'essai inhibant le TGF- β 84

Figure 37 : Les Smad-inhibiteurs au carrefour des voies de signalisation	91
Figure 38 : Structures 2D et 3D du SD-208	93
Figure 39 : Structures chimiques de la fébrifugine et l'halofuginone.....	113
Figure 40 : Hypothèses justifiant l'augmentation de TGF- β dans les sérums de patients atteints d'ostéosarcome	141
Figure 41 : Action de Smad7, du SD-208 et de l'halofuginone sur les voies de signalisation du TGF- β	141
Figure 42 : Effets hypothétiques de la surexpression de Smad7 sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome	145
Figure 43 : Inhibition de l'expression et de la libération de facteurs ostéolytiques par les cellules d'ostéosarcome surexprimant Smad7	150
Figure 44 : Effets hypothétiques de la surexpression de Smad7 sur l'augmentation de l'ostéoformation.....	153
Figure 45 : Effets hypothétiques de la surexpression de Smad7 sur l'état de différenciation des cellules d'ostéosarcome et leur capacité à synthétiser une matrice ostéoïde	155
Figure 46 : Modèle hypothétique de l'implication du TGF- β dans la genèse de niches prémétastatiques dans l'ostéosarcome	162
Figure 47 : Rôle central du TGF- β dans le développement tumoral et métastatique de l'ostéosarcome	166

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classifications des tissus osseux	12
Tableau 2 : Protéines non collagéniques	15
Tableau 3 : Classification des tumeurs osseuses primitives	33
Tableau 4 : Principales variétés d'ostéosarcomes définies selon leur localisation et leur forme microscopique	35
Tableau 5 : Classification pronostique de Rosen et Huvos selon le degré de réponse à la chimiothérapie	44
Tableau 6 : Essais cliniques actuels et récemment terminés dans l'ostéosarcome.....	50
Tableau 7 : Récapitulatif des effets des 3 stratégies inhibant la voie de signalisation du TGF- β	142

LISTE DES ABREVIATIONS

AP-1 : Activator protein 1	IGFR : Insulin like growth factor receptor	PDGF : Platelet-derived growth factor
ADN : Acide désoxyribonucléique	IL : Interleukine	PDGFR : Récepteur au PDGF
ANGPTL4 : Angiopoietin-like 4	IRM : Imagerie par résonance magnétique	PTH : Parathormone
ARNm : Acides ribonucléiques messagers	I-Smad : Inhibitory Smad	PTHrP : Parathyroid hormone-related protein
BMP : Bone morphogenetic protein	LAP : Latency associated protein	RANK : Receptor activator of nuclear factor kappa B
BSP : Bone Sialoprotein	LLC : Large latent complex	RANKL : Receptor activator of nuclear factor Kappa B ligand
CDK : Cyclin-dependent kinase	LTBP : Latent-TGF- β binding protein	ROS : Espèces réactives de l'oxygène
Co-Smad : Co-mediator Smad	MAPK : Mitogen-activated protein kinase	R-Smad : Receptor-regulated Smad
CSC : Cellule souche cancéreuse	M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor	Runx2 : Runt related gene 2
CSM : Cellules souches mésenchymateuses	M-CSF R : Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor	SARA : Smad anchor for receptor activation
CTGF : Connective tissue growth factor	MDM2 : Mouse double minute 2 homolog	SBE : Smad binding element
CXCR4 : Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	MDSC : Cellules suppressives dérivées myéloïdes	SLC : Small latent complex
DKK1 : Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	MEC : Matrice extracellulaire	Smurf : Smad ubiquitination regulatory factor
Dlx 5 : Distal-less homeobox-5	MH : MAD homology	SOST : Sclérostine
DMP-1 : Dentin Matrix Protein 1	MicroARN : Micro acides ribonucléiques	TAK1 : TGF- β activated kinase 1
EGF : Epidermal growth factor	MMP : Matrix metalloproteinase	TβRI : TGF- β receptor I
EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse	Msx2 : Homeobox mshlike-2	TGF-β : Transforming growth factor beta
Erk : Extra-cellular regulated kinase	MTX : Méthotrexate	TNF : Tumor necrosis factor
FGF : Fibroblast growth factor	NF-κB : Nuclear-factor kappa B	TRAP : Tartrate resistant acide phosphatase
FGFR : Fibroblast growth factor receptor	OCN : Ostéocalcine	USP15 : Ubiquitin specific peptidase 15
HGF : Hepatocyte growth factor	OPG : Ostéoprotégérine	VEGF : Vascular endothelial growth factor
HIF1 : Hypoxia inducible factor 1	OPN : Ostéopontine	VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor
IFN : Interféron	PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1	ZO-1 : Zonula occludens 1
IGF : Insulin like growth factor	PAL : Phosphatase alcaline osseuse	

Avant-Propos

Dès la cinquième semaine du développement embryonnaire, les cellules mésenchymateuses se transforment pour établir le système squelettique qui comprend une partie cartilagineuse et une partie osseuse à laquelle nous allons plus particulièrement nous intéresser dans cette thèse. Le tissu osseux, structure dynamique en perpétuel remaniement, constitue le tissu de support de l'ostéosarcome. Nous nous intéresserons donc dans un premier temps à ses caractéristiques structurales de manière à mieux appréhender son architecture et porterons un intérêt particulier aux différences entre os cortical et trabéculaire pour mieux comprendre leurs atteintes dans le cadre de la pathologie. Une attention particulière sur le remodelage osseux, la formation de matrice ostéoïde et plus spécifiquement sur l'ostéolyse sera profitable pour la compréhension des mécanismes pathologiques mis en jeu.

Nous présenterons dans un second temps les ostéosarcomes, tumeurs très hétérogènes dont nous parlerons par abus de langage au singulier pour plus de facilité, décrivant ainsi la pathologie au sens large et dans ses formes les plus communes. La description des ostéosarcomes dressée dans ce manuscrit s'articulera selon l'enchaînement des étapes diagnostiques suivies par les cliniciens. Nous garderons à l'esprit que ces tumeurs sont rares, agressives et particulières de par leur origine mésenchymateuse et que certains procédés bien connus décrits en cancérologie générale ne leur sont pas ou que partiellement applicables.

Nous exposerons dans un troisième temps le TGF- β , facteur cible d'intérêt dans notre travail. Largement présent dans le tissu osseux, ses implications bivalentes et controversées dans divers processus physiologiques et pathologiques seront résumées. Nous prêterons particulièrement attention à sa voie de signalisation par les Smads, bien que ses implications dans de multiples cascades ne doivent pas être négligées mais semblent difficiles à couvrir de manière exhaustive. Nous garderons donc à l'esprit que les systèmes décrits sont en l'état actuel des connaissances et parfois simplifiés à des procédés restreints mais s'inscrivent dans des schémas plus larges et souvent individus-dépendant. Nous nous attarderons plus spécifiquement sur les rôles du TGF- β en tant qu'acteur principal du cercle vicieux établi dans les tumeurs osseuses. Nous verrons dans quelle mesure le processus ostéolytique prend toute son importance dans l'emballement de la pathologie. Cet environnement osseux aux caractéristiques si particulières constitue en effet un microenvironnement propice au développement tumoral. Enfin nous explorerons les effets

du TGF- β sur le développement et la dissémination métastatique. Nous accorderons une importance particulière à la théorie dite « de la graine et du sol » de Paget, vieille de plus de 100 ans et trouvant ici toute son illustration.

Les résultats seront présentés sous la forme d'articles publiés, en anglais. Un bref complément d'introduction de chacun de ces articles sera effectué pour les resituer plus spécifiquement dans le contexte actuel scientifique. Ces articles s'enchaîneront suivant le cheminement scientifique adopté durant cette thèse. Nous terminerons ce manuscrit par une discussion générale de l'ensemble des résultats et des perspectives dont ces derniers peuvent faire l'objet.

Introduction Générale

I. Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif caractérisé par la nature solide de sa matrice extracellulaire (MEC) et exerçant de nombreuses fonctions hautement spécialisées. Il est richement vascularisé et innervé et est caractérisé par son apparente rigidité, n'étant pas pour autant figé. C'est bien au contraire une structure dynamique en perpétuel remaniement. Capable de supporter des contraintes mécaniques, il sert de support structural pour le reste du corps, constituant ainsi une véritable « charpente » de l'organisme. Il en protège les organes vitaux et les structures internes et permet la locomotion puisqu'il représente le bras de levier de transmission des forces issues de la contraction musculaire au cours du mouvement. Sur le plan métabolique, renfermant 99% du calcium et 90% du phosphore de l'organisme, il est le principal réservoir des éléments minéraux, participe au maintien de l'homéostasie phosphocalcique et contribue à la régulation de la composition des fluides extracellulaires. Il sert également de réservoir de facteurs de croissance et cytokines. Enfin, il possède un rôle hématopoïétique au niveau des espaces médullaires où se situe la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse¹.

On définit classiquement trois groupes anatomiques d'os : les os longs, les os courts et les os plats. Les os longs (Figure 1) sont constitués d'une partie centrale cylindrique appelée diaphyse et de deux extrémités élargies et arrondies appelées épiphyses, couvertes de cartilage articulaire.

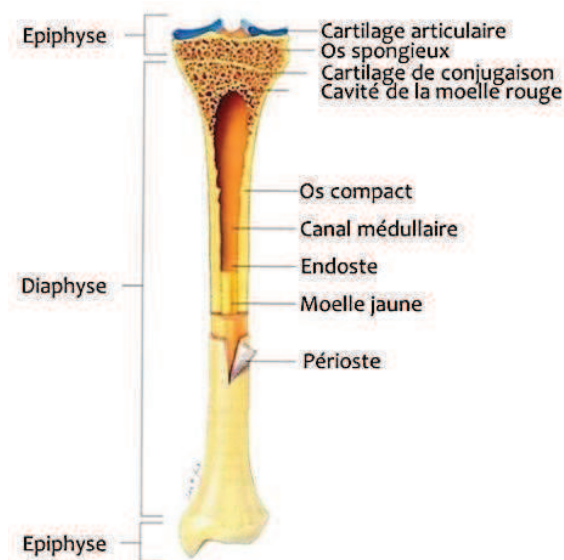


Figure 1 : Organisation structurale d'un os long

D'après le cours en ligne de Marie Claude RAOUX, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, 2011
(<http://slideplayer.fr/slide/507469/#>)

Des régions coniques appelées métaphyses, connectent la diaphyse à chaque épiphyse. Selon une coupe longitudinale, la diaphyse est constituée d'une paroi d'os compact et d'une partie médullaire constituée d'os spongieux (ou os trabéculaire) remplie de moelle osseuse. Au niveau des épiphyses, la partie médullaire est également occupée par de l'os spongieux et la couche d'os compact est plus mince qu'au niveau de la diaphyse. Chez un individu en croissance, l'épiphyse est séparée de la métaphyse par une couche intermédiaire de cartilage hyalin où les chondrocytes subissent d'intenses divisions. Il s'agit de la plaque de croissance ou cartilage de conjugaison. Cette dernière constitue, avec l'os spongieux adjacent à la métaphyse, une région de production d'os trabéculaire et d'allongement de la diaphyse. Chez l'adulte, la plaque de croissance est donc remplacée par de l'os spongieux, ce qui provoque la fusion de l'épiphyse et de la métaphyse. Cette disparition du cartilage suite à la fusion de deux masses de tissu spongieux est appelée soudure (ou fermeture) des plaques de croissance.

1. Structure macroscopique

La structure macroscopique de l'os permet de distinguer l'os cortical ou compact et l'os trabéculaire ou spongieux (Figure 2), l'ensemble étant entouré d'une enveloppe externe,

le périoste, à l'exception des cartilages articulaires et aux endroits d'insertion des tendons et ligaments.

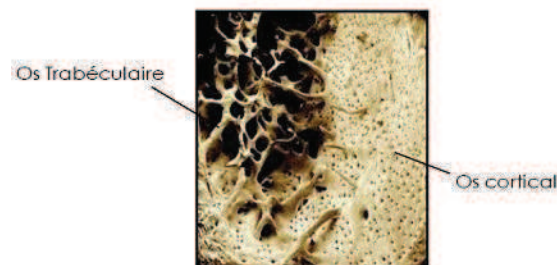


Figure 2 : Jonction entre l'os trabéculaire et l'os cortical

D'après: <http://www.visualsunlimited.com>

Le squelette adulte humain est composé de 80% d'os cortical et de 20% d'os trabéculaire, ce ratio variant selon le type anatomique d'os². La classification en os cortical et trabéculaire est basée sur le degré de porosité :

- 5 à 30% pour l'os cortical qui constitue surtout la « paroi » compacte de la diaphyse des os longs

- 30 à 90% pour l'os trabéculaire situé essentiellement au centre de la diaphyse et dans les régions métaphysaires des os longs, ainsi que dans les os courts et plats.

1.1. Le périoste

Le périoste est une membrane fibreuse conjonctivo-élastique constituée d'une couche externe fibreuse et d'une couche interne ostéogénique. Cette enveloppe externe richement vascularisée et innervée joue un rôle fondamental dans la croissance en longueur et circonférentielle des os. L'activité de la surface périostée est importante pour la croissance circonférentielle et la réparation de fracture. La formation osseuse y étant plus importante que la résorption osseuse, elle entraîne la croissance normale de l'os en diamètre avec le temps.

1.2. L'os cortical

L'os cortical, situé sous le périoste, constitue la paroi compacte de la diaphyse des os longs et celle des os plats et courts. Comme mentionné précédemment, il représente 80% de la masse osseuse totale. Le vieillissement d'un adulte en bonne santé s'accompagne d'une augmentation de la porosité de la corticale.

L'os cortical est recouvert par l'endoste sur sa partie interne et par le périoste sur sa partie externe. L'endoste est une couche conjonctive unicellulaire. Cette membrane vasculaire et ostéogénique assure la croissance et la réparation de l'os fracturé. Contrairement à la surface périostée, la résorption osseuse est plus importante que l'ostéoformation au niveau de la surface endostéale, conduisant à une augmentation du volume disponible pour la moelle osseuse avec l'âge.

1.3. L'os trabéculaire

L'os trabéculaire, appelé également os spongieux, siège essentiellement dans les os courts et plats ainsi que dans les épiphyses et métaphyses des os longs. Il constitue la partie la plus interne de la paroi osseuse et ne représente que 20% du squelette adulte. Friable, il est constitué d'un réseau de travées osseuses épaisses de 0,1 à 0,5 mm et de directions variées, délimitant de petites cavités. Ces lamelles ne présentent pas de formes distinctes mais l'orientation de chacune d'elles converge suivant des lignes de force dissipant une partie de la contrainte mécanique qui s'applique sur la pièce osseuse. La perte osseuse liée à l'âge affecte surtout l'os trabéculaire qui voit couramment une diminution d'environ 50% de sa densité. Cette perte osseuse se traduit par une diminution d'environ 70% de la résistance mécanique de l'os et indique la part majeure que semble jouer l'os trabéculaire dans la gestion de la contrainte mécanique³. **L'os trabéculaire semble donc être le premier affecté par la perte osseuse.** A titre d'exemple, en période post-ménopausique, on constate une ostéopénie progressive, plus marquée pour l'os spongieux. En effet, le renouvellement de l'os trabéculaire étant environ sept fois plus rapide que celui de l'os compact, il est plus exposé aux influences hormonales, tant privatives qu'additives. De la même manière, au cours de l'immobilisation totale (paraplégie), ou en apesanteur (astronautes), la perte osseuse se fait initialement aux dépens de l'os spongieux. L'os compact n'est touché que dans un deuxième temps.

Au sein des travées osseuses est retrouvé du tissu adipeux ou hématopoïétique richement vascularisé. La moelle hématopoïétique représente 75% de l'os spongieux. De par sa structure, l'os trabéculaire dispose d'une large surface d'échange avec la moelle osseuse, lui permettant ainsi d'effectuer au mieux ses fonctions hématopoïétiques, en assurant la production de progéniteurs des différentes lignées sanguines. A l'interface entre moelle osseuse et tissu minéralisé se trouvent les cellules ostéoblastiques, jouant un rôle essentiel dans les échanges entre ces deux structures.

L'os trabéculaire et l'os cortical ont donc des structures et des fonctions différentes. **Cette différence structurale réside dans leurs degrés de porosité respectifs fait de l'os trabéculaire un os beaucoup moins dense et donc beaucoup plus fragile que l'os cortical.** Ainsi, 85% du volume d'os cortical est calcifié contre seulement 20% du volume d'os trabéculaire, le reste étant occupé par la moelle osseuse, les vaisseaux sanguins et l'endoste.

2. Structure microscopique

Qu'il soit trabéculaire ou cortical, le tissu osseux est constitué de cellules spécialisées (ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes et cellules bordantes) et d'une MEC occupant environ 95% du volume tissulaire, lui conférant ses propriétés de rigidité et d'élasticité.

2.1. Classifications « des tissus osseux »

Microscopiquement, on peut classer le tissu osseux de différentes manières, soulignant sa résistance mécanique, son origine ou la chronologie de son apparition. Ces classifications et leurs caractéristiques sont reprises dans le Tableau 1 ci-dessous.

classifications	catégories	caractéristiques
histologique basée sur la disposition des fibres de collagène	os fibreux réticulé (woven bone) ou os immature	Fibres de collagène allongées et dispersées sans organisation particulière dans la matrice Faible résistance mécanique Trouvé par exemple chez le fœtus ou lors de réparation des fractures
	os fibreux fasciculé (bundle bone)	Fibres de collagène entremêlées à celles des ligaments et tendons qui s'y attachent Trouvé par exemple dans l'os de l'alvéole dentaire
	os lamellaire (lamellar bone) ou os mature	Fibres de collagène déposées en lamelles concentriques Alternance de lamelles fibrillaires et cimentantes Os mécaniquement résistant
en fonction de l'origine embryologique	os endochondral	Elaboration de tissu osseux commençant par une ébauche cartilagineuse qui se calcifie et qui sera progressivement détruite et remplacée par du tissu osseux Forme essentiellement l'os spongieux Intervient dans la formation des os longs
	os membraneux	L'élaboration de tissu osseux se fait directement à partir des tissus mésenchymateux environnants Mode de formation des os plats
en fonction du moment d'apparition du tissu osseux	tissu osseux primaire	Fibreux réticulé formé durant l'embryogenèse Mécaniquement moins résistant que les tissus osseux secondaire et tertiaire
	tissu osseux secondaire ou de renouvellement	Apparaît durant la vie embryonnaire Os primaire rongé par les ostéoclastes et en partie remanié de manière à obtenir un tissu osseux où les fibres de collagène sont d'avantage orientées
	tissu osseux tertiaire	Apparaît après la naissance Résulte du remodelage de l'os secondaire en os haversien

Tableau 1 : Classifications des tissus osseux

2.2. La matrice extracellulaire

La MEC du tissu osseux est constituée d'une fraction organique (22%), d'une fraction minérale (69%) et d'eau (environ 9%), fractions très variables selon son degré de minéralisation et l'âge. La présence de minéral rend cette MEC tout à fait particulière au regard des autres tissus conjonctifs.

a. La phase organique

La phase organique de la MEC représente environ 22% de la masse osseuse et forme l'ostéoïde ou substance pré-osseuse. Elle est composée de la substance fibrillaire (90%) qui contient des protéines fibreuses structurales (collagène et élastine) ou adhérentes (fibronectine) et de la substance inter-fibrillaire (10%) englobant les glycosaminoglycanes et

les protéoglycanes, des petites protéines non collagéniques et des lipides en petites quantités. Ces molécules sont capables d'induire ou d'inhiber la minéralisation.

La phase organique est principalement composée de fibres de collagène de type I, un des principaux collagènes fibrillaires. Ces fibres de collagène procurent à l'os sa rigidité et sa résistance aux forces de tractions et de torsions. Les molécules de collagène I sont synthétisées par les ostéoblastes et s'organisent en fibrilles de plusieurs micromètres de long. Les chaînes polypeptidiques sont synthétisées au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux puis subissent des hydroxylations et des glycosylations avant de s'associer en hélices de 3 pro-chaînes α (2 chaînes α_1 et une chaîne α_2). Ces fibrilles sont exocytées et s'accumulent d'abord en amas grossiers dans l'os embryonnaire fibreux. Par la suite, elles seront hydrolysées par les ostéoclastes pour être remplacées par des fibres plus régulières synthétisées par des ostéoblastes plus spécialisés. Ce processus conduit à la formation d'os lamellaire. Cette matrice ou réseau fibreux nouvellement formée caractéristique, appelée tissu ostéoïde, favorise la minéralisation par la fixation, sur les fibres de collagène, de cristaux d'hydroxyapatite qui confèrent sa dureté au tissu osseux.

Plus de deux cents autres protéines, dont l'ostéocalcine (OCN), l'ostéopontine (OPN) et des facteurs de croissance, sont répertoriées au sein de la matrice organique du tissu osseux et sont pour la plupart (75%) synthétisées par les cellules osseuses elles-mêmes. Ces protéines non collagéniques, associées aux fibres collagéniques, ne constituent que 10% du tissu organique de l'os et 2% du poids total de l'os. Leurs rôles dans la structuration et le remaniement osseux ne sont pas à ce jour totalement résolus, mais leur présence au niveau du front de minéralisation du tissu ostéoïde semble les désigner comme régulateur de la formation de la phase minérale au sein des fibrilles de collagène⁴. On peut schématiquement les classer en différents groupes détaillés dans le tableau 2 ci-dessous.

Catégories	Caractéristiques générales	Exemples	Caractéristiques spécifiques
Protéines plasmatiques	25% des protéines non collagéniques de l'os, synthétisées dans d'autres organes, s'accumulent dans l'os à partir du plasma et des liquides interstitiels	Albumine	Liaison à l'hydroxyapatite et régulation de la minéralisation de la matrice
		α 2-HS-glycoprotéine (régule la prolifération des cellules osseuses)	
Protéines γ -carboxylées		Ostéocalcine	synthétisée principalement par les ostéoblastes
			la plus abondante des protéines non collagéniques (10 à 20%)
			spécifique de la matrice extracellulaire du tissu osseux
			inhibiteur de la minéralisation
			attraction des ostéoclastes dans les foyers de résorption et dans le processus de minéralisation
concentration dans le sang circulant utilisée comme indice de formation osseuse			
propriétés angiogéniques : intervention dans la vascularisation au cours du remodelage ou de la réparation du tissu osseux			
Facteurs de croissance et cytokines	activation et différenciation des cellules de la matrice osseuse assurant l'équilibre entre formation et dégradation osseuse	Transforming Growth Factor- β (TGF- β)	
		Insulin-like Growth Factor (IGF)	
		Tumor Necrosis Factor α (TNF α)	
		Interleukines (IL)	
		Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)	
		Fibroblast Growth Factors (FGFs)	
Protéoglycanes et Glycosaminoglycanes	organisation secondaire ou tertiaire des molécules de collagène, constitution de la substance ostéoïde de l'os, activité dans la différenciation ostéoblastique	Acide hyaluronique	grand pouvoir osmotique : attirent et retiennent l'eau et forment des gels fortement hydratés
		Glycosaminoglycanes	
		Protéoglycanes	certains peuvent être associés à la membrane plasmique où ils jouent le rôle de corécepteur à certains facteurs hormonaux et locaux qui influencent directement ou indirectement l'ostéogenèse

Tableau 2 : Protéines non collagéniques

Protéines d'adhésion	régulation de l'attraction et l'adhésion cellulaire (adhérence cellule-matrice), régulation de l'activité fonctionnelle des cellules osseuses, organisation structurale de la matrice	Ostéonectine (ON)	synthétisée par les ostéoblastes
			serait à l'origine de la liaison de l'hydroxyapatite avec le collagène
		Ostéopontine (OPN)	reconnue notamment par les intégrines $\alpha\beta_3$
			affinité pour l'hydroxyapatite
			interagit avec l'ostéocalcine, le collagène et la fibronectine
			régulation de l'adhérence des cellules osseuses et de l'activité de résorption ostéoclastique
			inhibition de la formation osseuse
			distribution et quantité variant en fonction de la maturité de l'os, également exprimée dans d'autres tissus que le tissu osseux, notamment dans les épithéliums et les cellules cancéreuses à caractère invasif
			exprimée dans l'os à la fois par les ostéoblastes et les ostéoclastes
			module la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite
		Fibronectine	adhérence cellule-matrice
			différenciation et survie des ostéoblastes
			particulièrement exprimée au cours du développement endochondral de l'os
		Bone Sialoprotein II (BSP II)	induit la formation de l'hydroxyapatite <i>in vitro</i>
			nucléateur de la minéralisation <i>in vivo</i>
			synthèse corrélée au début de la minéralisation
Thrombospondines 1 et 2	les plus abondamment synthétisées par les cellules osseuses		
	fortement exprimées dans la matrice sécrétée par les ostéoblastes lors de la formation osseuse, parfois détectées dans la matrice minéralisée		
	favorisent la résorption ostéoclastique		

Les protéines non collagéniques participent donc non seulement à l'organisation macromoléculaire du tissu osseux, mais elles interviennent aussi dans de nombreux processus encore mal connus de la physiologie osseuse (mécanismes de la minéralisation, chimiotactisme cellulaire, phénomènes de couplage entre résorption et formation osseuse, etc.). L'excrétion urinaire et les taux plasmatiques ou sériques de certaines de ces molécules non collagéniques, localisées uniquement au niveau de l'os, ont un intérêt clinique certain pour évaluer le « turnover » osseux.

b. La phase minérale

La phase minérale de la matrice osseuse (70 % du tissu osseux) confère à l'os sa rigidité et sa résistance mécanique. Elle constitue une véritable réserve pour l'organisme puisqu'elle contient environ 99% du calcium de celui-ci, 85% du phosphore et entre 40 et 60% du sodium et du magnésium, incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse⁵. Les sels minéraux les plus abondants sont donc le calcium et le phosphore dans un ratio égal à 1,66.

Les ions calcium et phosphate se combinent pour former un grand nombre de sels relativement instables au cours de la minéralisation du tissu osseux. Celle-ci se déroule en deux étapes indissociables. La première phase est une phase de **sécrétion de la matrice ostéoïde** sous forme de « bandes ». La cellule produit $2 \mu\text{m}^3$ de matrice par jour qui s'accumule couche après couche pour former une bande définitive de 10 à 15 μm . Les fibres de collagène sont orientées en fonction des tractions de l'ostéoblaste sur la matrice et des contraintes mécaniques. La deuxième phase constitue **la minéralisation** proprement dite. La dureté et la rigidité du tissu osseux sont dues à la présence de sels minéraux dans la matrice ostéoïde et plus particulièrement de calcium et d'hydroxyde de phosphate qui précipitent pour former des cristaux d'hydroxyapatite thermodynamiquement stables, dont la formule chimique est $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$. Ces cristaux se fixent entre et sur les fibres de collagène, assurant ainsi la minéralisation de l'ostéoïde. L'OCN et les vésicules matricielles issues de l'ostéoblaste contenant de la phosphatase alcaline osseuse (PAL) sont les éléments de contrôle du dépôt minéral dans l'ostéoïde. Les ions calcium et phosphate entrant dans la composition des cristaux d'hydroxyapatite constituent une réserve rapidement mobilisable par l'organisme et participent ainsi au maintien de l'homéostasie phosphocalcique.

2.3. Les cellules osseuses

a. Les cellules souches mésenchymateuses

La moelle osseuse chez l'homme adulte est composée de tissu hématopoïétique associé à un tissu de soutien, le stroma, formé de fibroblastes, de cellules épithéliales, endothéliales, adipocytes, macrophages et d'un panel de cellules multipotentes regroupées sous le nom de cellules souches mésenchymateuses (CSM). La moelle osseuse contient en réalité une quantité limitée de cellules souches hématopoïétiques (1 à 2%) et de CSM (moins de 0,5%) par rapport aux cellules totales⁶. D'origine mésodermique, les progéniteurs ostéoblastiques sont des CSM⁷, essentiellement localisés dans le stroma médullaire mais également au niveau du périoste et de l'endoste chez l'adulte. On trouve également des CSM au niveau du tissu musculaire⁸, du tissu adipeux⁹, de la membrane synoviale¹⁰, du sang de cordon¹¹ et du sang périphérique¹². Leur nombre diminue avec l'âge¹³. Sous le contrôle de différents facteurs de transcription spécifiques, ces cellules souches indifférenciées et pluripotentes sont capables de se différencier en ostéoblastes, chondroblastes, myoblastes et adipocytes¹⁴⁻¹⁶ (Figure 3).

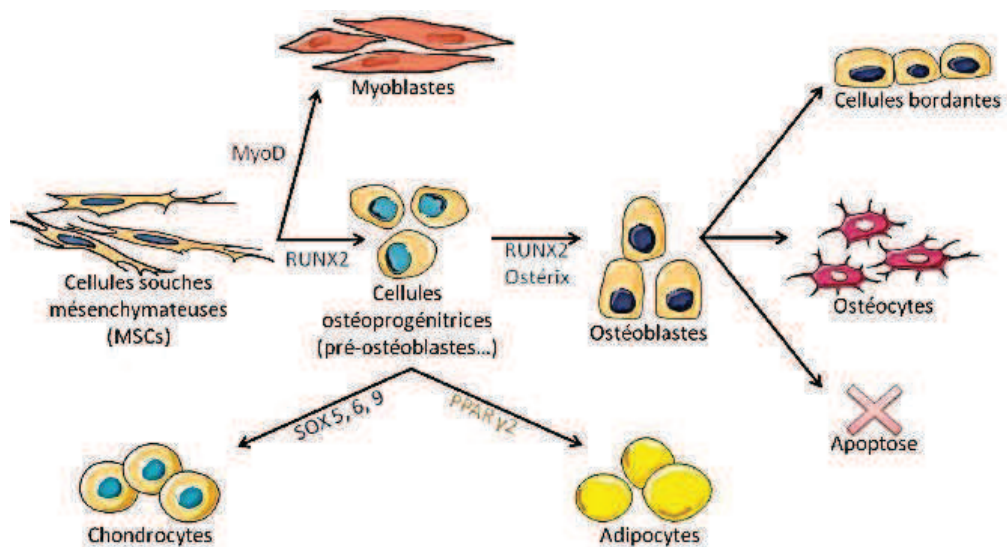


Figure 3 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses peuvent se différencier en chondrocytes, adipocytes, myoblastes et ostéoblastes sous l'influence de différents facteurs de transcription. Par la suite, les ostéoblastes donnent les cellules bordantes de l'os, les ostéocytes ou meurent par apoptose. D'après Marie 2008¹⁷.

Le processus de différenciation des CSM en ostéoblastes matures (Figure 4) est continu et implique une série complexe d'étapes de prolifération et de différenciation faisant intervenir notamment les facteurs de transcription « Runt related gene 2 » (Runx2) et ostérix. Progressivement la morphologie des cellules évolue d'une forme de type fibroblastique en des cellules cuboïdes possédant un large noyau et organisées à la surface de l'os en un épithélium d'ostéoblastes matures qui synthétisent le tissu ostéoïde. Ces transitions morphologiques s'accompagnent de l'augmentation de l'expression de nombreux gènes, de manière séquentielle, menant à la synthèse de protéines essentielles à la différenciation des CSM en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes matures, mais également essentielles à la formation et la minéralisation de la MEC. La phase précoce de cette différenciation est caractérisée par l'expression de Runx2. Puis la maturation des cellules est caractérisée par l'expression de gènes ostéoblastiques associés à la production de matrice tels que la PAL, le collagène de type I ou encore l'OPN. Les ostéoblastes matures quant à eux expriment des marqueurs tardifs tels que la « bone sialoprotein » (BSP), ostérix, l'OPN et l'OCN. D'autres facteurs de transcription interviennent dans ce processus de différenciation comme, par exemple, les membres de la famille « activator protein-1 » (AP-1), la β -caténine, « homeobox mshlike-2 » (Msx2) ou « distal-less homeobox-5 » (Dlx5) (Figure 4). Ces facteurs de transcription peuvent être activés par de nombreux facteurs solubles locaux ou systémiques qui participent à la régulation de l'ostéogenèse comme le « transforming growth factor beta » (TGF- β), certaines « bone morphogenetic proteins » (BMPs), les « fibroblast growth factors » (FGF), la parathormone (PTH), la vitamine D ou encore certains stéroïdes. La voie WNT- β -caténine (Figure 5) joue un rôle essentiel dans la différenciation ostéoblastique et sur les cellules osseuses en général (Figure 6). Elle stimule effectivement la prolifération des précurseurs ostéoblastiques et leur différenciation et inhibe l'apoptose des ostéoblastes matures. L'inhibition de cette voie de signalisation, notamment par les antagonistes sclérostine (SOST) et « dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 » (DKK1), diminue la formation osseuse et augmente l'ostéorésorption¹⁸. D'autre part, la nature de la MEC est également connue pour influencer la différenciation ostéoblastique. Les protéines non collagéniques telles la fibronectine, la vitronectine, la laminine, la BSP, l'ostéonectine et l'OPN sont reconnues par les intégrines et influencent ainsi ce processus. A titre d'exemple, l'interaction avec la fibronectine principalement grâce à l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, est nécessaire à la différenciation ostéoblastique et à la construction d'une matrice appropriée indispensable à la minéralisation^{19,20}.

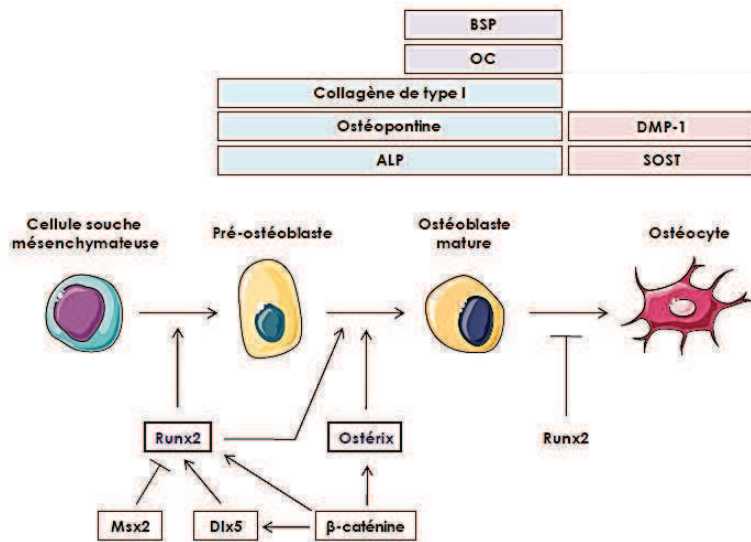


Figure 4 : La différenciation ostéoblastique

ALP : Phosphatase Alcaline, BSP : Bone Sialoprotein, DMP-1 : Dentin Matrix Protein 1, OC : Ostéocalcine, SOST : Sclérostine. D'après Robling *et al.*, 2006; Marie, 2008^{17,21}

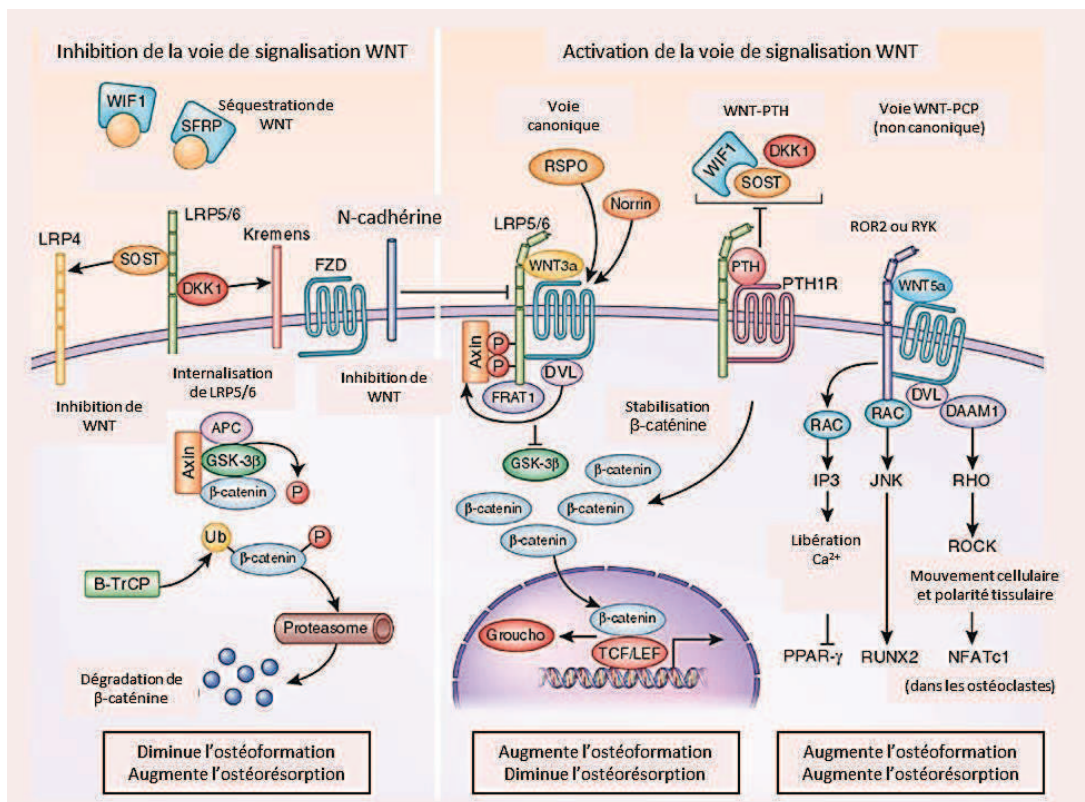


Figure 5 : Voies de signalisation WNT

D'après Roland Baron et Michaela Kneissel¹⁸

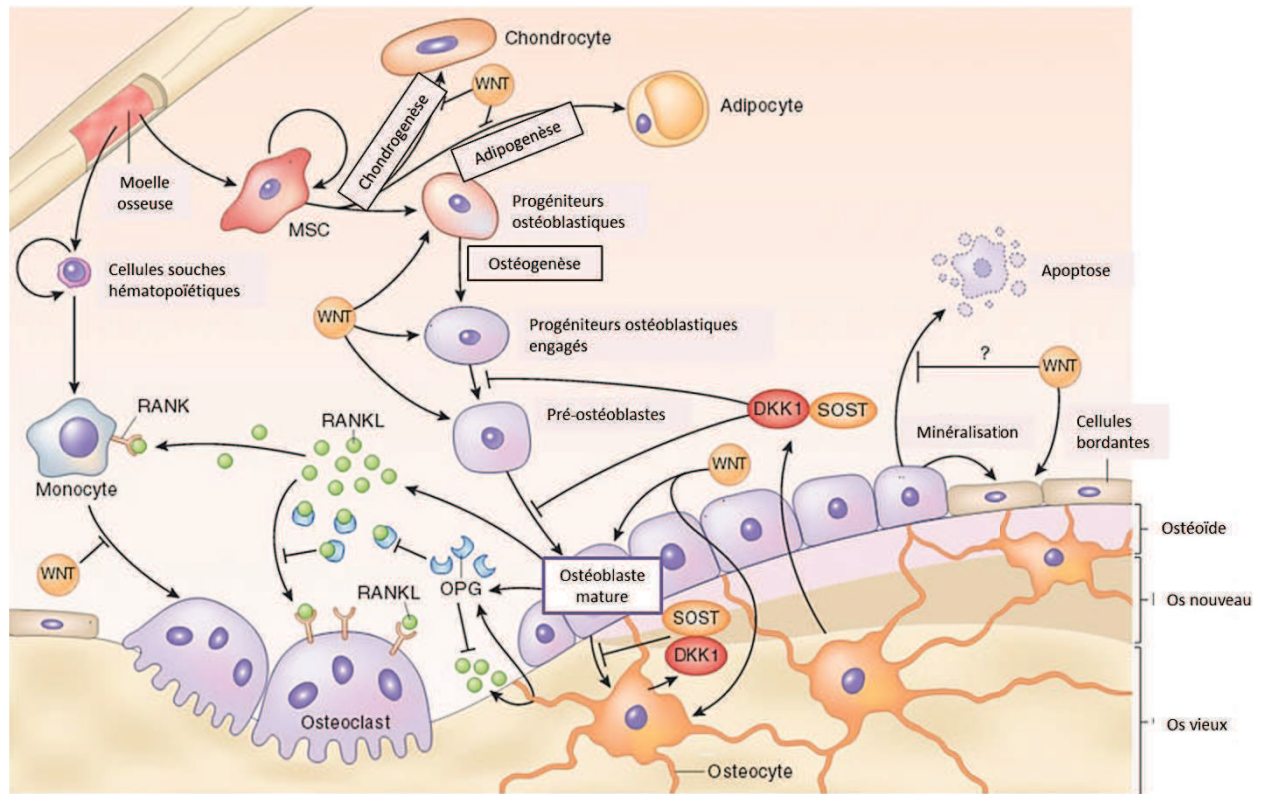


Figure 6 : Effets de la voie WNT-β-caténine sur les cellules osseuses

D'après Roland Baron et Michaela Kneissel¹⁸.

b. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes différenciés sont des cellules ostéoformatrices disposées en monocouche cellulaire sur la surface osseuse (Figure 7).

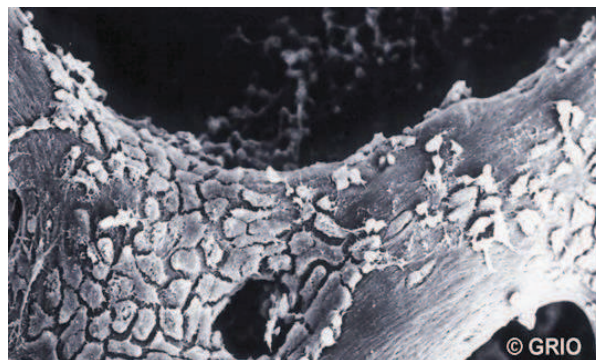


Figure 7 : Ostéoblastes tapissant la trame osseuse au microscope électronique à balayage

D'après le site internet : www.grio.org/iconographie-os.php

L'ostéoblaste actif est une cellule cuboïde, polyédrique ou vésiculeuse d'environ 20 µm de diamètre, polarisée, présentant un large noyau apical et dont le cytoplasme basophile

est rempli d'organites impliqués dans la synthèse et la sécrétion de macromolécules matricielles. En tant que cellules spécialisées dans la sécrétion de la MEC, les ostéoblastes présentent en ultrastructure un réticulum endoplasmique abondant et associé aux ribosomes ainsi qu'un appareil de Golgi et un système vésiculaire bien développés²². L'ostéoblaste est limité par une membrane plasmique classique possédant toutefois quelques modifications structurelles associées à sa polarité cellulaire. En effet, la portion de membrane plasmique adjacente à l'os en formation se trouve hérissée d'un nombre important de prolongements cytoplasmiques qui peuvent s'étendre profondément entre les fibrilles de collagène de l'ostéoïde. Au contraire, la portion de membrane plasmique située au pôle opposé de la cellule, c'est-à-dire celui qui n'est pas en contact avec l'os en formation, possède peu d'expansions. Ces nombreux prolongements cytoplasmiques permettent également d'établir des contacts avec d'autres ostéoblastes et les ostéocytes environnants. Les ostéoblastes ont pour fonction principale la **synthèse de la substance ostéoïde**. Par ailleurs, les ostéoblastes participent également à la **régulation du remodelage osseux** via le contrôle de l'activité des ostéoclastes. En effet, ils sont capables d'activer la résorption osseuse via l'induction de la différenciation des cellules progénitrices hématopoïétiques en ostéoclastes puisque l'ostéoblaste peut synthétiser et sécréter des facteurs tels que le « Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand » (RANKL) ou encore interagir directement avec les cellules progénitrices pour induire leur différenciation en ostéoclastes. A l'inverse, ils peuvent aussi produire l'ostéoprotégérine (OPG) qui inhibe l'activité ostéoclastique. Les ostéoblastes exercent donc un rôle essentiel dans le contrôle de la balance entre ostéoformation et ostéorésorption.

c. Les cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes inactivés ou quiescents, qui forment une monocouche de cellules aplaties présentes le long des surfaces osseuses non soumises au remodelage, le reste étant recouvert par les ostéoblastes actifs. Ces cellules, pauvres en cytoplasme et en organites, ont une activité métabolique très réduite²³. Elles peuvent cependant se multiplier sous l'effet de stimuli et ont la capacité de se différencier pour retrouver un phénotype d'ostéoblaste actif²⁴. Leur principale fonction est d'assurer la communication entre la surface osseuse, l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse. Ces cellules ont également un rôle dans les premières phases de la résorption osseuse. En effet, sous l'effet de certains signaux, elles se détachent

de la surface osseuse, laissant place à une zone exposée accessible à l'ancrage des ostéoclastes. Les cellules bordantes ont donc un rôle important dans le cycle du remodelage osseux²⁵.

d. Les ostéocytes

Durant la synthèse de la matrice, une large part des ostéoblastes meurent, d'autres retournent à un état de repos, principalement sur les surfaces osseuses, d'autres encore sont emprisonnés dans la matrice qu'ils ont synthétisée. Dans ce dernier cas, ils portent le nom d'ostéocytes.

Les ostéocytes représentent le type cellulaire prépondérant au sein de l'os mature (environ 90% des cellules). La transformation de l'ostéoblaste en ostéocyte se fait sous l'action notamment de la « Matrix Metalloproteinase » (MMP) de type 2 et de la « Dentin Matrix Protein-1 » (DMP-1)^{26,27} et se caractérise par la diminution progressive de certains marqueurs ostéoblastiques tels que la PAL, le collagène de type I, la BSP et l'OCN²⁸. Cette transformation s'accompagne également d'une augmentation de certains marqueurs ostéocytaires, tels que SOST. Le volume cytoplasmique ainsi que les organites sont réduits, traduisant une faible activité de synthèse protéique de ces cellules. Les ostéocytes possèdent de nombreux et fins prolongements cytoplasmiques qui leur confèrent une forme étoilée²⁹ (Figure 8). Ces prolongements cytoplasmiques leur permettent d'établir des contacts entre eux ainsi qu'avec les cellules bordantes qui recouvrent la surface osseuse.

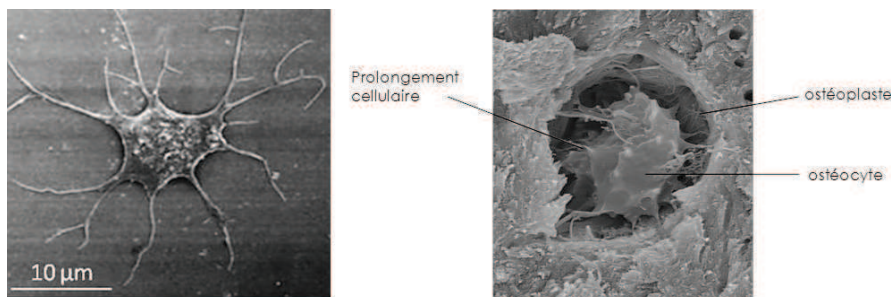


Figure 8 : Observation d'un ostéocyte en microscopie électronique à balayage

À gauche, les prolongements cytoplasmiques de l'ostéocyte au sein de la matrice osseuse, d'après Tanaka-Kamioka *et al.* 1998³⁰ et à droite vue d'un ostéocyte emprisonné dans l'os compact au microscope électronique à balayage (x2000), d'après le site internet :

<http://visualsunlimited.photoshelter.com/image/100007hafbAEKg.U>

Les substances nutritives qui proviennent du sang atteignent les ostéocytes, immobilisés dans la matrice osseuse, en diffusant, soit dans les canalicules entourant les prolongements cellulaires, soit dans les cellules elles-mêmes, passant de l'une à l'autre par les jonctions communicantes³¹. Puisque la diffusion est peu efficace, l'ostéocyte ne peut survivre que s'il se trouve à moins de 0,2 mm d'un vaisseau sanguin. Cette limitation explique la taille des travées de l'os trabéculaire et la structure de base de l'os compact. Les ostéocytes sont essentiels pour le renouvellement continu de la matrice organique de la zone périostéocytaire. Ils sont capables, sous l'action de la parathormone et de la vitamine D, de résorber cette matrice labile, au cours d'un processus appelé « ostéolyse ostéocytaire ». Inversement, sous l'influence de la calcitonine, il y aura stockage de calcium au niveau de cette même matrice périlacunaire, ces différents mécanismes assurant l'homéostasie du calcium dans le plasma.

Les ostéocytes forment un vaste réseau et interviennent essentiellement dans la transmission de signaux mécanosensoriels au cours du processus de remodelage osseux. En effet, ces cellules interagissent avec les fibres de collagène et fonctionnent comme des mécanorécepteurs, percevant les modulations des contraintes mécaniques appliquées à l'os. Ils transmettent ensuite les informations aux ostéoblastes et aux cellules bordantes par l'intermédiaire des jonctions communicantes, assurant une adaptation fonctionnelle du tissu osseux³². Par ailleurs, les ostéocytes régulent la formation osseuse par la sécrétion de SOST, un antagoniste de la voie WNT, contrôlant ainsi négativement l'activité et la différenciation des ostéoblastes^{32,33}. Il semblerait également que la mort des ostéocytes par apoptose soit le facteur déclenchant l'ancrage des ostéoclastes à la surface osseuse et par conséquent la mise en place du processus de résorption³⁴.

e. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse (Figure 9), dérivent de précurseurs hématopoïétiques mononucléés de type monocytaire³⁵.

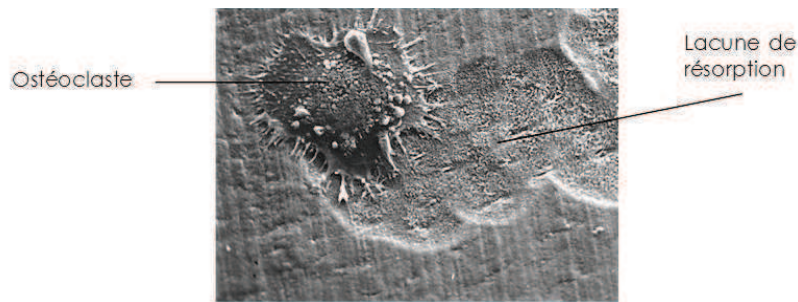


Figure 9 : Vue d'un ostéoclaste résorbant la matrice osseuse au microscope électronique à balayage

D'après le site internet : <http://www.atpbone.org/>

Ces précurseurs circulants colonisent la moelle osseuse et se différencient au contact des cellules stromales pré-ostéoblastiques. La différenciation de ces précurseurs en ostéoclastes se fait sous l'influence de facteurs de transcription (PU-1, c-fos, « nuclear factor kappa B » (NF- κ B)) en réponse à certaines cytokines dont les principales sont le « Macrophage Colony Stimulating Factor » (M-CSF) et RANKL. Le M-CSF, en se liant à son récepteur M-CSF R, stimule la prolifération et la survie des précurseurs monocytaires. RANKL, exprimé à la membrane des ostéoblastes ou des cellules stromales ou libéré sous forme soluble dans le compartiment extracellulaire, se lie à son récepteur « Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B » (RANK) exprimé par les cellules de la lignée ostéoclastique. Ceci a pour conséquence d'activer la survie et la différenciation des précurseurs en pré-ostéoclastes mononucléés ainsi que leur fusion pour former des ostéoclastes matures multinucléés (Figure 10) capables de résorber la matrice osseuse³⁶.

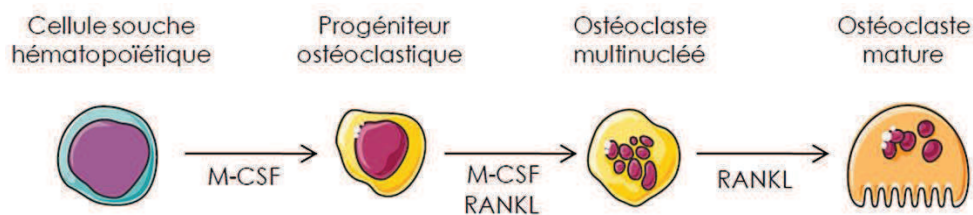


Figure 10 : La différenciation ostéoclastique

A l'inverse, l'OPG, synthétisée par les ostéoblastes, agit comme un récepteur leurre de RANKL inhibant ainsi la liaison du facteur pro-résorptif à son récepteur RANK. Autrement dit, l'OPG prévient la naissance et la maturation des ostéoclastes. Ainsi, la plupart des hormones et des facteurs de croissance qui affectent la résorption osseuse agissent à la fois

sur l'équilibre formation/différenciation des ostéoclastes et sur leur activité. En particulier, la triade de molécules RANK/RANKL/OPG joue un rôle majeur dans ce processus. Ces cytokines qui appartiennent à la super-famille des « Tumor Necrosis Factors » (TNF) et de leurs récepteurs, représentent un pivot moléculaire vers lequel convergent la plupart des systèmes régulateurs de la résorption osseuse connus à ce jour³⁷.

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées (100 µm de diamètre en moyenne), pouvant renfermer de deux à trente noyaux. Ces cellules possèdent un appareil de Golgi très développé, de nombreuses mitochondries péri-nucléaires et sont riches en enzymes lysosomales telles que la « Tartrate Resistant Acide Phosphatase » (TRAP) ou la cathepsine K ainsi qu'en métalloprotéases, nécessaires à leur activité de dégradation osseuse³⁸. Ces cellules sont polarisées puisque les noyaux se trouvent à l'opposé de la surface osseuse tandis que le pôle basal, au niveau de la zone en contact avec la matrice osseuse, présente une membrane plissée appelée bordure en brosse au contact de laquelle la matrice est résorbée (Figure 11), ce qui d'une part augmente la surface de contact entre l'ostéoclaste et le tissu osseux et d'autre part confine les changements de pH à une zone bien précise : les lacunes de Howship ou lacune de résorption. La résorption débute par l'adhérence de l'ostéoclaste sur la travée osseuse (via les intégrines) avec constitution d'une « poche » hermétique entre la bordure en brosse et l'os. L'ostéoclaste relargue dans la poche hermétique des ions H⁺ grâce à des pompes à protons ATP-dépendantes, ce qui acidifie le milieu. Il s'ensuit alors une dissolution de la phase minérale (les cristaux d'hydroxyapatite) du tissu osseux, suivie d'une phase de digestion de la matrice collagénique sous l'effet d'enzymes lysosomiales, dont l'activité est optimale à pH acide, telles que la cathepsine K et certaines métalloprotéases matricielles (ou collagénases) libérées par exocytose.

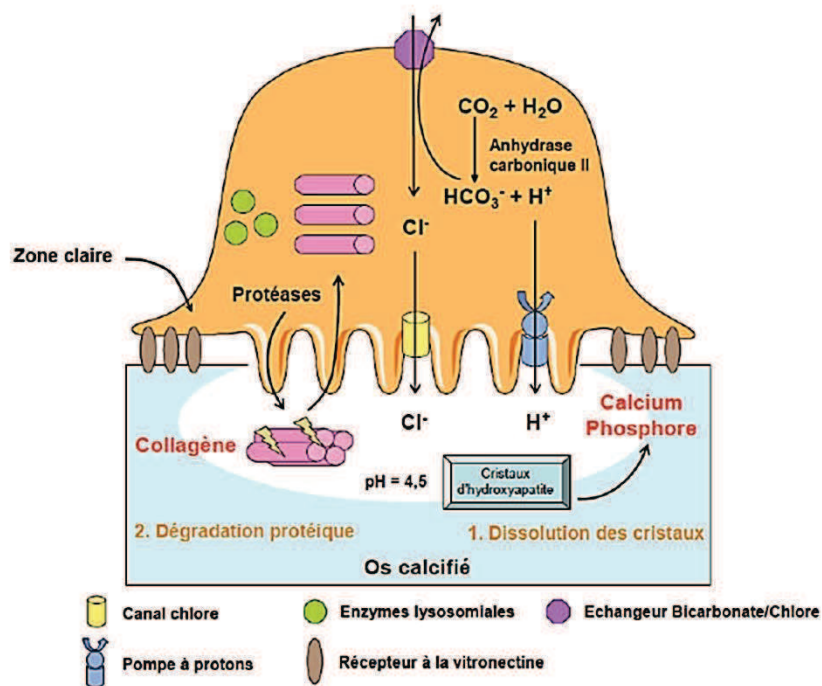


Figure 11 : Schéma d'un ostéoclaste actif

d'après Rousselle et Heymann, 2002³⁹

3. Croissance et remodelage osseux

3.1. La croissance osseuse

Quelque soit le mode d'ostéogenèse, l'os se développe toujours grâce au remplacement du tissu conjonctif préexistant par du tissu osseux.

a. L'ossification endochondrale

L'ossification endochondrale survient au cours du développement et de la croissance des os longs et aboutit essentiellement à la formation d'os spongieux. On distingue l'ossification primaire et l'ossification secondaire. L'ossification primaire caractérise la formation initiale du tissu osseux chez le fœtus en débutant au centre de la future diaphyse et permet de former l'os primaire endochondral (os immature, non lamellaire). L'ossification secondaire permet la croissance et la maturation osseuse et s'achève à la fin de la puberté par remplacement complet de l'os immature par un os mature dit lamellaire. Elle permet également la croissance en longueur des os. L'ossification endochondrale s'étend le long de la diaphyse et de proche en proche aux épiphyses par un processus global de formation, dégénérescence, résorption du cartilage et remplacement par de l'os.

L'ossification endochondrale assure donc le remplacement d'une structure cartilagineuse par de l'os. Cette ossification préserve une zone de cartilage articulaire en regard de la cavité synoviale et une zone de cartilage immature (le cartilage de croissance) au niveau de la métaphyse qui permet la croissance en longueur de l'os jusqu'à l'âge adulte⁴⁰.

b. Autres types d'ossification

L'ossification membranaire se déroule lors du développement des os plats.

L'ossification périostique ou périchondrale permet la croissance en épaisseur de l'os et assure une augmentation du diamètre de la diaphyse osseuse ainsi que de la formation des épiphyses. Il s'agit d'une croissance endoconjonctive où les CSM du périoste se différencient en ostéoblastes et l'ossification se fait par apposition de couches successives de lamelles osseuses.

L'ossification haversienne est une ossification tertiaire survenant suite au remaniement d'un tissu osseux déjà élaboré pour lui permettre de mieux résister aux contraintes mécaniques. Elle survient principalement au niveau de la diaphyse des os longs et provoque entre autre la libération de sels calciques jouant un rôle dans le maintien de la calcémie.

3.2. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus physiologique qui permet le **renouvellement du tissu osseux grâce à la résorption de l'os ancien et à son remplacement par une matrice osseuse nouvellement synthétisée**⁴¹. En effet, malgré une apparente rigidité, l'os est en constant renouvellement, avec un remodelage continu de 5% des surfaces intracorticales et de 20% des surfaces trabéculaires chez un individu sain d'âge moyen sur une durée de 4 à 6 mois. 10% du tissu osseux adulte est ainsi complètement renouvelé chaque année. Avant d'atteindre l'âge adulte, un remodelage osseux intensif permet la croissance du squelette, notamment au niveau des os longs. Ce remodelage osseux nécessite un **couplage entre activités ostéoblastique et ostéoclastique** grâce aux contacts entre les cellules spécialisées ainsi qu'à l'intervention de nombreux facteurs²¹. Le remodelage osseux est également nécessaire au maintien de l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme, à la réparation de lésions (fractures etc.) et permet l'adaptation aux contraintes mécaniques.

a. Rôle des ostéocytes

Le remodelage osseux repose donc essentiellement sur deux types cellulaires : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Ces deux types cellulaires ne sont cependant pas totalement indépendants puisque les ostéoblastes sont nécessaires à la différenciation des ostéoclastes et sécrètent des facteurs solubles régulateurs de l'ostéoclastogenèse^{42,43}. Les ostéocytes participent également au remodelage osseux en servant de mécanorécepteurs et en transmettant les signaux mécano-sensoriels aux cellules environnantes. Leurs interactions avec les fibres de collagène via des intégrines leur permettent de percevoir les contraintes mécaniques appliquées sur l'os. Ces informations sont transmises aux cellules bordantes et ostéoblastes activés grâce aux jonctions communicantes présentes dans leurs extensions cytoplasmiques, qui adaptent leur activité en conséquence³¹. Les ostéocytes sont également capables de réguler négativement la différenciation et l'activité ostéoblastique, et donc la formation osseuse par la sécrétion de SOST, un antagoniste de la voie WNT/ β -caténine³². De plus, cette production de SOST par les ostéocytes induit directement la dissolution de la matrice minérale en induisant l'expression de l'anhydrase carbonique de type II, de la cathepsine K et de la TRAP par les ostéoclastes⁴⁴. Les ostéocytes agissent également sur les ostéoclastes puisqu'ils sont une source majeure de RANKL dans l'os⁴⁵. En plus de favoriser la différenciation ostéoclastique, ils déclenchent l'ancrage des ostéoclastes sur la surface osseuse pour induire la résorption.

b. Système RANK/RANKL/OPG

Le système RANK/RANKL/OPG est le médiateur de la communication intercellulaire entre ostéoblastes et ostéoclastes (Figure 12). RANKL se lie avec une forte affinité à son récepteur RANK exprimé à la surface des ostéoclastes, cette interaction RANK/RANKL étant essentielle à la différenciation et à la survie des ostéoclastes⁴⁶. L'OPG, une glycoprotéine soluble produite notamment par les ostéoblastes, agit comme un récepteur leurre de RANKL. Le ratio entre le niveau d'expression de RANKL et d'OPG par les ostéoblastes permet donc le contrôle de la résorption osseuse⁴⁷. Différents facteurs tels que Runx2, la PTH, l'interleukine (IL)-1, l'IL-6, le TNF α , la vitamine D, le TGF- β , les BMPs et les oestrogènes sont capables de réguler l'homéostasie du tissu osseux en agissant sur la triade RANK/RANKL/OPG. Cette triade moléculaire contribue au bon déroulement du remodelage osseux. Tout dérèglement de cet équilibre entre les phases d'apposition et de résorption

osseuse est susceptible d'induire l'apparition de pathologies comme dans le cas des pathologies tumorales associées à un fort remodelage osseux.

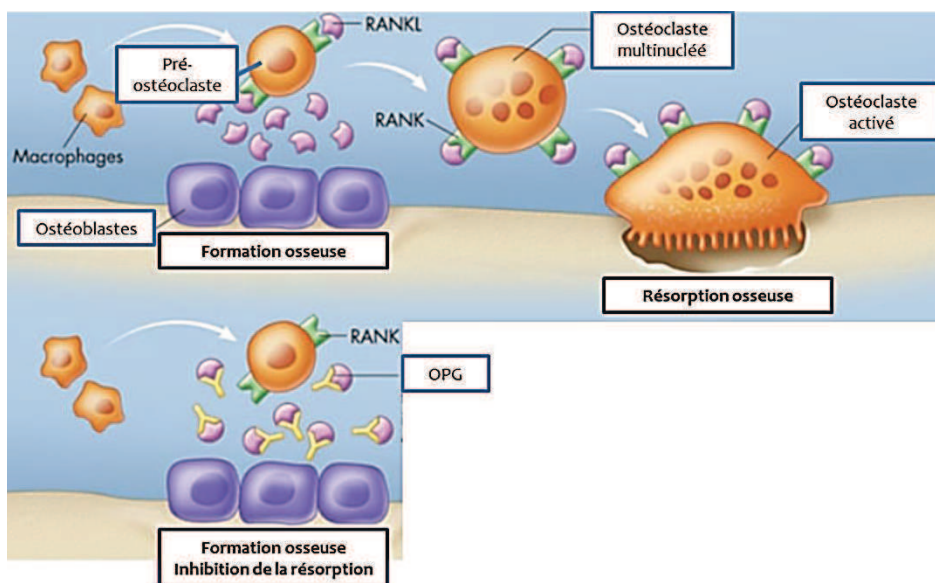


Figure 12 : Triade RANK/RANKL/OPG

Adapté de l'article en ligne de Robert G. Josse <http://www.healthplexus.net/article/bone-biology-and-role-rankranklolog-pathway>

c. Etapes du remodelage osseux

Le remodelage osseux peut être divisé en cinq phases^{21,48} : l'activation, la résorption, la réversion, la formation et la quiescence (Figure 13).

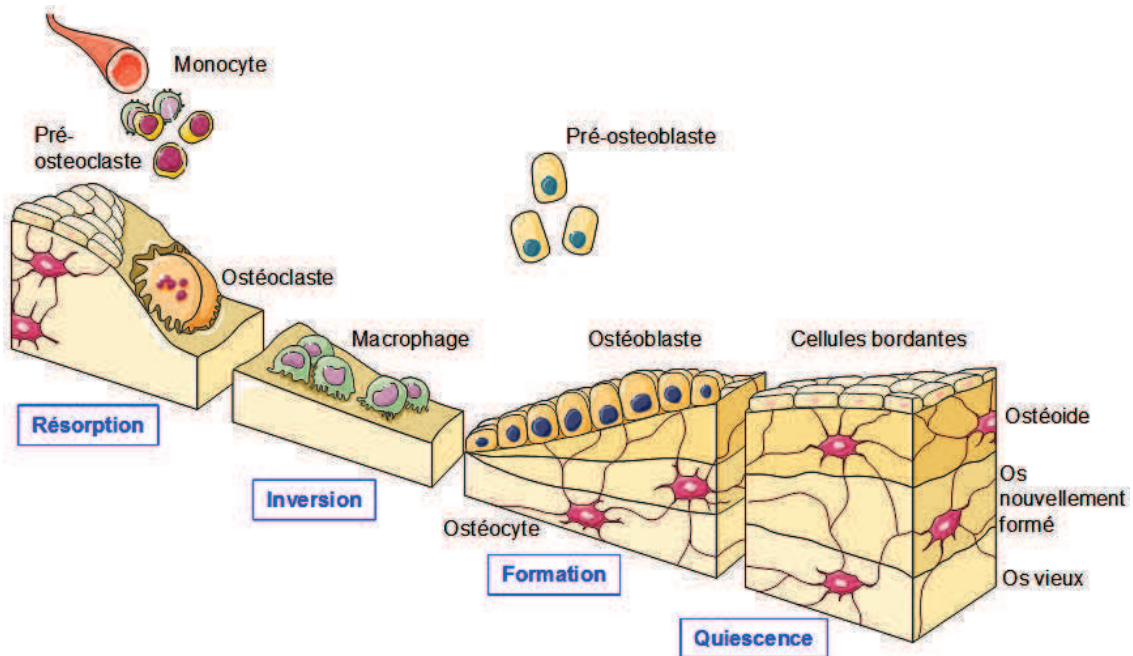


Figure 13 : Les différentes étapes du remodelage osseux

D'après Lerner⁴⁹ et Servier Medical Art (http://www.servier.fr/smart/home_smart.asp).

La phase d'activation scelle le début du remodelage osseux qui commence par un signal mécanique, hormonal ou nerveux et active le recrutement de précurseurs ostéoclastiques et leur différenciation.

Au cours de la phase de résorption (30 jours environ), les ostéoclastes différenciés vont résorber la matrice osseuse grâce à l'action de pompes à protons et la libération d'enzymes protéolytiques.

La phase d'inversion fait la transition entre la phase de résorption et d'apposition osseuse et correspond au remplacement des ostéoclastes par des cellules de type macrophagique permettant d'éliminer les débris matriciels restant au fond de la lacune de résorption⁵⁰. Des facteurs pro-ostéoblastiques libérés de la matrice (BMPs, FGFs, TGF- β , etc.) vont activer la formation ostéoblastique au niveau de cette lacune. D'autres molécules directement sécrétées par les ostéoclastes (BMP-6, sphingosine-1-phosphate etc.) participent au recrutement des pré-ostéoblastes et activent la formation osseuse⁴⁸.

Au cours de la **phase de formation** (4 à 5 mois), des cellules ostéoprogénitrices vont venir tapisser la lacune, proliférer et se différencier en ostéoblastes qui vont sécréter une nouvelle matrice collagénique. Cette matrice commencera à être minéralisée dans les quinze jours suivants par l'apposition de cristaux d'hydroxyapatite.

Une fois la formation osseuse terminée, les ostéoblastes meurent par apoptose, deviennent quiescents pour former la couche de cellules bordantes ou sont piégés au sein de la matrice nouvellement formée où ils se transforment en ostéocytes. C'est la **phase de quiescence**. Chez l'adulte, la plupart des surfaces osseuses sont à l'état quiescent.

II. Ostéosarcomes

L'ostéosarcome est une tumeur osseuse primitive maligne. Les tumeurs osseuses primitives produisent, par définition, des composants qui entrent dans la constitution habituelle d'un os. Les tumeurs osseuses, bénignes ou malignes, peuvent donc produire du tissu osseux, du tissu cartilagineux, du tissu conjonctif, de la moelle osseuse, des vaisseaux, de la graisse, du muscle et du tissu nerveux (Tableau 3).

Les tumeurs osseuses peuvent être primitives mais également secondaires à une autre tumeur (prostate, poumon, rein, sein, thyroïde), on parle alors de métastases. Les métastases osseuses représentent 70% des tumeurs osseuses malignes et sont une source importante de diagnostic différentiel des tumeurs osseuses primitives. Le contexte clinique, la localisation, le nombre de lésions et l'âge de survenue de la lésion osseuse doit aider à orienter le diagnostic. En effet, les tumeurs osseuses primitives surviennent essentiellement chez l'enfant, l'adolescent et le jeune adulte alors que les métastases osseuses surviennent principalement chez l'adulte de plus de 50 ans.

Tableau 3 : Classification des tumeurs osseuses primitives

	Bénignes	Intermédiaires (localement agressives)	Intermédiaires (rarement métastatiques)	Malignes
Tumeurs chondrogéniques	Ostéochondrome	Fibrome chondromyxoïde Tumeur cartilagineuse atypique Chondrosarcome de grade I	Chondroblastome	Chondrosarcome de grade II
	Chondrome			Chondrosarcome de grade III
	Ostéochondromyxome			Chondrosarcome dédifférencié
	Exostose subunguéale			Chondrosarcome mésenchymateux
	Chondromatose synoviale			Chondrosarcome à cellules claires
Tumeurs ostéogéniques	Ostéome Ostéome ostéoïde	Ostéoblastome		Ostéosarcome central de bas grade
				Ostéosarcome conventionnel :
				-Ostéosarcome chondroblastique
				-Ostéosarcome fibroblastique
				-Ostéosarcome ostéoblastique
				Ostéosarcome télangiectasique
				Ostéosarcome à petites cellules
				Ostéosarcome secondaire
				Ostéosarcome parostéal
				Ostéosarcome de surface de haut grade
Tumeurs fibrogéniques		Fibrome osseux desmoplastique		Fibrosarcome de l'os
Tumeurs fibrohistiocytaires	Histiocytofibrome bénin			
Tumeurs hématopoïétiques				Myélome
				Plasmocytome solitaire osseux
				Lymphome osseux primaire non-Hodgkinien
Tumeurs riches en cellules géantes ostéoclastiques	Tumeurs à cellules géantes des petits os	Tumeur osseuse à cellules géantes		Tumeur osseuse maligne à cellules géantes
Tumeurs notochordales	Tumeur notochordale bénigne			Chordome
Tumeurs vasculaires	Hémangiome	Hémangiome épithélioïde		Hémangiothéliome épithélioïde
				Angiosarcome
Tumeurs myogéniques	Léiomyome osseux			Léiomyosarcome osseux
Tumeurs lipogéniques	Lipome osseux			Liposarcome osseux
Tumeurs de nature indéfinie	Kyste osseux simple	Kyste osseux anévrismal		
	Dysplasie fibreuse	Histiocytose Langerhansienne		
	Dysplasie ostéofibreuse	-monostotique		
	Hamartome chondromésenchymateux	-polyostotique		
	Malade de Rosai-Dorfman	Maladie d'Erdheim-Chester		
Tumeurs diverses				Sarcome d'Ewing
				Adamantinome
				Sarcome osseux indéfini pléomorphe de haut grade

1. Origine

L'ostéosarcome est une tumeur d'origine mésenchymateuse puisqu'il dérive du mésoderme et semble issu des CSM⁵¹. L'ostéosarcome, tout comme les ostéoblastes, exprime Runx2⁵², la PAL, l'OCN et la BSP. Il résulterait ainsi d'une dérégulation du programme de différenciation des CSM. Différents degrés de différenciation peuvent être retrouvés dans cette pathologie. De manière générale, une corrélation inverse semble exister entre le degré de différenciation et l'agressivité des tumeurs.

2. Définition

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, l'ostéosarcome serait « une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales ». Selon cette définition, une production d'os, même minime, suffit pour parler d'ostéosarcome. L'ostéosarcome présente en réalité une grande variété de lésions distinctes par leur présentation clinique et radiographique, leur aspect microscopique et leur évolution, conduisant à définir cette pathologie comme une tumeur très hétérogène. Les plages ostéoformatrices sont parfois minoritaires et peuvent être accompagnées d'importantes plages d'ostéolyse, soulignant cet aspect très hétérogène. L'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales pourra également être précisée et discutée ultérieurement, soulignant l'importance de l'environnement tumoral osseux dans cette pathologie. L'ostéosarcome est plus communément défini comme une tumeur osseuse primitive maligne à l'hétérogénéité intra- et inter-tumorale et caractérisé par des lésions ostéolytiques et ostéocondensantes. L'ostéosarcome peut toucher tous les os (Figure 14) mais manifeste une prédilection pour la métaphyse des os longs, proche de la plaque de croissance, avec moins de 10% touchant la diaphyse et une localisation épiphysaire rare. Il se localise essentiellement au genou : 40% affectent l'extrémité distale du fémur et 15% l'extrémité proximale du tibia. 14% touchent l'extrémité supérieure du fémur et de l'humérus, 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 à la base du crâne, ainsi qu'à la mandibule, survenant généralement à un âge plus avancé. La localisation au pelvis est retrouvée dans 10% des cas^{53,54} et 1 à 3% touchent le rachis. On retrouve un pourcentage plus

élevé d'ostéosarcome du squelette axial chez les patients âgés de plus de 60 ans (39,7%) que chez les patients âgés de moins de 25 ans (12,2%) ou de 25 à 59 ans (35,3%)⁵⁵.

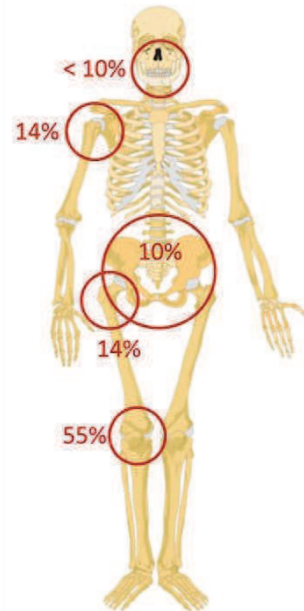


Figure 14 : Localisations préférentielles de l'ostéosarcome

Adapté de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Human_skeleton_front_-_no_labels.svg

Trois groupes de lésions sont identifiés selon leur localisation : les ostéosarcomes de surface, ceux de siège intracortical et les ostéosarcomes intramédullaires ou centraux qui sont les plus fréquents (Tableau 4).

Central	Intracortical	Surface
Conventionnel - ostéoblastique - chondroblastique - fibroblastique		Périosté
Télangiectasique Cellules géantes Petites cellules rondes Bien différencié		Juxtacortical (paraostal) Conventionnel (haut grade)

Tableau 4 : Principales variétés d'ostéosarcomes définies selon leur localisation et leur forme microscopique

D'après Guinebretière JM et al.⁵⁶

- Les ostéosarcomes de surface sont généralement de bon pronostic, associant les formes périostées (d'aspect cartilagineux), les formes paraostéales ou juxtacorticales (très ostéoformatrices) et ceux de forme commune (plus agressifs).

- Les ostéosarcomes intracorticaux sont rares.

- Les ostéosarcomes centraux sont les plus fréquents et regroupent différentes variantes histologiques qui, à l'exception de la forme dite « bien différenciée intramedullaire », sont toutes de haute malignité. Parmi ces variantes, on trouve (Tableau 4) :

- La forme commune (la plus fréquente) comprenant la variante ostéoblastique qui représente 50% des cas, la variante chondroblastique 25% et la variante fibroblastique 25%
- L'ostéosarcome télangiectasique représentant 2 à 10% des ostéosarcomes, est caractérisé par des lésions purement lytiques et expansives à l'origine de fréquentes fractures pathologiques, et par un aspect multilobé à contenu hémorragique⁵⁷
- L'ostéosarcome à cellules géantes
- L'ostéosarcome à petites cellules rondes d'aspect radiographique hétérogène et d'aspect histologique proche des sarcomes d'Ewing
- L'ostéosarcome bien différencié intramédullaire caractérisé par un envahissement des parties molles absent ou limité et d'aspect histologique bien différencié.

3. Epidémiologie, étiologie et facteurs de risque

L'ostéosarcome est une tumeur rare puisque le nombre de nouveaux cas découverts chaque année en France est de 150 à 200. L'ostéosarcome est cependant la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente avec 4,8 nouveaux cas par an et par million de jeunes de moins de 20 ans aux Etats-Unis^{58,59}. Il constitue la troisième forme la plus commune de cancer chez les adolescents⁶⁰ et la seconde cause de décès par cancer dans cette tranche d'âge⁶¹. En effet, l'ostéosarcome survient entre 10 et 20 ans et touche entre une fois et demi et deux fois plus fréquemment les garçons que les filles. Un second pic d'incidence existe après 60 ans mais reste rare et généralement sur terrain prédisposé⁶². Au moment du diagnostic, environ 20% des patients présentent des métastases, le plus fréquemment (90%) au niveau des poumons, plus rarement au niveau osseux (8-10%) et dans les ganglions lymphatiques⁶³⁻⁶⁶. On évalue cependant que 80 à 90% des patients ont des micro-métastases indétectables au moment du diagnostic⁶⁷.

L'étiologie demeure à ce jour inconnue. Cependant, plusieurs constatations semblent intéressantes à souligner et sont développées ci-après.

3.1. Croissance et ostéosarcome

L'âge de survenue au moment de la poussée de croissance pubertaire, la localisation souvent métaphysaire de ces tumeurs proche de la plaque de croissance, l'incidence plus élevée chez les personnes de grandes tailles et particulièrement les garçons pour qui la croissance pubertaire est importante à rapprocher d'observations d'ostéosarcome plus fréquent chez les chiens de grande taille (saint-bernard, danois) suggèrent un lien entre le remodelage osseux associé à la croissance osseuse et la survenue de ces tumeurs⁶⁸.

3.2. Pathologies prédisposant à l'ostéosarcome

Les causes exactes de survenue de l'ostéosarcome restent inconnues, cependant certaines prédispositions peuvent être impliquées dans la pathogenèse et les phénomènes de résistances observés⁶⁹. Parmi ces prédispositions, on peut citer le syndrome de Li-Fraumeni qui correspond à l'anomalie innée de l'un des allèles du gène *p53*, l'enfant développant de multiples tumeurs aussi bien sarcomateuses (os et tissus mous) que carcinomateuses^{70,71}. Le rétinoblastome bilatéral (tumeur maligne oculaire bilatérale), lié à une mutation des deux allèles du gène *Rb*, est également prédisposant avec des ostéosarcomes s'observant cent fois plus fréquemment que dans la population générale⁷². Le syndrome de Rothmund-Thomson, lié à une mutation sur le chromosome 8, se caractérise par un risque accru d'ostéosarcome⁷³, des troubles cutanés et des anomalies osseuses congénitales. La maladie de Paget, associant des anomalies de l'architecture osseuse et une fibrose de la moelle, augmente également le risque de développer un ostéosarcome suite à une modification pathologique du remodelage osseux⁷⁴.

3.3 Anomalies cytogénétiques fréquentes

De manière générale, les ostéosarcomes se développent de façon sporadique et sont caractérisés par de multiples réarrangements génomiques (translocations, amplifications ou délétions) mais ces mutations ne sont pas récurrentes et semblent être la conséquence du processus oncogénique plutôt que la cause de la pathologie⁷⁵. Il n'existe pas de lésion cytogénétique spécifique reconnue comme pour le sarcome d'Ewing mais des

approches génomiques ont identifié un certain nombre d'altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire liées à la pathogenèse de l'ostéosarcome⁷⁶. Une fréquente atteinte des locus des gènes *p53* (environ 50% des patients)⁷⁷, *Rb* (70% des cas)⁷⁸, l'amplification de « *mouse double minute 2 homolog* » (MDM2, régulateur négatif de *p53*) et « *cyclin dependent kinase* » (CDK) 4, la surexpression de *c-MYC*⁷⁹, d'*AP-1*⁸⁰ et de *c-KIT*, la délétion de *TWIST*⁸¹ ou l'inactivation de *p16^{INK4A}*⁸² sont retrouvées. Chez la souris, la délétion de ces deux gènes dans les ostéoblastes induit le développement d'ostéosarcome⁸³. Le manque de données sur les mécanismes moléculaires rend difficile le diagnostic et le développement d'approches thérapeutiques ciblées mais la présence de ces altérations génétiques a pu être corrélée à l'agressivité des tumeurs et à la survie des patients^{76,79}.

4. Clinique

La principale manifestation clinique est la douleur au site tumoral pouvant irradier les articulations voisines. Une masse palpable peut apparaître plus tardivement, sensible à la palpation et pouvant gêner la mobilité de l'articulation suivant sa taille. A un stade plus tardif, des signes inflammatoires cutanés et une stase veineuse sont visibles. Certaines lésions de taille importante peuvent conduire à la fracture pathologique. L'augmentation du taux sérique de PAL est fréquente et est la conséquence de l'activité ostéoblastique de la tumeur.

5. Bilan para-clinique

5.1. Diagnostic positif

L'association de paramètres diagnostiques non radiologiques tels que l'âge, la localisation, la taille ou la partie de l'os atteinte, et de paramètres radiologiques permet d'orienter le diagnostic et guider l'attitude pratique (Figure 15).

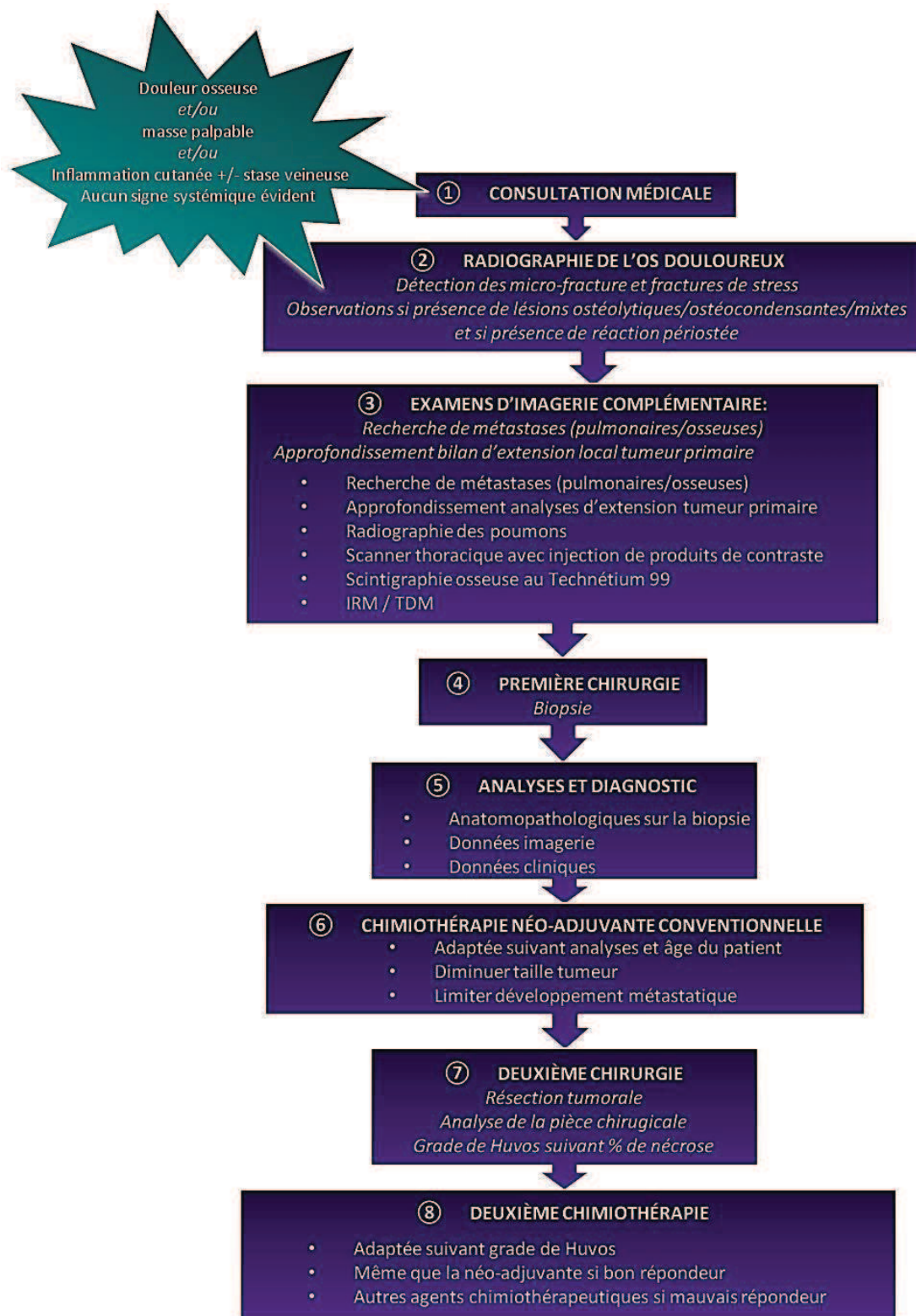


Figure 15 : Les différentes étapes du diagnostic et de la prise en charge de l'ostéosarcome

D'après la thèse d'Aude Ségaliny

La première étape doit donc naturellement être la radiologie conventionnelle. La radiographie révèle le plus souvent des signes de tumeur très agressive. Cette dernière peut être ostéolytique faisant disparaître les travées osseuses ou ostéocondensante. Elle est le plus souvent mixte (Figure 16).

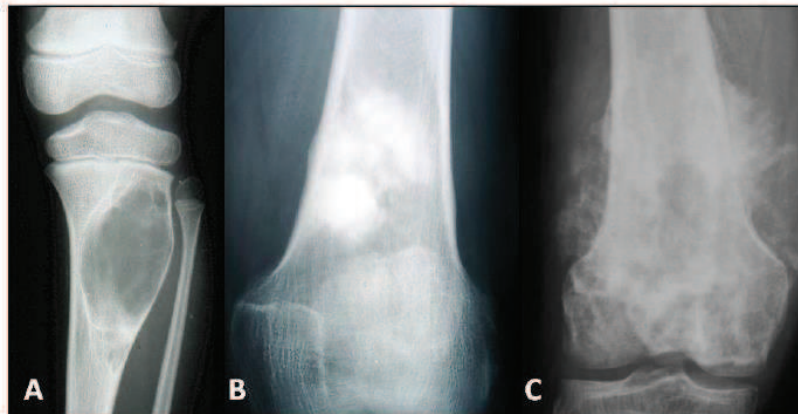


Figure 16 : Aspects radiologiques des différentes lésions osseuses associées à l'ostéosarcome

Clichés radiographiques des lésions osseuses associées au développement de l'ostéosarcome, obtenus par le Pr. François Guoin du service d'orthopédie du CHU Hôtel Dieu de Nantes, INSERM UMR957. A) Lésion ostéolytique, B) ostéocondensante, C) mixte avec ostéocondensations hétérogènes de la métaphyse et de l'épiphyse fémorale avec une ostéolyse de l'os cortical et la formation d'os ectopique péri-osseuse dans les parties molles.

Les réactions du périoste à la progression tumorale sont très fréquentes, présentant un aspect en « feux d'herbe » des spicules périostées divergents, et les appositions parallèles sont souvent rompues en leur centre par la rapide progression tumorale correspondant à « l'éperon de Codman ». L'envahissement des parties molles n'est évident que si la tumeur est calcifiée, sinon mieux précisé par le scanner ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM). L'aspect de la lésion souvent très évocateur du diagnostic doit conduire à compléter l'examen par d'autres techniques d'imagerie, de préférence avant la biopsie. Le scanner est particulièrement efficace dans l'étude des os courts et plats, apportant une aide précieuse dans des localisations difficiles à étudier. Il peut également améliorer l'analyse de la lésion pour les os longs.

Le patient est ensuite biopsié et le diagnostic est entièrement conditionné par le site de cette biopsie chirurgicale et le volume des fragments, et nécessite impérativement la transmission au laboratoire des informations cliniques et radiographiques et du compte rendu opératoire. Le pathologiste doit d'abord affirmer la malignité de la tumeur, reconnaître l'ostéoformation puis préciser la forme histologique. La tumeur associe

généralement une cellularité très importante et des anomalies cytologiques, un polymorphisme, une inversion du rapport nucléocytoplasmique, des mitoses abondantes et fréquemment anormales caractéristiques. Lorsque la lésion est mieux différenciée, les anomalies cytonucléaires peuvent être minimales voire absentes et ce n'est que l'examen attentif à la recherche de mitoses anormales et la corrélation aux données cliniques et radiographiques qui permettent d'établir le diagnostic. L'ostéoformation est facilement reconnaissable, sous forme d'os lamellaire constituant des travées de taille et d'épaisseur variables, d'agencement anarchique et directement bordé par les ostéoblastes tumoraux (Figure 17). Il est généralement demandé au pathologiste d'indiquer la forme anatomopathologique de la lésion mais également de la typer selon l'une des différentes classifications pronostiques existantes. La plus répandue est le grading de Broders qui comporte quatre degrés différents (I à IV) mais son intérêt apparaît restreint car la majorité des ostéosarcomes sont à classer comme grade III ou IV et sa valeur pronostique n'est pas significative⁸⁴.

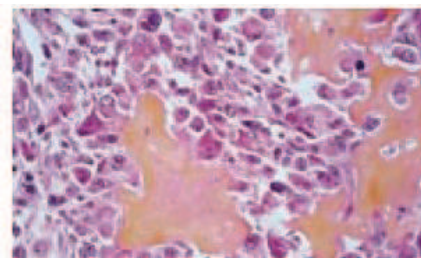


Figure 17 : Aspect histologique d'un ostéosarcome

Aspect typique d'un ostéosarcome, constitué d'ostéoblastes tumoraux aux anomalies cytonucléaires marquées, aux mitoses nombreuses, élaborant une substance ostéoïde formant deux épaissees travées qu'elles entourent. Coloration hémalum-éosine-safran (HES) grossissement x400. D'après Guinebretière JM *et al.*⁵⁶

Les analyses de sang ne sont pas nécessaires pour diagnostiquer l'ostéosarcome, mais elles peuvent aider à le confirmer ou le préciser. Par exemple, des niveaux élevés de PAL et de lactate déshydrogénase dans le sang laisseront supposer que l'ostéosarcome est plus avancé qu'il n'y paraît.

5.2. Diagnostic différentiel

a. Radiologique

Le diagnostic différentiel au stade radiographique se pose essentiellement avec d'autres lésions osseuses agressives et d'autres tumeurs malignes primitives telles que le

sarcome d'Ewing, de localisation cependant plus volontiers centrale, le fibrosarcome, le fibrohistiocytome malin ou le lymphome. Il peut également conduire à le confondre avec des formes initiales d'ostéomyélite, soulignant l'intérêt d'un prélèvement bactériologique systématique lors de la biopsie. La forme télangiectasique peut simuler un kyste osseux.

b. Anatomopathologique

La diversité des aspects histologiques de l'ostéosarcome complique le diagnostic et peut conduire à un large éventail de diagnostics différentiels. La forme de haut grade soulève cependant moins de difficultés diagnostiques que les formes bien différenciées. La corrélation entre images radiographiques et informations cliniques est indispensable pour que le pathologiste puisse porter son diagnostic avec le plus de certitude possible. A titre d'exemple, la variante ostéoblastique peut être confondue avec le cal fracturaire à un stade précoce en raison de la disposition anarchique de la substance ostéoïde néo-synthétisée. Une fois de plus, l'importance de la mise à disposition des données cliniques, de la radiographie et du compte rendu opératoire permet de limiter le risque de faux positifs. En cas de doute diagnostique, un délai d'observation d'une dizaine de jours sans aucun traitement permet d'apprécier l'évolution spontanée de la lésion. La variante chondroblastique est principalement confondue avec le chondrosarcome. L'âge, la localisation et l'aspect radiographique en complément de l'histologie sont essentiels au diagnostic. Le diagnostic difficile de cette pathologie est pour autant primordial, de manière à adopter la stratégie thérapeutique la plus adaptée.

5.3. Bilan d'extension

a. Local

Il repose sur l'IRM qui permet de bien délimiter la tumeur. La délimitation dans la moelle osseuse diaphysaire permet de choisir le niveau de la résection et de repérer d'éventuelles « skip-metastases » (séparées de la tumeur principale par du tissu normal) atteignant le plus souvent le même os mais parfois un autre proche. Le franchissement du cartilage de croissance et l'atteinte des parties molles et de la peau sont évalués. Les vaisseaux sont également analysés mais sont rarement envahis, d'ordinaire refoulés. La principale limite de l'examen est l'impossibilité de préciser si la tumeur qui va jusqu'au cartilage articulaire envahit l'articulation⁸⁵.

b. A distance

Il repose sur le cliché de thorax et le scanner qui reste l'examen de référence pour les métastases pulmonaires, en attendant une méthode plus performante, la chirurgie étant la meilleure chance de guérison des patients métastatiques au poumon.

6. Prise en charge

6.1. Traitement actuel

Le traitement actuel de l'ostéosarcome est multidisciplinaire et impose une prise en charge par une équipe spécialisée et habituée au traitement de ce type de tumeur. Le traitement actuel est généralement réalisé en trois phases : trois mois de chimiothérapie néoadjuvante, résection chirurgicale de la tumeur puis six mois de thérapie adjuvante dont la nature dépend du pourcentage moyen de cellules viables sur la pièce opératoire. L'appréciation de l'efficacité de la chimiothérapie néoadjuvante avant la chirurgie peut se faire sur les clichés standards et le scanner où une diminution de la masse tumorale, une meilleure limitation et plus d'ossification indiquent une bonne efficacité du traitement. L'étude de la pièce de résection permet d'apprécier la taille et l'extension de la tumeur, de juger de la qualité de l'exérèse chirurgicale et d'évaluer la réponse à la chimiothérapie. Elle nécessite que le pathologiste dispose de la biopsie initiale pour pouvoir comparer les aspects histologiques avant et après traitement. La tumeur hétérogène associe des zones blanchâtres, charnues ou dures lorsqu'elles sont ossifiées ou calcifiées, des plages bleutées cartilagineuses et des secteurs encéphaloïdes. Les remaniements sont nombreux et étendus, hémorragiques, kystiques et nécrotiques, qu'ils soient spontanés ou induits par le traitement. La tumeur occupe généralement toute la cavité médullaire, déforme la pièce osseuse, rompt très rapidement la corticale et envahit les tissus mous adjacents. Microscopiquement, la tumeur après chimiothérapie d'induction est parfois strictement inchangée, mais comporte le plus souvent d'importantes altérations à la fois cellulaires et architecturales. Les cellules tumorales viables sont volumineuses, aux noyaux irréguliers parfois multiples et aux cytoplasmes vacuolisés. Elles peuvent être isolées dans un tissu hyalin dense ou disposées en plage. L'ostéoformation est beaucoup plus importante après chimiothérapie. Le pathologiste apprécie la viabilité après chimiothérapie selon la méthode établie par Huvos⁵⁶. Le pourcentage de cellules résiduelles qui en découle sert à établir le

grade de Rosen (Tableau 5), classification histo-pronostique universellement reconnue qui permet de définir si un patient est bon ou mauvais répondeur.

Grade	Pourcentage de cellules tumorales viables
I	≥ 95 %
IIa	50 à 94 %
IIb	6 à 49 %
III	1 à 5 %
IV	0

Certaines équipes ont fixé le seuil séparant le grade II b du grade III à 10 %.

Tableau 5 : Classification pronostique de Rosen et Huvos selon le degré de réponse à la chimiothérapie

D'après Guinebretière JM et al.⁵⁶

La conservation du membre est possible chez la grande majorité des patients (plus de 90%) mais l'amputation reste la seule solution en cas de tumeur trop volumineuse envahissant les tissus mous avoisinants. La radiothérapie n'est que rarement utilisée du fait de la radiorésistance de ce type de tumeur. En ce qui concerne les agents de chimiothérapie, cinq antimétabolites sont actifs dans cette pathologie : le méthotrexate à hautes doses (MTX), la doxorubicine/adriamycine, le cisplatine, l'étoposide et l'ifosfamide⁸⁶. Les protocoles de chimiothérapie les plus utilisés depuis les années 1970 comportent tous du MTX à hautes doses associé à de l'acide folinique. La chimiothérapie associant plusieurs des molécules précitées est privilégiée. La combinaison des molécules de chimiothérapie, les doses et la fréquence des injections dépendent de l'âge du patient et des données histologiques de la biopsie qui déterminent la nature et le grade de l'ostéosarcome. La chimiothérapie postopératoire des patients présentant une mauvaise réponse histologique doit être différente de celle utilisée lors de la chimiothérapie d'induction. Dans les cas d'ostéosarcome métastatique pulmonaire, le traitement est identique à celui des formes localisées. Après la chirurgie de la tumeur primitive, l'exérèse chirurgicale des lésions pulmonaires est proposée dans la mesure où elle est techniquement réalisable.

6.2. Traitements en développement

Face aux taux de survie parfois médiocres (voir 7.2. ci-après) et aux nombreuses résistances aux chimiothérapies, le développement de nouvelles thérapies dans l'ostéosarcome est nécessaire. Les approches moléculaires visent à mieux comprendre le développement de cette pathologie ainsi que sa progression dans le but d'identifier de nouveaux marqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques. Parmi celles-ci, des approches de

« screening » à grande échelle ont permis de mettre en évidence des altérations génomiques et donc des cibles thérapeutiques potentielles dans l'ostéosarcome. A titre d'exemple, certaines études démontrent le réarrangement fréquent des gènes *APC*, *TWIST* et *MET*. Contrairement à d'autres types de cancers, ces gènes sont fréquemment délétés dans l'ostéosarcome et les altérations de ces trois gènes sont souvent combinées et corrélées à de mauvais pronostics et à une absence de réponse à la chimiothérapie^{81,87}.

Parmi les traitements en développement, différentes stratégies sont développées telles que le ciblage du microenvironnement tumoral, l'induction de l'apoptose ou encore l'inhibition de certaines voies de signalisation (Figure 18). Cette partie fait état de quelques-unes d'entre elles ainsi que de quelques essais cliniques les illustrant, résumés dans le tableau 6 en fin de section 6.2.

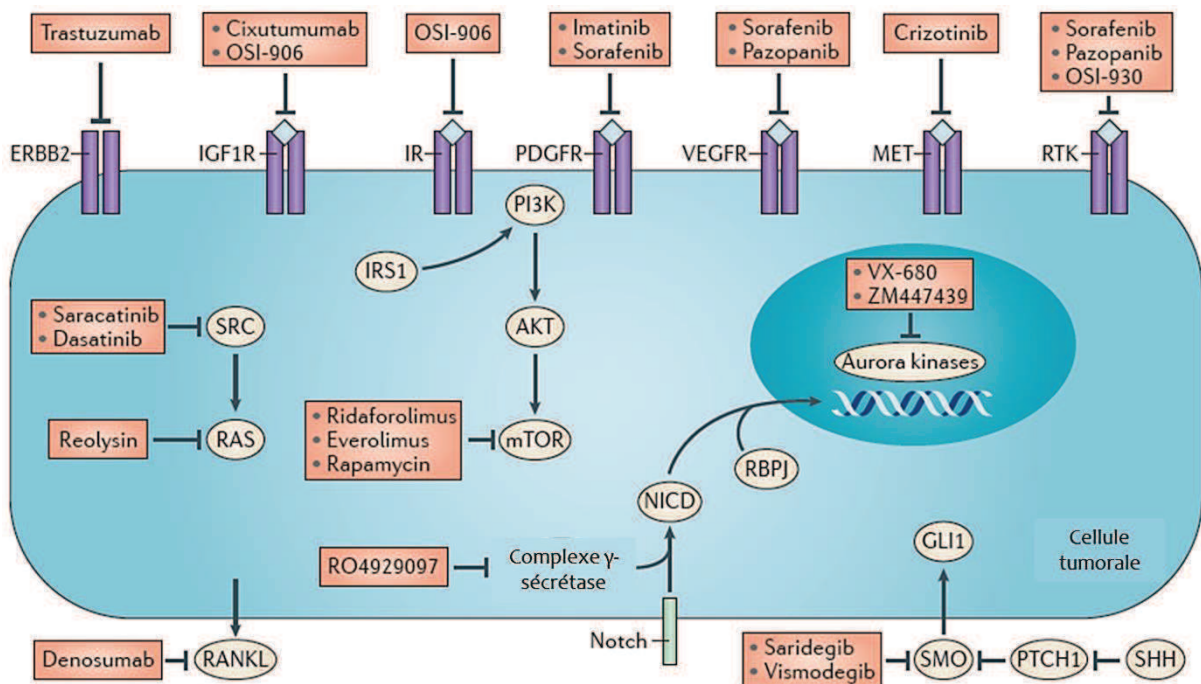


Figure 18 : Ciblage de certaines voies de signalisation dans l'ostéosarcome

Cibles moléculaires et drogues associées (en orange) à l'essai dans l'ostéosarcome. D'après Maya Kansara et al.⁸⁸

a. Ciblage du microenvironnement

L'ostéosarcome, se caractérisant par un déséquilibre de la balance entre ostéoformation et ostéorésorption, est capable de sécréter des cytokines stimulant les ostéoclastes et donc la résorption osseuse, soutenant alors la croissance tumorale grâce aux

facteurs libérés depuis la matrice osseuse dégradée. Certaines études démontrent qu'une forte expression de RANKL par les cellules tumorales est associée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante et une survie plus faible des patients⁸⁹. Le ciblage de l'ostéolyse associée à la tumeur semble donc être une cible thérapeutique intéressante. Les bisphosphonates, en tant que molécules prévenant la perte osseuse en inhibant le développement et la fonction ostéoclastique ont d'ailleurs démontré des effets intéressants sur l'inhibition de la croissance de certaines tumeurs, l'induction de l'apoptose, l'inhibition de la prolifération cellulaire et l'inhibition des expressions de « vascular endothelial growth factor » (VEGF) A et du récepteur au VEGF (VEGFR) 1. L'acide zolédronique testé chez la souris inhibe la croissance tumorale, le développement métastatique, prolonge la survie⁹⁰ et est capable d'induire la régression tumorale en association avec la chimiothérapie⁹¹. Les bisphosphonates ont également montré leur efficacité sur l'inhibition de l'angiogenèse induite par la tumeur dans un modèle d'ostéosarcome murin et inhibent l'expression de VEGFR2 par les cellules endothéliales⁹². Un essai clinique de phase II (ClinicalTrials.gov : NCT00586846) a permis de constater que le bisphosphonate pamidronate pouvait être associé en toute sécurité à la chimiothérapie et pouvait améliorer la durabilité de la reconstruction des membres après résection chirurgicale de l'ostéosarcome⁹³. Le rôle des bisphosphonates dans le traitement adjuvant de l'ostéosarcome fait actuellement l'objet d'une étude portant sur l'acide zolédronique en combinaison avec la chimiothérapie en France (ClinicalTrials.gov : NCT00691236).

b. Ciblage de la voie de signalisation Hedgehog, Notch et WNT

Les voies de signalisation physiologiquement impliquées dans le développement osseux telles que Hedgehog, Notch et WNT sont également impliquées dans le développement de l'ostéosarcome. Hedgehog est capable de signaler via le récepteur Patched ce qui permet de lever l'inhibition du récepteur smoothed entraînant donc l'activation des régulateurs transcriptionnels de la famille Gli (Figure 19).

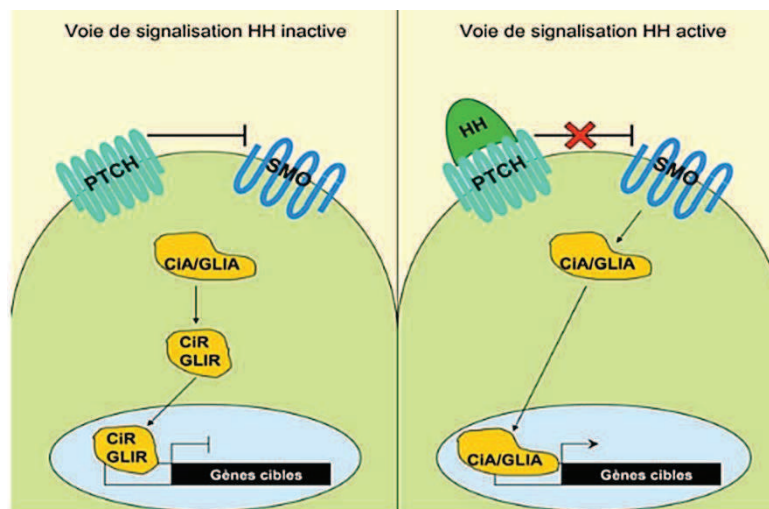


Figure 19 : Voie de signalisation Hedgehog/Gli

Lorsque la voie Hedgehog (HH) est inactive, le récepteur Patched (PTCH) inhibe la protéine membranaire Smoothened (SMO). Les facteurs de transcription activateurs CiA (drosophile) et GLIA (mammifères) sont localisés dans le cytoplasme. Ils y sont clivés pour former CiR et GLIR qui, une fois dans le noyau, vont réprimer l'expression des gènes cibles. Lorsque le ligand HH se fixe à PTCH, l'inhibition de SMO est levée. SMO va alors permettre à CiA et GLIA d'activer l'expression des gènes cibles de la voie.

Indian hedgehog, Patched1 et Gli1 sont hautement exprimés dans de nombreux ostéosarcomes⁹⁴. L'expression de Gli2, une cible de la voie de signalisation Hedgehog, est corrélée à un mauvais pronostic et son extinction par siRNA augmente la sensibilité des lignées cellulaires d'ostéosarcome à la chimiothérapie⁹⁵. L'expression des gènes Notch (*Notch1*, *Notch2* et *Notch3*) est associée à un phénotype métastatique plus agressif dans l'ostéosarcome⁹⁶. Un essai clinique de phase I et II (ClinicalTrials.gov : NCT01154452) en cours permet d'observer les effets de l'inhibition à la fois de Notch avec RO4929097 et de Hedgehog avec le vismodegib, un antagoniste compétitif de Smoothened. Dickkopf 3 ou WIF1 (« WNT inhibitory factor 1 »), deux antagonistes de la voie WNT dont l'expression est diminuée dans l'ostéosarcome, semblent également être des cibles intéressantes⁹⁷⁻⁹⁹. Toutefois, le ciblage des voies de signalisation Hedgehog, Notch et WNT peut être problématique chez les enfants, étant donné le rôle primordial de ces voies dans le développement du squelette.

c. Ciblage des récepteurs à activité tyrosine kinase

Différents récepteurs à activité tyrosine kinase ou leurs ligands tels que VEGF, « insulin like growth factor 1 » (IGF1), « platelet-derived growth factor » (PDGF), HER2 (ou

ERBB2) et MET sont surexprimés dans l'ostéosarcome. Des niveaux élevés de VEGF sont effectivement corrélés à une plus grande progression de l'ostéosarcome et des taux de survie plus faibles¹⁰⁰. Une récente étude de phase II (ClinicalTrials.gov : NCT00889057) utilisant le sorafenib, un inhibiteur des récepteurs à activité tyrosine kinase capable de cibler VEGFR2 et VEGFR3 dans les ostéosarcomes de haut grade non résécables induit des réponses durables¹⁰¹. PDGF et les récepteurs au PDGF (PDGFR) sont surexprimés dans 70 à 80% des ostéosarcomes¹⁰². Le pazopanib, un inhibiteur capable de cibler KIT, les récepteurs au VEGF, le récepteur au FGF (FGFR) et PDGFR est actuellement en essai clinique de phase II (ClinicalTrials.gov : NCT01759303). Enfin des thérapies ciblant l'IGF1R semblent intéressantes dans de nombreux cancers ainsi que dans l'ostéosarcome dans des études précliniques mais donnent des résultats limités dans l'essai clinique de phase II (ClinicalTrials.gov : NCT00831844)¹⁰³.

d. Ciblage des molécules de signalisation intracellulaire

Une activation aberrante de la kinase SRC est impliquée dans de nombreux cancers, notamment l'ostéosarcome. Des inhibiteurs de SRC ont démontré leur efficacité *in vitro* et *in vivo* notamment sur l'apoptose et la croissance tumorale. L'inhibiteur AZD0530 (saracatinib) est actuellement testé chez des patients atteints d'ostéosarcome métastatique (ClinicalTrials.gov : NCT00752206). mTOR semble également être une cible intéressante et fait l'objet d'un essai clinique international de phase III (SUCCEED : Sarcome Multi-Center Clinical Evaluation of the Efficacy of ridaforolimus, ClinicalTrials.gov : NCT00538239) ayant pour but de déterminer si la thérapie d'entretien avec cette molécule pendant une période prolongée chez les patients atteints de sarcomes des tissus mous ou osseux métastatiques répondant à la chimiothérapie, se traduira par une amélioration cliniquement significative de la survie sans progression.

e. Immunothérapies

Le rôle de l'inflammation dans le cancer apparaît complexe et bivalent et dépend du stade et du type de tumeur. Certaines cytokines inflammatoires peuvent être pro-tumorales et d'autres anti-tumorales. Les stratégies utilisées en immunothérapie regroupent diverses approches : utilisation de cytokines recombinantes, anticorps ciblant les cytokines ou leur récepteur, récepteurs solubles aux cytokines, molécules inhibitrices des voies de signalisation, etc. Les thérapies utilisant des anticorps monoclonaux sont de plus en plus envisagées dans le traitement des pathologies tumorales. Ces anticorps ciblant des

antigènes exprimés par les cellules tumorales peuvent être utilisés pour bloquer la signalisation de facteurs de croissance ou les interactions avec la MEC. De nombreuses cytokines impliquées dans la voie de signalisation RANK-RANKL, ou telles que l'IL-1, IL-6, IL-17 et le TGF- β jouent un rôle primordial à la fois dans la biologie osseuse et le système immunitaire et semblent donc être des cibles intéressantes. L'immunothérapie a récemment ouvert de belles perspectives thérapeutiques dans de nombreux types de cancer et paraît donc d'un grand intérêt dans l'ostéosarcome.

L'utilisation de mifamurtide en immunothérapie néoadjuvante est une des avancées principales dans l'ostéosarcome. Le mifamurtide est un analogue synthétique lipophile du muramyl dipeptide, le motif minimal de peptidoglycane commun aux bactéries Gram positives et négatives, capable d'activer le système immunitaire¹⁰⁴. Les monocytes et macrophages activés par le mifamurtide sont associés à une augmentation de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 dans le sérum ainsi qu'à l'engagement d'autres cellules immunitaires^{105,106}. L'utilisation du mifamurtide en complément de la chimiothérapie a démontré des effets positifs notamment en terme de survie des patients atteints d'ostéosarcome¹⁰⁷. Cependant, des avis mitigés de la communauté scientifique et clinique ont conduit à une approbation du mifamurtide uniquement par l'Union Européenne.

L'interféron (IFN) α a démontré son activité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo*¹⁰⁸⁻¹¹¹. Une étude récente de phase III (The European American Osteosarcoma Study Euramos ClinicalTrials.gov: NCT00134030) a permis d'étudier l'efficacité de l'IFN α pégylé en complément des agents de chimiothérapie standards dans le traitement des patients atteints d'ostéosarcome ayant montré une bonne réponse à la chimiothérapie pré-opératoire. Cet essai est le premier essai collaboratif transatlantique dans l'ostéosarcome et souligne l'importance de ce type de collaboration pour une progression plus rapide du traitement des maladies rares.

Des antigènes spécifiques de l'ostéosarcome sont difficiles à identifier. En effet, de nombreux antigènes exprimés dans l'ostéosarcome sont également retrouvés dans les tissus normaux¹¹²⁻¹¹⁵. Plusieurs essais cliniques ciblent cependant certains d'entre eux.

Enfin, une part importante de l'immunothérapie semble résider dans la restauration de la sensibilité des cellules tumorales au système immunitaire. Des inhibiteurs tels que l'ipilimumab, un anticorps monoclonal dirigé contre CTLA4 (« cytotoxic T lymphocyte antigen 4 »), et des anticorps monoclonaux dirigés contre PD1 et PDL1 semblent prometteurs^{116,117}.

Une association de ces thérapies de manière à restaurer la réponse des cellules tumorales au système immunitaire et à stimuler ce dernier pourrait conduire vers des résultats intéressants.

Cible	Traitement	Etude	Phase	Tumeur	Statut ou résultats
Ciblage du microenvironnement					
Ostéoclastes	Pamidronate	NCT00586846	II	11 métastatiques	EFS (5 ans) 45%
				29 non métastatiques	EFS (5 ans) 72%
Ostéoclastes	Acide Zolédronique (agent seul ou adjuvant)	NCT00691236	II et III	Haut grade	En cours
Ostéoclastes	Acide zolédronique et polychimiothérapie	NCT00470223	III	Ostéosarcome de haut-grade	En cours
Os	Samarium (153Sm-EDTMP)	NCT00245011	II	22 rechutes métastatiques	PFS (60 jours) 45% aucune amélioration démontrée
Os	Radium-223 Chloride	NCT01833520	I et II	Récurrent ou métastatique	En cours
Voies Notch et Hedgehog	RO4929097 et vismodegib	NCT01154452	I et II	Ostéosarcome récurrent	En cours
Ciblage des récepteurs à activité tyrosine-kinase					
VEGFR	Sorafenib	NCT00889057	II	35 rechutes non résécables	Taux de réponse 14% Taux de contrôle de la maladie 49%
KIT, VEGFR, FGFR et PDGFR	Pazopanib	NCT01759303	II	ostéosarcome primaire et métastatique	En cours
HER2	Trastuzumab	NCT00023998	II	96 ostéosarcomes métastatiques	aucune amélioration démontrée
IGF1R	Cixutumumab	NCT00831844	II	11 ostéosarcomes réfractaires ou rechute	activité de l'agent seul limitée
Ciblage des molécules de signalisation intracellulaire					
SRC	Saracatinib (AZD0530)	NCT00752206	II	Ostéosarcome récurrent localisations pulmonaires toutes réséquées	En cours
mTOR	Ridaforolimus	NCT00538239	II	ostéosarcome récurrent	2 réponses partielles
			III	tissus mous métastatiques ou ostéosarcome	PFS du groupe traité 17,7 comparé à 14,6 semaines et survie globale indifférente à 15 mois
RAF, VEGFR, KIT, mTOR	Sorafenib et everolimus	NCT01804374	II	Ostéosarcome en rechute et non résécable	En cours
Aurora kinase A	MLN8237	NCT01154816	II	Ostéosarcome récurrent	En cours
Inhibiteur d'histone deacetylase	Vorinostat	NCT01422499	II et III	Tumeurs pédiatriques incluant les ostéosarcomes	En cours
Immunothérapie					
Système immunitaire	Mifamurtide	NCT00631631	III	662 non métastatiques	EFS (6 ans) 70 à 78%
				91 métastatiques	Survie globale (5 ans) 40 à 53%
				205 récurrences métastatiques	Survie globale (2 ans) 45,9%
Système immunitaire	Interferon 2β pégylé	Pilote	III	19 non métastatiques	DFS (5 ans) 63%
Système immunitaire	Sagramostim inhalé (GM-CSF)	NCT00066365	II	1400 patients	En attente de résultats
Système immunitaire	Proleukin (IL-2) aerosol	NCT01590069	I et II	43 récurrences métastatiques pulmonaires	EFS (2 ans) 12,9% aucune amélioration démontrée
Système immunitaire	Ipilimumab (anticorps anti-CTLA4)	NCT01445379	I	métastases pulmonaires	En cours
Système immunitaire	Anticorps anti-GD2	NCT00743496	I	Ostéosarcome <20 ans	En cours
Système immunitaire	Anticorps anti-GD2	NCT00743496	I	Ostéosarcome en rechute ou réfractaire	En cours

Tableau 6 : Essais cliniques actuels et récemment terminés dans l'ostéosarcome

DFS (disease free survival) : survie sans maladie, EFS (event free survival) : survie sans événement, GD2 : disialyl ganglioside, GM-CSF : granulocyte macrophage colony stimulating factor, OS (overall survival) : survie globale, PFS (progression free survival) : survie sans progression. D'après Maya Kansara et al.⁸⁸

7. Suivi et pronostic

7.1. Surveillance et tolérance

Le suivi du patient est primordial et permet de vérifier l'efficacité du traitement, sa tolérance et de détecter d'éventuelles récurrences locales ou métastatiques. La surveillance comprend donc l'examen physique du site tumoral ainsi que l'évaluation des fonctions et des possibles complications successives à la reconstruction. L'imagerie locale et thoracique est essentielle et un suivi après la fin de la chimiothérapie est recommandé tel que suit : tous les 2-3 mois durant les deux premières années post-chimiothérapie, tous les 2-4 mois durant les troisième et quatrième années, tous les six mois durant les 5 à 10 ans post-chimiothérapie puis tous les 6 à 12 mois par la suite, à adapter aux pratiques locales et aux patients. Dans le cas des ostéosarcomes de bas grade, les intervalles peuvent être plus espacés¹¹⁸.

La chimiothérapie est associée à d'importants effets secondaires à court et long terme¹¹⁹. Les effets toxiques communs peuvent être asthénie, alopecie, modification des ongles, cytopénie, mucite, nausées, vomissements, diarrhées et infertilité, complications communes retrouvées pour la plupart des agents de chimiothérapie¹²⁰. Une attention particulière aux toxicités spécifiques de chaque agent de chimiothérapie doit être portée.

Le MTX est un agent chimiothérapeutique antifolique membre de la famille des anti-métabolites (analogue inhibiteur compétitif de la synthèse des nucléotides ou acides-aminés). Ses toxicités spécifiques sont une tératogénicité nécessitant une contraception efficace pendant la durée du traitement, une toxicité hépatique, une toxicité pulmonaire, une toxicité rénale et une hémato-toxicité (cytopénie). A titre d'exemple, le MTX induit un dysfonctionnement rénal chez 1,8% des patients et le taux de mortalité parmi ces patients est de 4,4%^{121,122}.

Le cisplatine est une chimiothérapie de la famille des sels de platine (agents alkylants de l'acide désoxyribonucléique (ADN)). Ses toxicités spécifiques sont l'insuffisance rénale, la polyneuropathie et la surdité par atteinte du nerf crânien VIII (vestibulo-cochléaire) rapportée chez 11% des patients¹²¹.

L'ifosfamide est un agent alkylant (créé des lésions de l'ADN et empêche la réplication). Il induit une toxicité vésicale (cystite hémorragique) et des cardiopathies dilatées.

La doxorubicine et l'étoposide appartiennent à la famille des inhibiteurs de la topoisomérase II (blocage d'une enzyme de conformation de l'ADN). Ils induisent des leucémies aiguës secondaires. La doxorubicine induit des cardiopathies dilatées.

Etant donné les nombreux effets secondaires induits par la chimiothérapie, celle-ci doit être adaptée aux patients après avoir évalué leurs fonctions physiologiques notamment rénales et cardiaques, et éventuellement après audiogramme dans le cas d'un traitement incluant des sels de platine. Des consultations avec des médecins spécialistes de la fertilité sont parfois mises en œuvre de manière à discuter des options disponibles (stockage de sperme par exemple).

7.2. Pronostic

Les taux de survie à 5 et 10 ans pour les patients ayant un ostéosarcome localisé sont respectivement d'environ 70 et 65%^{63,123,124} et restent inchangés depuis les deux dernières décennies⁶². Les taux de survie à 10 ans pour les patients métastatiques chutent à seulement 25%⁶⁶.

Les taux de survie à 5 ans des ostéosarcomes du pelvis vont de 27 à 47%⁶⁶ et le temps médian de survie de l'ostéosarcome de la colonne est de 10 à 38 mois^{63,125}.

30 à 40% des patients ayant un ostéosarcome localisé développent une récurrence locale ou distante¹²⁶. Environ 90% de ces récurrences sont des métastases pulmonaires détectées généralement dans les deux à trois ans¹²⁷⁻¹³⁰. La rechute cinq ans après le traitement initial est plus rare et touche 1 à 2% des patients¹³¹. La récurrence de l'ostéosarcome est de mauvais pronostic puisque les taux de survie à 5 ans sont de 23 à 29% (28 à 33% dans le cas des métastases pulmonaires)^{126,132,133}.

La résistance aux agents de chimiothérapie apparaît chez 35 à 45% des patients^{119,134}.

8. Importance de la niche osseuse dans l'ostéosarcome

8.1. Théorie du « seed and soil » de Paget (1889)

Il y a plus de cent ans, Paget a remarqué que si les tumeurs diffèrent par leur potentiel à métastaser, les organes diffèrent par leur potentiel à développer des métastases. Ces localisations métastatiques préférentielles suggèrent que certains organes produisent un environnement plus fertile à la croissance tumorale que d'autres. Paget a établi une

distinction claire entre les propriétés intrinsèques de la cellule tumorale et les propriétés de l'individu en faisant une analogie entre les tumeurs et les plantes. En effet, quand une plante produit des graines, celles-ci sont transportées dans de multiples directions mais ne peuvent germer que si elles tombent sur une terre convenable. L'étude de la « terre » est donc aussi importante que l'étude de la « graine ».

La théorie de Paget a ainsi permis de définir le concept de niche en tant que microenvironnement spécialisé favorisant l'émergence de cellules souches tumorales et fournissant tous les facteurs nécessaires à leur développement. Cette théorie est aussi bien applicable à la tumeur primitive qu'aux métastases. Elle souligne l'importance de la prise en considération de l'environnement tumoral au même titre que la tumeur pour développer de nouvelles thérapies.

8.2. Concept de niche

La niche se définirait comme une structure anatomique et fonctionnelle assurant la maintenance et la régulation des fonctions des cellules souches. Elle a également pour rôle de réguler la mobilisation des cellules souches en dehors de la niche. La niche a une architecture complexe et peut être composée de différents types cellulaires tels que les cellules mésenchymateuses et immunitaires, d'un réseau vasculaire, de facteurs solubles et des composants de la MEC. Ce concept a initialement été décrit dans le cadre du soutien de l'hématopoïèse normale par la niche ostéoblastique locale¹³⁵.

8.3. Application à l'ostéosarcome

a. Un environnement propice à la croissance tumorale

Le microenvironnement osseux est propice à la croissance tumorale puisqu'il dispose d'un important réseau vasculaire disponible pour alimenter la tumeur en nutriments. De plus, l'os dispose d'une architecture intéressante pour la cellule tumorale, mettant à sa disposition des cellules souches hématopoïétiques, un important réseau de cellules stromales, de nombreux facteurs de croissance, cytokines, chimiokines et composants de la MEC, ainsi que des CSM à différents stades de leur différenciation.

La tumeur est également capable de recruter et moduler les fonctions des plaquettes, des cellules myéloïdes, des cellules mésenchymateuses, des cellules immunitaires et des cellules nerveuses au sein de ce microenvironnement et induit la formation de

nouveaux vaisseaux. La moelle osseuse sert alors de réservoir idéal et est un sol fertile pour de nombreux cancers. Avec un microenvironnement hypoxique (1-7% d'O₂), la moelle osseuse constitue un microenvironnement idéal pour la croissance des cellules tumorales. L'hypoxie permet en effet à la tumeur de mieux résister à la chimiothérapie et de stimuler la néo-angiogenèse nécessaire à l'apport accru de nutriments et au processus métastatique (Figure 20).

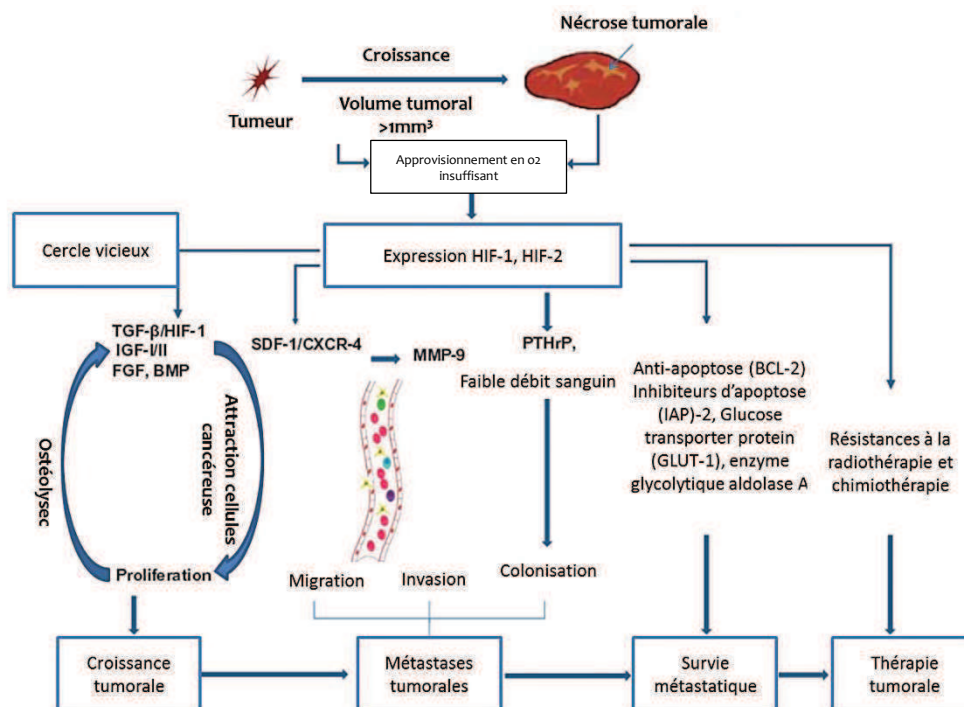


Figure 20 : Rôle de l'hypoxie dans le développement tumoral

D'après Wen Zeng *et al.*¹³⁶

Les CSM sont également une cible des cellules tumorales, capables de réguler la différenciation ostéoblastique. Elles sont recrutées par la tumeur et deviennent des fibroblastes associés à la tumeur qui stimulent la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et le développement métastatique mais également la croissance tumorale¹³⁷⁻¹⁴⁰.

Les cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuse (incluant les macrophages, les monocytes, les cellules suppressives dérivées myéloïdes (MDSCs), les cellules dendritiques et les ostéoclastes) et les lymphocytes sont recrutés par la tumeur et peuvent promouvoir la croissance tumorale, particulièrement dans cet environnement hypoxique¹⁴¹⁻¹⁴³. Les MDSCs sont fréquemment recrutées par les cellules cancéreuses afin de supprimer la surveillance du système immunitaire¹⁴⁴. Il a été démontré récemment que ces MDSCs peuvent répondre à

RANKL et former des ostéoclastes matures de manière à promouvoir l'ostéolyse dans un modèle murin de cancer du sein et myélome¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. De plus, les progéniteurs myéloïdes sont également mobilisés par différents cancers de manière à initier des niches métastatiques dans d'autres organes comme les poumons. La différenciation et l'activité ostéoclastique peuvent être induites par les cellules tumorales via le relargage de différents facteurs dans le microenvironnement. Les lymphocytes B et T sont capables de réguler la balance OPG/RANKL et peuvent donc participer à l'emballement de la pathologie notamment via leur impact sur le remodelage osseux s'ils entrent sous le contrôle des cellules tumorales. Il est certain qu'avec leur potentiel régulateur du remodelage osseux, les lymphocytes sont une cible de choix pour les cellules cancéreuses de manière à créer des conditions permissives, en particulier sur les sites de lésions ostéolytiques. De manière intéressante, les cellules pro-inflammatoires TH17 CD4+ sécrètent RANKL, le TNF α et le TGF- β , tous capables d'activer les ostéoclastes et de promouvoir la résorption osseuse^{148,149}, permettant ainsi la croissance tumorale et l'alimentation du cercle vicieux.

Les cellules souches hématopoïétiques sont également capables d'affecter le potentiel de différenciation des cellules mésenchymateuses en libérant des facteurs pro-ostéoblastiques tels BMP-2 et -6¹⁵⁰ et constituent ainsi une autre cible intéressante pour les cellules tumorales.

Les plaquettes constituent une source importante de VEGF (pro-angiogénique) et sont donc détournées par les cellules tumorales pour induire la néo-angiogenèse.

Enfin, la MEC elle-même est source de nombreux facteurs ostéolytiques et pro-tumoraux que les cellules tumorales peuvent libérer de manière à stimuler cette niche pro-tumorale. Les membres de la famille des MMP, hautement impliqués dans les phénomènes de migration et d'invasion, ainsi que les facteurs de croissance tels que le TGF- β sont des cibles clés des cellules tumorales et leur libération anarchique au sein du microenvironnement tumoral conduit à l'emballement de la pathologie¹⁵¹.

Outre le rôle clé de la niche dans la croissance tumorale, le microenvironnement osseux favorise la résistance des tumeurs aux thérapies¹⁵². La résistance des cellules tumorales à l'apoptose induite par la chimiothérapie et leur protection face aux inducteurs physiologiques de mort sont notamment médiées par des facteurs solubles et des mécanismes d'adhésion cellulaire¹⁵³. Dans ce cadre, la moelle osseuse produit SDF1

(« Stromal Cell-Derived Factor 1 ») et l'IL-6 qui favorisent le « homing », la survie et la prolifération des cellules tumorales.

Le microenvironnement osseux constitue donc un environnement propice à la croissance tumorale. La tumeur, disposant de nombreuses cellules souches, des cellules osseuses et immunitaires ainsi que des nombreux facteurs contenus dans la MEC, peut organiser une niche propice à son développement et rend ainsi la « terre » plus fertile. Beaucoup de ces observations ont été rapportées au sujet des métastases osseuses successives aux carcinomes. Ces propriétés du microenvironnement osseux sont tout autant détournées par les ostéosarcomes, avec la particularité que ces tumeurs d'origine mésenchymateuse s'apparentent à des ostéoblastes, renforçant ainsi les interactions avec le microenvironnement osseux. De plus, en tant que tumeur d'origine mésenchymateuse, l'ostéosarcome est déjà à un stade avancé dans le processus métastatique, n'ayant pas à subir d'EMT.

b. Cas particulier des cellules souches cancéreuses (CSC)

Il devient de plus en plus évident que les tumeurs sont composées de populations hétérogènes organisées hiérarchiquement dont les CSC représentent le haut de la pyramide. Cette fraction de cellules tumorales partage de nombreuses similitudes avec les cellules souches standards telles que la capacité d'autorenouvellement et les propriétés de différenciation vers de multiples lignées¹⁵⁴. Les CSC sont peu nombreuses au sein d'une tumeur mais présentent un fort potentiel tumorigène. Le plus grand problème posé par ces cellules est leur résistance aux traitements conventionnels qui pourrait être la cause de récurrences tumorales^{155,156}. Les CSC semblent dépendre d'un environnement permissif, la niche, capable de maintenir leur propriété d'autorenouvellement et leur statut indifférencié¹⁵⁷. Ce microenvironnement est également capable de générer de nouvelles CSC en induisant la dédifférenciation de cellules tumorales non souches¹⁵⁸. La niche osseuse pourrait donc maintenir des cellules tumorales à un stade quiescent. En protégeant les CSC des diverses agressions génotoxiques, la niche contribue à leurs résistances aux thérapies^{159,160}. Certaines études suggèrent l'existence de CSC dans l'ostéosarcome¹⁶¹⁻¹⁶⁵. Il a récemment été observé que l'hypoxie, phénomène important dans cette pathologie, régule la sous-population de CSC et maintient les tissus dans un état de « souchitude »¹⁶⁶⁻¹⁶⁹. Il a également été démontré que les zones d'hypoxie au sein de la tumeur peuvent servir de niches aux CSC et que les conditions hypoxiques aident à la reprogrammation cellulaire

notamment la génération de cellules souches pluripotentes induites¹⁷⁰. La pression en oxygène et le microenvironnement semblent cruciaux dans le développement des cancers. Cibler ce microenvironnement hypoxique pourrait conduire vers de nouvelles stratégies thérapeutiques pour notamment éliminer les CSC¹⁷¹⁻¹⁷⁴.

c. Cercle vicieux entre prolifération tumorale et ostéolyse

La croissance des cellules tumorales entraîne une dérégulation de l'équilibre qui s'instaure entre ostéoformation et ostéorésorption et donc le dialogue existant entre les cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes). Les cellules tumorales modifient également la vascularisation et altèrent l'immunité locale, ce qui favorise leur survie, leur croissance et leur dissémination. Un cercle vicieux s'établit alors entre le microenvironnement osseux et la progression tumorale via le relargage de différents facteurs¹⁷⁵ (Figure 21).

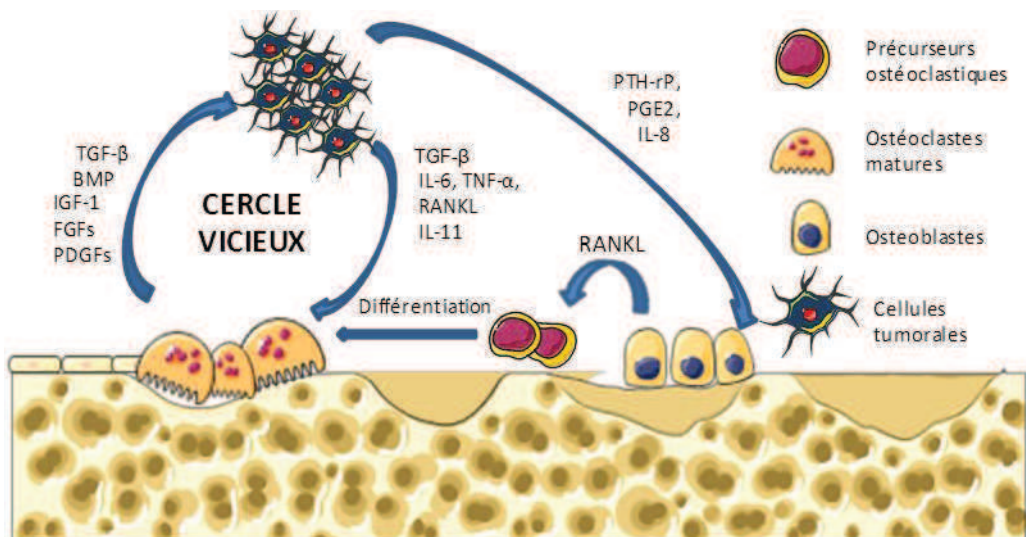


Figure 21 : Cercle vicieux entre prolifération tumorale et ostéolyse

Les cellules cancéreuses sécrètent des facteurs pro-ostéoclastiques¹⁷⁶ dont des cytokines (IL-1, IL-6, TNF α etc.), des hormones (« Parathyroid Hormone-related Protein » (PTHrP) capable de promouvoir la différenciation, l'activation et la survie des ostéoclastes en induisant la production de RANKL par les ostéoblastes), des facteurs de croissance (TGF- β), mais aussi des facteurs pro-ostéoblastiques tels les BMP, IGF et WNT. Ces facteurs induisent une dérégulation de la balance formation/résorption osseuse et modifient de ce fait le remodelage osseux. Le développement de l'ostéosarcome induit ainsi la formation d'os ou de substance ostéoïde mais également une ostéolyse maligne qui résulte d'une hyperactivité

ostéoclastique. L'action de ces différents facteurs sur les ostéoclastes peut être directe ou indirecte via les ostéoblastes produisant la cytokine RANKL qui permet d'activer les ostéoclastes grâce au récepteur RANK. Les ostéoclastes, à leur tour, en résorbant la matrice osseuse, libèrent des facteurs de croissance piégés dans la MEC (TGF- β , IGF-1) capables ensuite d'activer la prolifération ou d'autres fonctions pro-tumorales.

Ce cercle vicieux qui s'opère entre les cellules tumorales et les cellules osseuses au sein du microenvironnement osseux participe à l'emballement du système et à l'alimentation des fonctions pro-tumorales de l'ostéosarcome et semble donc être une cible thérapeutique intéressante dans cette pathologie.

III. TGF- β

1. Présentation

La grande famille du TGF- β regroupe des cytokines structurellement conservées et présentes chez les vertébrés et invertébrés. Cette superfamille comprend les TGF- β s, les BMPs, les activines, les inhibines et les hormones anti-mülleriennes (Figure 22).

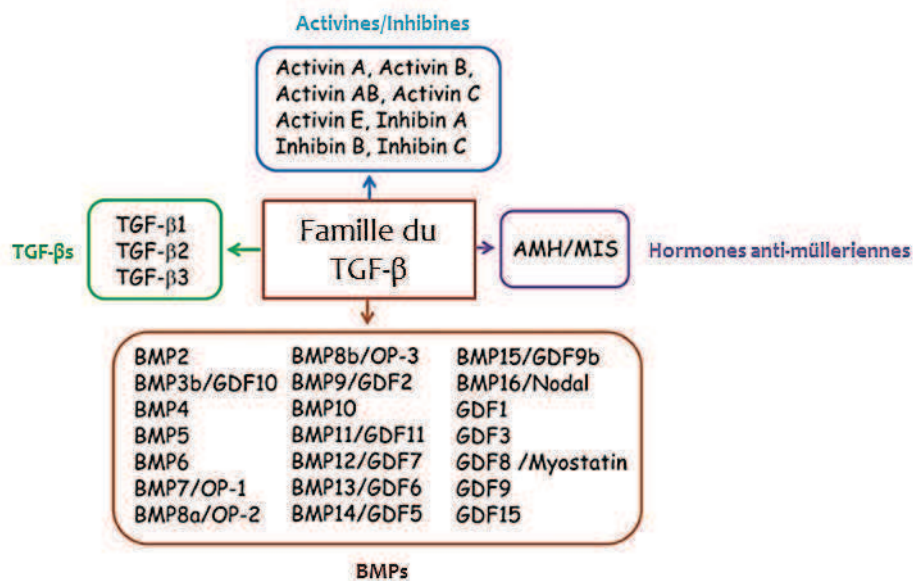


Figure 22 : Représentation schématique de la superfamille du TGF- β

D'après Juan F. Santibañez *et al.*¹⁷⁷

Ces membres jouent des rôles importants dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et l'embryogenèse. Chez les mammifères, la famille du TGF- β regroupe les TGF- β 1, - β 2 et - β 3, ayant de nombreuses homologies mais des fonctions différentes. Le TGF- β 1 est le plus abondant des isoformes, majoritairement contenu dans les plaquettes (20 mg/kg) et l'os (200 μ g/kg). Ce facteur de croissance ubiquitaire est hautement régulé dans sa synthèse, son activation et sa voie de signalisation. Le TGF- β est initialement synthétisé en tant que précurseur de 390 acides aminés puis clivé et dimérisé formant un peptide mature de 112 acides aminés. Il est sécrété sous forme de TGF- β latent et stocké dans la MEC depuis laquelle il sera activé par différents processus et libéré sous sa forme mature de manière à agir via ses récepteurs.

2. Activation

Le TGF- β est contenu dans les tissus sous forme de TGF- β latent et c'est l'activation de ce dernier, par conversion en TGF- β actif, qui constitue le tout premier niveau de régulation de sa voie de signalisation (Figure 23).

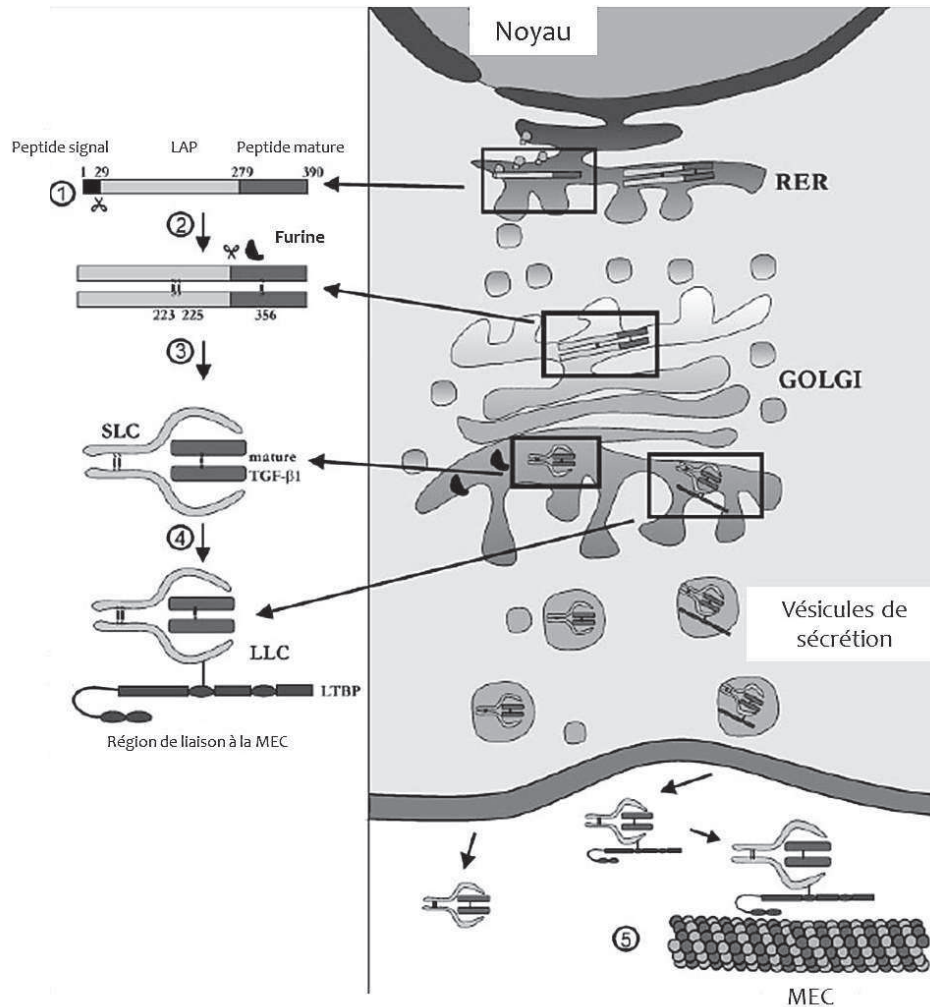


Figure 23 : Premières étapes de l'activation du TGF- β

D'après Katrien Janssens et al.¹⁷⁸

Les TGF- β 1, - β 2 et - β 3 sont synthétisés en tant que pro-protéines homodimériques (proTGF- β) d'une masse de 75kDa. Le TGF- β mature, dimère de 24 kDa, est en général associé au propeptide dimérique « latency associated protein » (LAP), duquel il sera clivé dans le trans-Golgi. L'association non covalente successive du TGF- β mature au LAP forme le « small latent complex » (SLC) capable de lier la « latent-TGF- β binding protein » (LTBP) par des ponts disulfure établis entre des résidus cystéine spécifiques de ces deux derniers. L'association

SLC-LTBP forme ainsi un « large latent complex » (LLC). Sous sa forme LLC, le TGF- β ne peut pas interagir avec ses récepteurs. La première étape de l'activation du TGF- β consiste donc en la libération du TGF- β du LLC généralement lié de manière covalente aux protéines de la MEC via le LTBP (Figure 24)¹⁷⁹.

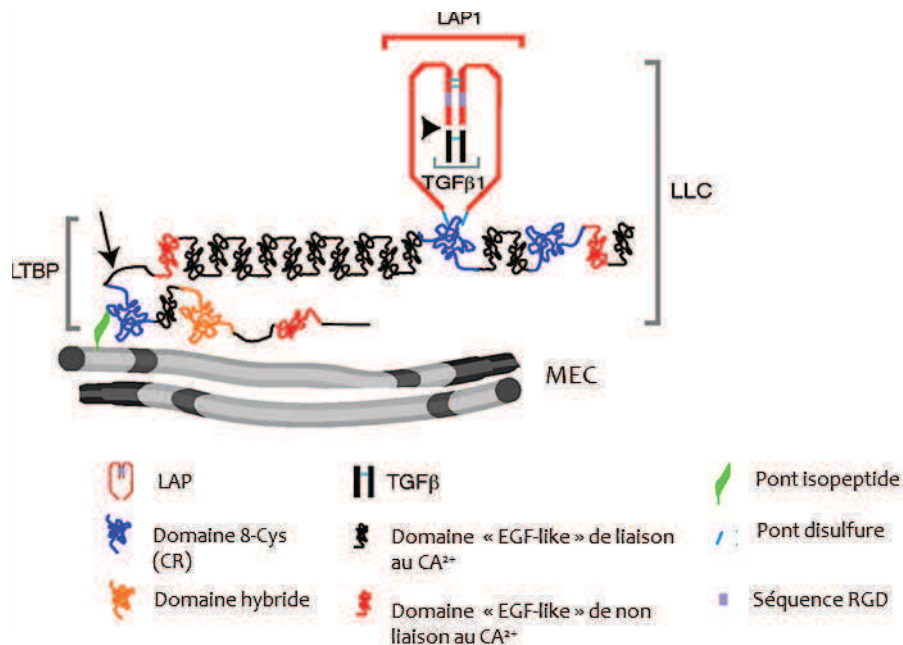


Figure 24 : Le TGF- β latent

D'après Justin P. Anne, John S. Munger et Daniel B. Rifkin¹⁷⁹

Différents activateurs du TGF- β latent sont connus tels les protéases, TSP-1, l'intégrine $\alpha\text{V}\beta_6$, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou le pH acide. Un des points communs de ces activateurs est leur capacité à répondre aux perturbations de la MEC, permettant ainsi au TGF- β de jouer son rôle dans l'homéostasie de cette matrice.

Différents facteurs sont capables d'activer le TGF- β . Les protéases dont la plasmine, MMP-2 et MMP-9, sont des enzymes impliquées dans la dégradation de la MEC¹⁸⁰ et permettent par ce biais l'activation du TGF- β , conduisant au maintien de l'intégrité et de la stabilité de cette matrice^{181,182}. La protéine matricellaire TSP-1 active également le TGF- β latent par interaction directe avec LAP^{183,184}. Le TGF- β peut également être activé en réponse à la blessure ou l'inflammation et stimuler ainsi la cicatrisation grâce à l'augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha\text{V}\beta_6$ ^{185,186,187}. Le TGF- β peut également être activé au cours de l'inflammation et de l'apoptose liée à la production de ROS. Enfin, le pH acide généré par les

ostéoclastes durant la résorption osseuse permet d'activer le TGF- β latent contenu en grande quantité dans la matrice osseuse¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

3. Voies de signalisation

3.1. Voie de signalisation par les Smads

La liaison du TGF- β à ses récepteurs présents à la surface cellulaire induit la cascade de signalisation par les Smads, voie spécifique du TGF- β , également appelée voie canonique (Figure 25).

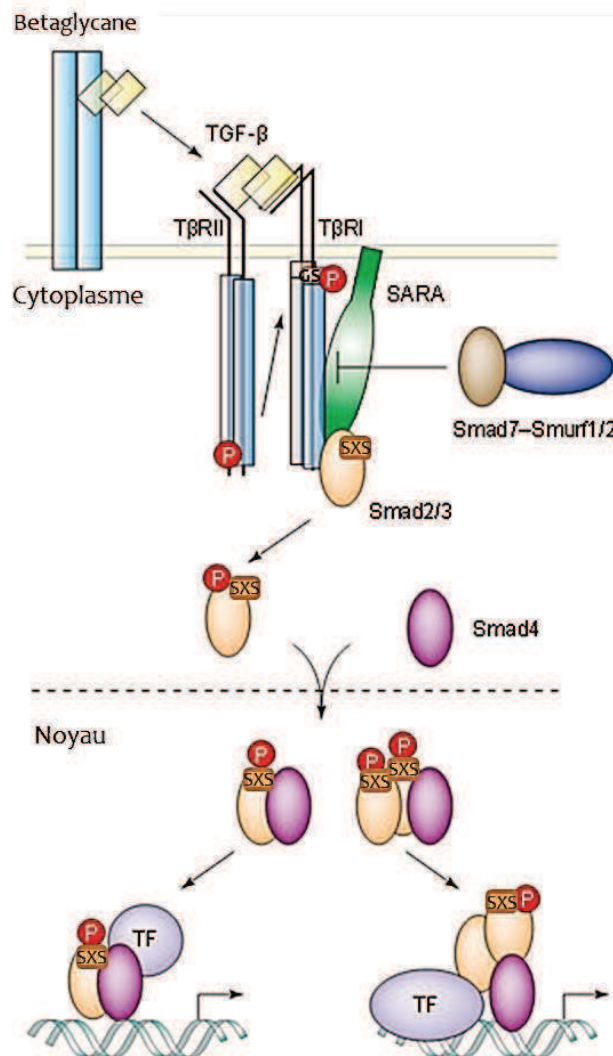


Figure 25 : Voie de signalisation canonique du TGF- β par les Smads

D'après Peter ten Dijke et Caroline S. Hill¹⁹¹

L'arrangement dimérique du TGF- β actif, stabilisé par des interactions hydrophobes et souvent renforcé par des ponts disulfure, suggère la formation d'un complexe avec deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II ($T\beta$ RI et $T\beta$ RII pour « TGF- β receptor » I et II) au moment de la liaison ligand-récepteurs. L'accès du ligand à ses récepteurs est régulé par une large famille de protéines (figure 26).

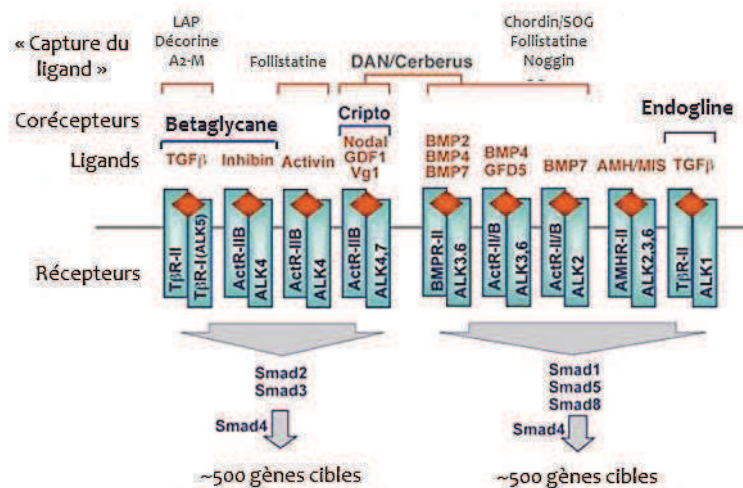


Figure 26 : Relations schématiques entre les ligands de la famille du TGF- β et les acteurs régulant l'accès à leurs récepteurs chez les vertébrés

D'après Yigong Shi et Joan Massagué¹⁹²

Ce processus est hautement régulé par deux classes de molécules aux fonctions opposées. Une classe comprenant un groupe de protéines solubles capables de séquestrer le ligand et ainsi d'empêcher son accès aux récepteurs membranaires. L'autre classe comprend des protéines agissant comme des adaptateurs ou corécepteurs pour l'interaction ligand-récepteur. Parmi elles, le récepteur de type III au TGF- β ($T\beta$ RIII), ancré à la membrane, permet la liaison du TGF- β à $T\beta$ RII^{193,194}.

Les récepteurs auxquels se fixe le TGF- β sont des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase. Chez l'homme, il existe sept récepteurs de type I et cinq récepteurs de type II, tous dédiés aux voies de signalisation de la famille du TGF- β ¹⁹⁵. Ces deux types de récepteurs ont des séquences de 500 acides aminés organisées comme suit :

- un domaine N-terminal extracellulaire permettant la liaison au ligand
- une région transmembranaire
- un domaine C-terminal à activité sérine/thréonine kinase.

Le TGF- β a une haute affinité pour son récepteur de type II et ne peut pas agir avec le récepteur de type I à l'état isolé¹⁹⁴. Le TGF- β se lie donc tout d'abord au récepteur de type II, cette liaison permettant le recrutement et l'incorporation du récepteur de type I au sein du complexe ligand-récepteur. Ce complexe ligand-récepteur comprend le ligand dimérique et les deux récepteurs à l'état d'hétérotétramère (deux homodimères). La liaison du ligand à ses récepteurs induit la proximité des deux récepteurs et des changements conformationnels de leurs domaines intracellulaires facilitant ainsi la phosphorylation du récepteur de type I sur sa séquence caractéristique « SGSGSG », appelée domaine GS. En effet, T β RII est constitutivement actif et phosphoryle ces multiples résidus sérine et thréonine au niveau du domaine GS de T β RI, entraînant son activation¹⁹⁴.

Les médiateurs impliqués dans cette voie de signalisation en aval de l'activation des récepteurs sont les protéines Smads. Il existe huit protéines Smads divisées en trois classes fonctionnelles:

- les R-Smads (Smad 1, 2, 3, 5 et 8) ou « receptor-regulated Smad », directement phosphorylées et activées par le récepteur de type I
- le Co-Smad (Smad 4) ou « co-mediator Smad »
- les I-Smad (Smad 6 et 7) ou « inhibitory Smad » régulant négativement la voie de signalisation.

Les R-Smads et Co-Smad comprennent 500 acides aminés et contiennent deux domaines structurellement conservés, le domaine N-terminal « MAD homology » (MH) 1 et le domaine C-terminal MH2 (Figure 27). Le domaine MH1 contient une séquence de liaison spécifique à l'ADN. La séquence N-terminale des I-Smads contient des homologues au domaine MH1 des R-Smads mais n'est pas capable de lier l'ADN. Le domaine MH2 est quant à lui très conservé entre toutes les protéines Smad et est responsable de l'interaction avec les récepteurs, de la formation de complexes Smads et du contact avec le pore nucléaire pour la navette nucléocytoplasmique. Les domaines MH1 et MH2 interagissent avec un grand nombre de protéines du noyau de manière à réguler la transcription. Les R-Smad contiennent un motif de deux résidus sérine SXS caractéristique dans leur domaine MH2 C-terminal sur lequel a lieu la phosphorylation responsable de leur activation.

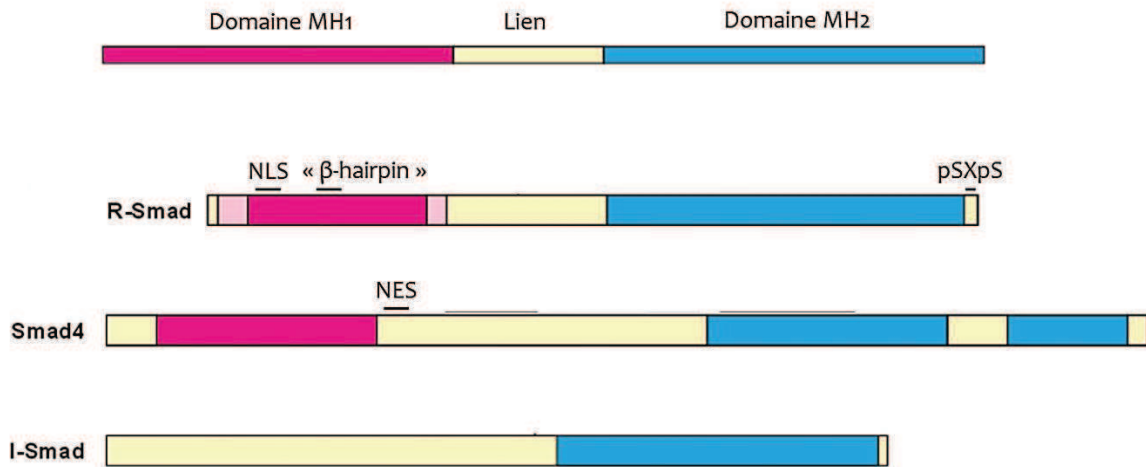


Figure 27 : Structure des Smads

Schématisation des domaines MH1 (rose) et MH2 (bleu) conservés et des domaines non conservés (jaune) des protéines Smads. « β -hairpin » : liaison à l'ADN, NES (nuclear export signal) : signal d'export nucléaire, NLS (nuclear localization signal) : signal de localisation nucléaire, pSXpS : phosphorylation du motif SXS C-terminal des R-Smads. D'après Peter ten Dijke et Caroline S. Hill¹⁹¹

La reconnaissance des R-Smads par les récepteurs est facilitée ou inhibée par des protéines auxiliaires. A titre d'exemple, Smad2 et Smad3 peuvent être spécifiquement immobilisées à proximité de la surface cellulaire par le « Smad anchor for receptor activation » (SARA) permettant un recrutement plus efficace de Smad2 ou Smad3 aux récepteurs pour phosphorylation¹⁹⁶.

La phosphorylation du R-Smad sur le motif SXS déstabilise l'interaction avec SARA, permettant la dissociation du R-Smad des récepteurs et l'exposition de son domaine MH2 responsable de l'import nucléaire¹⁹⁷. Une portion du domaine MH2 agirait en effet comme un signal de localisation nucléaire^{198,199}, cette activité étant dépendante de la phosphorylation^{200,201}. Un mécanisme alternatif à l'import et l'export nucléaire de Smad2 et 3 réside dans la capacité du domaine MH2 à lier directement des composants du pore nucléaire tels les nucleosporines CAN/Nup214 et Nup153²⁰². De plus, la phosphorylation de R-Smad augmente son affinité pour Smad4. Le complexe R-Smad-Smad4 s'accumule alors dans le noyau²⁰³⁻²⁰⁵.

Smad 4 et toutes les R-Smad à l'exception de Smad2 lient l'ADN sur une séquence spécifique appelée « Smad binding element » (SBE). Cette séquence contient le motif minimal de quatre paires de bases « CAGA »²⁰⁶⁻²⁰⁹. La stimulation des cellules au TGF- β

entraîne la régulation, positive ou négative, de l'expression de centaines de gènes²¹⁰ dont de nombreux gènes de la matrice extracellulaire¹⁸². L'activation ou la répression de l'expression génique utilise cependant le même ensemble de protéines Smads activées suggérant le recrutement de coactivateurs et corépresseurs transcriptionnels dépendant de chaque type cellulaire et des conditions affectant la cellule au moment de la stimulation²¹¹. Les protéines Smads doivent coopérer avec d'autres protéines capables de lier l'ADN de manière à augmenter leur spécificité dans cette liaison. Ces facteurs peuvent être ubiquitaires et médier la même réponse dans tous les types cellulaires ou peuvent être spécifiques d'un type cellulaire permettant ainsi des réponses transcriptionnelles spécifiques. De nombreux membres de différentes familles de protéines capables de lier l'ADN tels que Fast1, Mixer, Jun/Fos, Runx, CREBP, E2F, CBP, p300, AR105 ou Smif sont des partenaires transcriptionnels des Smads²¹²⁻²¹⁷. Parmi les régulateurs négatifs de la fonction transcriptionnelle des Smads, citons les exemples de c-Ski et SnoN, deux membres très conservés de la famille Ski. c-Ski et SnoN sont capables d'antagoniser la voie de signalisation du TGF- β via des interactions directes avec Smad4 et les R-Smads^{218,219}, empêchant par exemple la formation du complexe R-Smad-Smad4²²⁰⁻²²².

De nombreux autres facteurs et processus peuvent également réguler la voie de signalisation du TGF- β , en jouant notamment sur la présence et la disponibilité des récepteurs à la membrane. Ceci est notamment le cas pour la métalloprotéinase ADAM17 capable de diminuer le niveau de T β RI à la membrane et ainsi d'atténuer l'activation de Smad3 ou encore de la métalloprotéinase ADAM12 capable de faciliter l'activation de la voie de signalisation du TGF- β par son interaction avec T β RII^{223,224}.

La déphosphorylation et l'ubiquitination responsable de la dégradation des R-Smads par le protéasome sont deux mécanismes permettant l'arrêt de la signalisation par les Smads. Le « Smad ubiquitination regulatory factor » (Smurf) 2 est le principal médiateur de l'ubiquitination de Smad2²²⁵. L'ubiquitination de Smad3 est quant à elle médiée par le complexe SCF/Roc1²²⁶. Smurf1 et 2 sont également capables d'entraîner l'ubiquitination des récepteurs au TGF- β activés, entraînant leur dégradation par le protéasome^{227,228}. Cependant, l'ubiquitination est un processus réversible notamment grâce aux déubiquitinases et certaines de ces enzymes participent à la régulation de la voie du TGF- β en empêchant la dégradation des récepteurs. Ceci est notamment le cas de l'« ubiquitin specific peptidase 15 » (USP15) qui stabilise T β RI à la membrane²²⁹.

L'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β est médiée par le Smad inhibiteur Smad7. Smad7 est capable d'inhiber la phosphorylation de R-Smad en entrant en compétition avec cette dernière pour la liaison à T β RI activé. Il est également capable de recruter le complexe GADD34 au niveau de T β RI activé, favorisant ainsi sa déphosphorylation et donc son inactivation²³⁰. Enfin, Smad7 est capable de recruter les E3-ubiquitine-ligases Smurf1 et 2. Le complexe Smad7-Smurf est alors capable de se lier à T β RI et donc d'empêcher la phosphorylation de R-Smad^{231,232} ou de stimuler directement l'ubiquitination, donc la dégradation du récepteur^{227,228}. De manière intéressante, le TGF- β lui-même est capable d'activer la transcription de Smad7, responsable d'un rétrocontrôle négatif de la voie.

3.2. Voies de signalisation non canoniques

Bien que la voie de signalisation du TGF- β est principalement médiée par les Smads, le TGF- β peut également activer d'autres voies de signalisation appelées voies non canoniques (Figure 28).

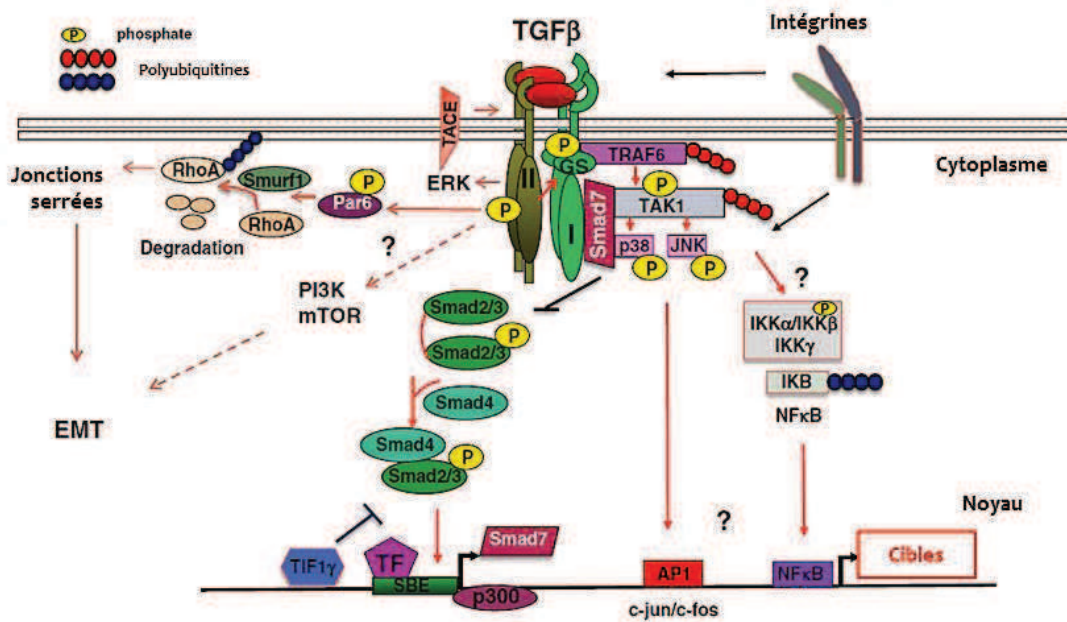


Figure 28 : Voies de signalisation canonique et non canoniques du TGF- β

D'après Yabing Mu *et al.*²³³

a. Signalisation par le récepteur de type II

La transduction du signal peut se faire directement depuis le récepteur de type II (sans recrutement du récepteur de type I). Dans les cellules subissant l'EMT, T β RII activé par son ligand est capable de phosphoryler directement le régulateur de polarité cellulaire PAR6 (« partitionning defective 6 ») qui recrute alors Smurf1 et cible la GTPase RhoA au niveau des jonctions serrées entre cellules, conduisant à leur dissolution et favorisant ainsi la migration polarisée^{234,235}.

b. Voie de signalisation Erk-MAPK

Exceptée la phosphorylation des résidus sérine et thréonine, les récepteurs au TGF- β peuvent également être phosphorylés sur leurs résidus tyrosine. Ainsi, le domaine cytoplasmique de T β RII est autophosphorylé sur trois résidus tyrosine²³⁶ et peut ainsi agir comme un récepteur à activité tyrosine-kinase en recrutant Grb2 et Shc et en activant la voie p38-« mitogen-activated protein kinase » (MAPK)²³⁷. T β RI activé utilise également son activité intrinsèque tyrosine-kinase pour phosphoryler Shc et recruter Grb2 et SOS de manière à activer la voie « extra-cellular regulated kinase » (Erk)-MAPK²³⁸ (Figure 29). De manière intéressante, Erk peut phosphoryler les R-Smads Smad1, 2 et 3 pour réguler leur activité²³⁹⁻²⁴². En culture cellulaire, la phosphorylation des R-Smads par Erk inhibe leur activité²⁴⁰.

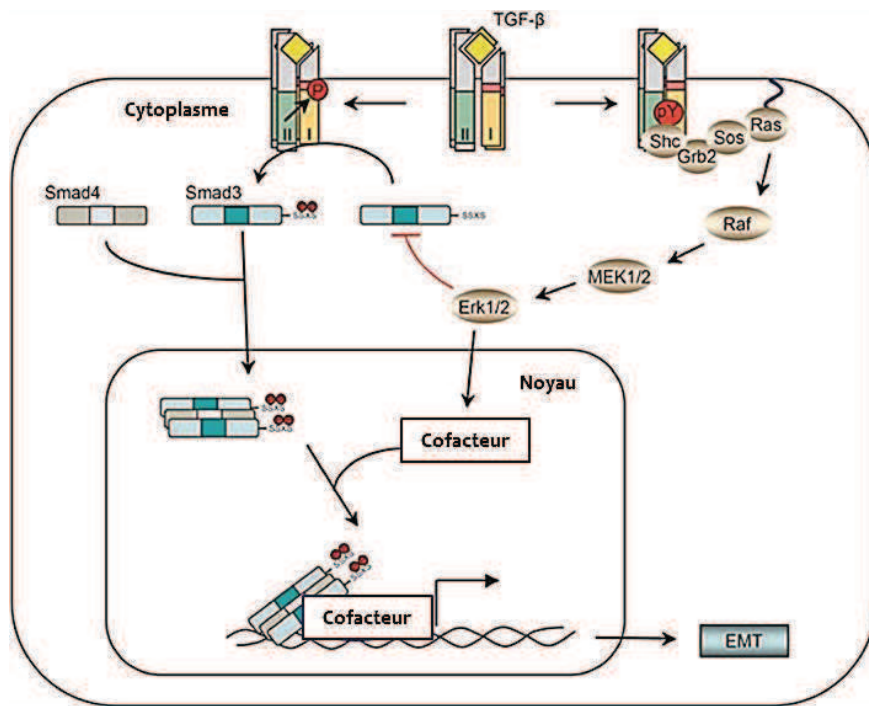


Figure 29 : Voie de signalisation non canonique Erk

Le TGF- β peut induire la phosphorylation de T β RI et T β RII sur leurs résidus tyrosine, permettant ainsi l'activation de la voie Ras-Erk MAPK. D'après Zhang YE²⁴³.

c. Voie JNK/p38-MAPK

Le TGF- β est capable d'activer « Jun amino-terminal kinase » (JNK) via MKK4 et p38 via MKK3/6 dans différentes lignées cellulaires grâce notamment à l'activation de « TGF- β activated kinase 1 » (TAK1 impliquée dans la régulation de la survie cellulaire, la différenciation et la réponse inflammatoire) par TRAF6 (Figure 28). Bien que l'activation de la voie JNK/p38 soit indépendante de l'activation des Smads, la cascade de signalisation TRAF6-TAK1-JNK/p38 agit en collaboration avec la voie canonique pour réguler la réponse cellulaire.

d. Voie PI3K/Akt

Le TGF- β est capable d'induire l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt²⁴⁴ (Figure 30) pour laquelle T β RI et T β RII sont tous deux requis. En effet, le TGF- β active la cascade PI3K-Akt-mTOR-S6K indépendamment de l'activation de Smad2/3²⁴⁵. Cette voie de signalisation participe entre autre à la régulation de la survie cellulaire, du métabolisme, de la migration, de l'invasion et de l'EMT^{246,247}. Elle est également capable de protéger les cellules de l'apoptose induite par le TGF- β et de l'inhibition de la prolifération²⁴⁸⁻²⁵⁰ grâce à l'interaction d'Akt et Smad3 empêchant la phosphorylation de ce dernier^{251,252}.

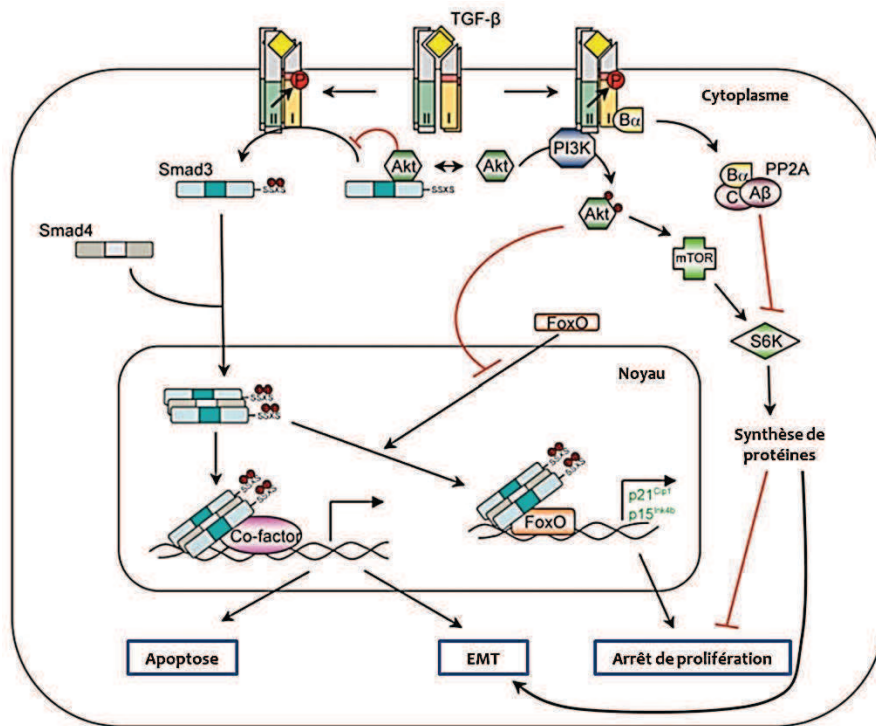


Figure 30 : Voie de signalisation non canonique PI3K/Akt

D'après Zhang YE²⁴³.

e. Petites GTPases et TGF- β

Les petites GTPases telles RhoA, Rac et Cdc42 jouent un rôle important dans l'organisation du cytosquelette et la motilité cellulaire²⁵³. Le TGF- β est capable d'activer RhoA de manière dépendante de Smad 2 et/ou 3^{254,255} et peut également l'inhiber, notamment au niveau des jonctions serrées (voir sous-section a. du 3.2. ci-dessus). Le TGF- β induit également l'activation de la GTPase Cdc42 (Figure 31), participant également à l'EMT²⁵⁶. Ces données soulignent la capacité du TGF- β à réguler l'adhésion cellulaire et l'EMT.

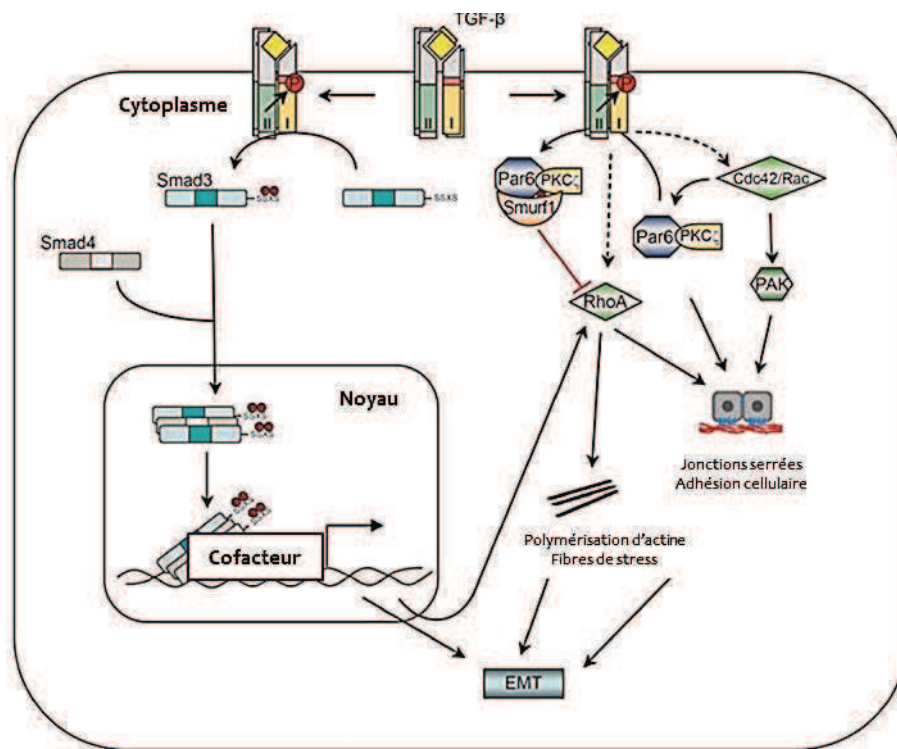


Figure 31 : Voie non canonique des petites GTPases

D'après Zhang YE²⁴³.

f. Voie des intégrines

Les intégrines sont composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β et sont des récepteurs transmembranaires capables de lier la MEC sur leur versant extracellulaire et le cytosquelette sur leur versant intracellulaire. Les intégrines sont des senseurs des changements environnementaux de la cellule. Elles régulent la différenciation cellulaire, la migration, la prolifération et les changements de la MEC. Le TGF- β est capable de réguler l'expression des intégrines. De plus, les intégrines sont capables d'activer le TGF- β 1 et d'induire sa signalisation notamment durant l'EMT²⁵⁷.

g. Protéines Smad et microARN

Les protéines Smads peuvent être impliquées dans la biogenèse de micro acides ribonucléiques (microARN) en agissant directement avec le complexe Drosha d'une manière indépendante de Smad4^{258,259}.

4. Rôles physiologiques du TGF- β et pathologies associées

Le TGF- β (et les membres de la superfamille du TGF- β) régule de nombreuses fonctions physiologiques telles le développement embryonnaire et l'homéostasie cellulaire incluant la régulation de la prolifération, la différenciation, l'apoptose et le remodelage de la MEC de manière dépendante du contexte cellulaire^{211,260-263}. Les altérations, incluant les mutations somatiques ou germinales, affectant le TGF- β ou les acteurs impliqués dans sa régulation ou ses voies de signalisation, entraînent différentes pathologies^{264,265}.

Les membres de la superfamille du TGF- β exercent des rôles importants dans le système cardiovasculaire en régulant notamment le développement cardiaque et l'angiogenèse en jouant sur la prolifération et la migration des cellules vasculaires^{266,267}. L'importance du TGF- β pour le système cardiovasculaire est notamment mis en évidence par des phénotypes létaux observés chez des souris « knockout » pour TGF- β 1²⁶⁸, - β 2²⁶⁹ et T β RIII^{270,271}.

Le TGF- β , en tant que régulateur essentiel du remodelage et de l'assemblage de la MEC²⁷², est un puissant stimulateur de la cicatrisation²⁷³. Cependant, une activation excessive de la voie de signalisation du TGF- β a été démontrée comme étant impliquée dans la fibrose tissulaire. La fibrose est une pathologie complexe résultant d'une formation excessive de MEC^{272,274}. Cette accumulation anormale de MEC peut s'opérer dans différents organes et interférer avec leur fonctionnement.

4.1. Cas particulier du TGF- β et de l'os

Les ostéoblastes, fibroblastes et ostéoclastes présents au niveau osseux expriment les récepteurs au TGF- β et produisent les TGF- β 1, - β 2 et - β 3²⁷⁵. Les trois isoformes du TGF- β sont donc présents dans l'os mais le TGF- β 1 y est le plus abondant (200 μ g/kg)^{276,277}. Il est sécrété sous forme latente par les cellules osseuses et est stocké dans la matrice constituant une réserve mobilisable, notamment lors de la résorption osseuse et de son activation par les ostéoclastes. Les TGF- β s sont impliqués dans le développement osseux embryonnaire mais également dans le remodelage osseux après la naissance. Le TGF- β 1 est particulièrement impliqué dans le remodelage osseux en affectant à la fois la formation et la résorption osseuse mais également leur couplage durant le remodelage^{278,279}. Le rôle du TGF- β 1 dans la biologie osseuse est cependant complexe et controversé. En effet, les effets du TGF- β 1 *in vitro* semblent dépendre du stade de différenciation cellulaire, de la densité cellulaire, de sa

concentration et des conditions de culture. Son action *in vivo* est influencée par les autres facteurs environnementaux.

a. Effets du TGF- β sur l'ostéoblastogenèse et l'ostéoformation

Le TGF- β joue un rôle dans tous les stades de la différenciation et de la formation osseuse. Malgré des résultats controversés, dépendant de nombreux facteurs, le modèle actuellement admis supporte le fait que le TGF- β 1 favorise la formation osseuse. En effet, le TGF- β stimule le recrutement des progéniteurs ostéoblastiques en induisant leur chimiotactisme²⁸⁰⁻²⁸² et stimule leur prolifération. Il promeut les stades précoces de la différenciation ostéoblastique en favorisant la formation de matrice osseuse mais bloque les phases tardives de la différenciation et la minéralisation^{283,284}. L'apoptose des ostéoblastes est inhibée par le TGF- β 1 qui maintient leur survie durant leur transdifférenciation en ostéocytes²⁸⁵⁻²⁸⁷. Contrairement aux BMPs, le TGF- β semble incapable d'induire l'ostéogenèse des cellules mésenchymateuses pluripotentes bien qu'il inhibe leur différenciation en cellules myogéniques²⁸⁸. De plus, la voie de signalisation du TGF- β peut réguler l'expression de marqueurs de différenciation ostéoblastique tels que le collagène de type I, la fibronectine, le « Plasminogen Activator Inhibitor-1 » (PAI-1), l'OPN, l'ostéonectine, la PAL et l'ostéocalcine en se fixant sur les sites SBE identifiés dans leurs promoteurs^{289,290}. En plus de son action directe sur l'ostéoformation, le TGF- β affecte cette dernière de manière indirecte en ciblant Runx2. Le TGF- β 1 stimule Runx2 en association avec les BMPs durant les phases précoces de la différenciation mais s'oppose à cette même action des BMPs durant les phases tardives²⁹¹. Les effets inhibiteurs du TGF- β 1 dans les phases tardives de l'ostéogenèse *in vitro* sont confirmés par l'utilisation d'un inhibiteur de T β RI d'où découle la stimulation de la différenciation ostéoblastique et la minéralisation de la matrice²⁸⁴.

Il semble donc que le TGF- β stimule la différenciation ostéoblastique au cours des stades précoces et participe à l'ostéoformation en stimulant la production de matrice mais inhibe sa minéralisation durant les phases plus tardives. Cette réponse au TGF- β des cellules osseuses semble s'expliquer entre autre par la diminution de l'expression de T β RI et T β RII au cours de la différenciation des ostéoprogéniteurs en ostéoblastes matures²⁹².

b. Effets du TGF- β sur l'ostéoclastogenèse et l'ostéorésorption

Le TGF- β joue un rôle fondamental dans la résorption osseuse bien que ses effets sur la différenciation ostéoclastique *in vitro* demeurent controversés et semblent dépendre

de la concentration à laquelle il est utilisé ainsi que des conditions de culture (cellules isolées ou avec d'autres types cellulaires). Il est actuellement admis que le TGF- β participe à la différenciation ostéoclastique et à la résorption osseuse. En effet, le TGF- β produit par les ostéoblastes ou les cellules stromales est capable d'engager les monocytes dans la différenciation ostéoclastique. Des études montrent d'ailleurs que RANKL est incapable d'induire la formation ostéoclastique en culture en absence de TGF- β ^{293,294}. Le TGF- β est capable d'augmenter la différenciation ostéoclastique induite par RANKL²⁹³⁻²⁹⁷ et maintient les monocytes, précurseurs ostéoclastiques, au niveau de la surface osseuse où ils seront plus sensibles aux stimuli de l'ostéoclastogenèse. Le TGF- β est également capable d'augmenter la formation d'ostéoclastes par sa capacité à induire l'expression de RANK à la surface des précurseurs ostéoclastiques^{294,298}. Enfin, le TGF- β peut exercer un rôle indirect sur la différenciation ostéoclastique via son action sur les ostéoblastes qui sécrètent RANKL. Le TGF- β est capable d'augmenter la résorption osseuse en présence d'ostéoclastes matures²⁹⁹⁻³⁰³.

5. TGF- β et cancer

5.1. Généralités

Compte tenu des nombreux rôles physiologiques exercés par le TGF- β , un dysfonctionnement de ces voies de signalisation conduit à de nombreuses pathologies dont le développement et la progression tumorale. De nombreuses mutations, entraînant des pertes de fonction des composants de la voie de signalisation du TGF- β sont impliquées dans de nombreux cancers d'origine épithéliale³⁰⁴. Ces observations supportent l'idée d'un rôle suppresseur de tumeur du TGF- β dont le contournement promeut la tumorigenèse. Cependant, l'analyse d'échantillons de tumeurs suggère un rôle primordial du TGF- β dans la progression tumorale, allant à l'encontre de son rôle protecteur de tumeur. Des immunomarquages du TGF- β semblent corrélés avec le potentiel métastatique des cancers du sein, du colon et de la prostate³⁰⁵⁻³⁰⁷. De plus, des niveaux élevés de TGF- β dans les sérums de patients atteints de cancer du côlon ou de carcinome hépatocellulaire semblent corrélés à l'invasion tumorale, l'angiogenèse ou encore le développement métastatique. Le TGF- β semblerait donc avoir un rôle bivalent dans la carcinogenèse. Ce rôle bivalent, très étudié dans les tumeurs d'origine épithéliale, dépendrait du contexte dans lequel se trouve les cellules. Le TGF- β aurait un rôle suppresseur de tumeur dans les phases précoces du

développement tumoral et un rôle protumoral durant les phases tardives³⁰⁸. Les cellules tumorales perdraient leur sensibilité au TGF- β en ce qui concerne l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose mais deviendraient sensibles à ses propriétés pro-migratoires et invasives. En plus de ses effets directs sur les cellules tumorales, le TGF- β serait capable d'agir de manière indirecte sur ces dernières via son action sur l'environnement tumoral dans lequel il est omniprésent.

5.2. Rôle tumeur-suppresseur du TGF- β

Des mutations soulignent les effets tumeur-suppresseurs de la voie de signalisation du TGF- β . Des mutations affectants *TBR11* ont été décrites dans les tumeurs gastriques, les gliomes et le cancer colorectal^{309,310}. Les mutations de *TBR1*, moins fréquentes, ont été observées dans les cancers du sein, des ovaires et du pancréas³¹¹⁻³¹³.

Le rôle tumeur-suppresseur du TGF- β passe par sa capacité à inhiber la prolifération cellulaire via l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. Le TGF- β inhibe la prolifération des cellules épithéliales, neuronales et hématopoïétiques en régulant des effecteurs du cycle cellulaire (Figure 32). En effet, il est capable d'induire des inhibiteurs de CDK tels p15 (INK4B) et p21 (WAF1) via le complexe Smad3/4³¹⁴⁻³¹⁸. p15 est alors capable de bloquer le cycle cellulaire en phase G1 via son interaction avec CDK4/6, empêchant ainsi la liaison de ce dernier à la cycline D²⁶¹. p21 est capable d'inhiber l'activité du complexe cycline E-CDK2^{261,304}. L'activité de ce complexe empêche la phosphorylation de Rb, effecteur du passage de la phase G1 à S dans la progression du cycle cellulaire.

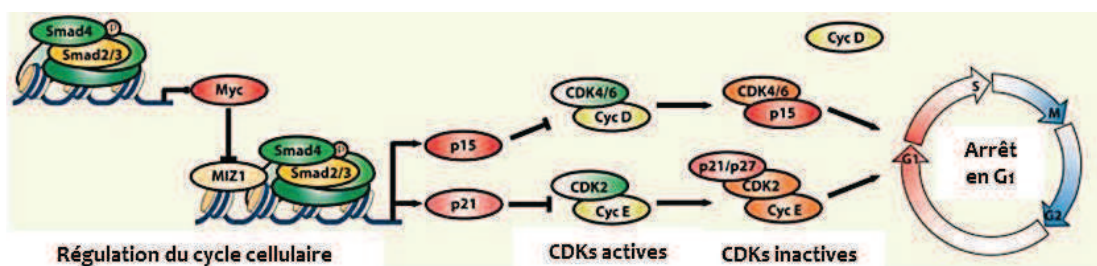


Figure 32 : Rôle tumeur supresseur du TGF- β par le contrôle de la progression du cycle cellulaire

D'après Erik Meulmeester et Peter ten Dijke³¹⁹

Outre l'induction d'inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire, le contrôle de ce dernier par le TGF- β se fait également par la répression de l'oncogène c-Myc qui promeut

normalement la prolifération cellulaire. De plus, le TGF- β est capable de réprimer les expressions d'Id1, Id2 et Id3, facteurs nucléaires impliqués dans la transition G1-S³²⁰.

Le TGF- β est également capable d'induire l'apoptose et limite ainsi la progression tumorale. Les mécanismes moléculaires par lesquels il régule l'activité pro-apoptotique sont encore peu connus et il semble important de mieux les comprendre de manière à identifier les points clés que les cellules tumorales sont capables de contourner, favorisant ainsi la progression tumorale. Le TGF- β est également capable d'inhiber la progression tumorale des tumeurs d'origine épithéliale de manière indirecte en agissant sur le microenvironnement tumoral par blocage de la production de facteurs paracrines par le stroma tumoral.

5.3. Rôle pro-tumoral du TGF- β

De manière paradoxale, certaines tumeurs capables de contourner les effets suppresseurs de tumeur du TGF- β sont en mesure d'exploiter ses propriétés pro-tumorales. En effet, ces tumeurs acquièrent une résistance aux effets anti-tumoraux du TGF- β et exploitent les fonctions du TGF- β en tant que promoteur de l'EMT, de l'invasion tumorale, de la dissémination métastatique et de l'échappement au système immunitaire (Figure 33).

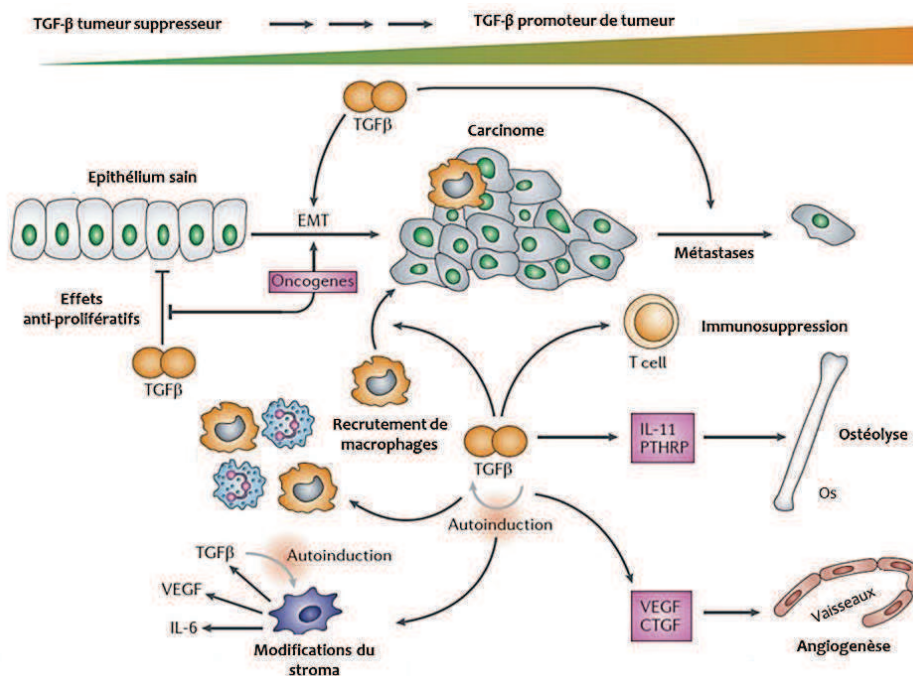


Figure 33 : Rôles bivalents du TGF- β selon le stade du développement tumoral

D'après Rosemary J. Akhurst et Akiko Hata³²¹

a. Rôle du TGF- β dans la transition épithélio-mésenchymateuse

L'EMT est un processus clé souvent observé au cours du développement embryonnaire et la cicatrisation mais aussi dans certaines pathologies comme la fibrose ou les cancers. Le rôle du TGF- β en tant qu'inducteur de l'EMT a été démontré pour la première fois il y a 20 ans³²².

L'EMT se caractérise par la perte de l'adhésion cellule-cellule et de la polarité cellulaire (Figure 34).

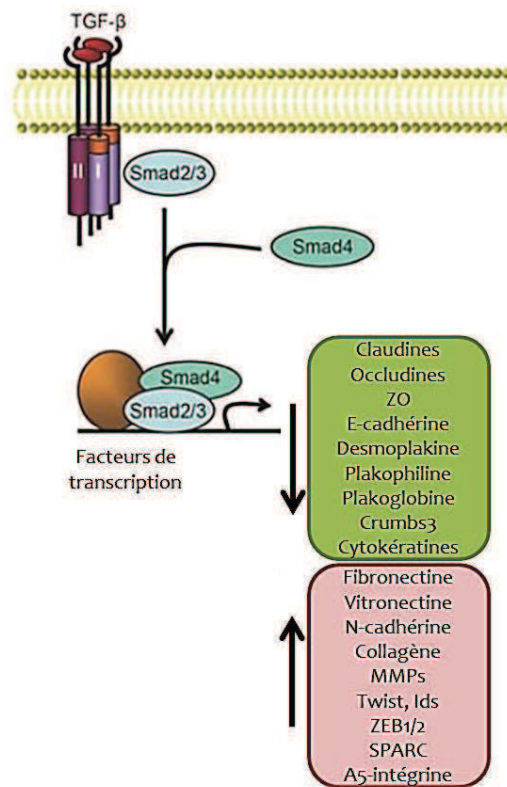


Figure 34 : Régulation transcriptionnelle de l'EMT par le TGF- β

D'après Jian Xu et al.³²³

La perte d'adhésion cellule-cellule est caractérisée par la suppression de différents composants des complexes jonctionnels tels la E-cadhérine, « zonula occludens 1 » (ZO-1), l'occludine et les claudines³²⁴. Les cellules deviennent alors capables de se détacher les unes des autres et passent d'un état de tissu épithélial organisé à un état plus individuel leur permettant de bouger. Les changements observés durant cette réorganisation architecturale des microfilaments, microtubules et filaments intermédiaires promeuvent la motilité cellulaire. Parallèlement, les cellules acquièrent l'expression de marqueurs

mésenchymateux tels la vimentine, l' α -SMA (« α smooth muscle actin») et la fibronectine^{323,325-328} et deviennent capables de produire des protéines matricielles (fibronectine et collagène) et des métalloprotéases facilitant leur migration. Au cours de l'EMT, les cellules acquièrent des capacités de migration et d'invasion leur permettant de survivre dans un environnement sans ancrage ce qui leur confère des propriétés proches des cellules souches. Enfin, de nombreuses cytokines et facteurs de croissance tels le TGF- β , WNT, Notch, « hepatocyte growth factor » (HGF), « epidermal growth factor » (EGF) et PDGF sont induits durant l'EMT et amplifient ce phénomène. L'induction de l'EMT par le TGF- β se fait par induction d'autres facteurs de transcription tels Twist, Snail, Slug, ZEB1 et ZEB2. Ces facteurs sont capables de réprimer la E-cadhérine ainsi que d'autres marqueurs épithéliaux et induisent l'expression de gènes mésenchymateux. La voie de signalisation du TGF- β par les Smads joue un rôle crucial dans l'induction de l'EMT³²⁹⁻³³² mais les autres voies de signalisation du TGF- β sont également impliquées dans la régulation de ces facteurs de transcription. L'inhibition de Smad3/4 ou la surexpression de Smad7 abolissent l'induction de l'EMT^{329,330,333}.

b. TGF- β et processus métastatique

Le processus métastatique est un processus complexe se déroulant en plusieurs étapes participant à la dissémination des cellules tumorales issues de la tumeur primitive vers un site secondaire. Il consiste en l'acquisition de caractéristiques migratoires des cellules issues de la tumeur primaire, de leur capacité à envahir le réseau vasculaire et d'intravasation, de circulation puis d'extravasation depuis les vaisseaux sanguins jusqu'à l'invasion d'un organe secondaire où elles devront s'ancrer, survivre et proliférer³³⁴. Ce processus est traditionnellement considéré comme un événement survenant à un stade tardif de la progression tumorale. Cependant, de nombreuses évidences démontrent que l'initiation du processus métastatique se détermine très tôt durant la tumorigenèse³³⁵. En effet, ce processus réside également dans les modifications précoces de l'organe cible permettant la création d'un microenvironnement réceptif requis pour l'ancrage des cellules malignes à distance. On parle alors de création de niches pré-métastatiques puis métastatiques (Figure 35) dans certains organes plus réceptifs que d'autres, répondant à la théorie du « seed and soil » développée par Paget³³⁶. Le TGF- β , largement sécrété par de nombreuses cellules tumorales et libéré de la MEC constituant le microenvironnement tumoral, exerce un rôle primordial dans toutes les étapes du processus métastatique, de la

création de niches pré-métastatiques à la croissance au site secondaire en passant par la dissémination.

La niche, aussi bien de la tumeur primaire que métastatique, est donc considérée comme un microenvironnement spécialisé capable de réguler les fonctions biologiques et physiques de certaines cellules cibles^{337,338}. Le stade de niche pré-métastatique favorise la création d'un environnement propice à l'ancrage successif des cellules tumorales au niveau de la niche métastatique dans laquelle elles pourront proliférer et passer du stade de micrométastases à macrométastases (Figure 35).

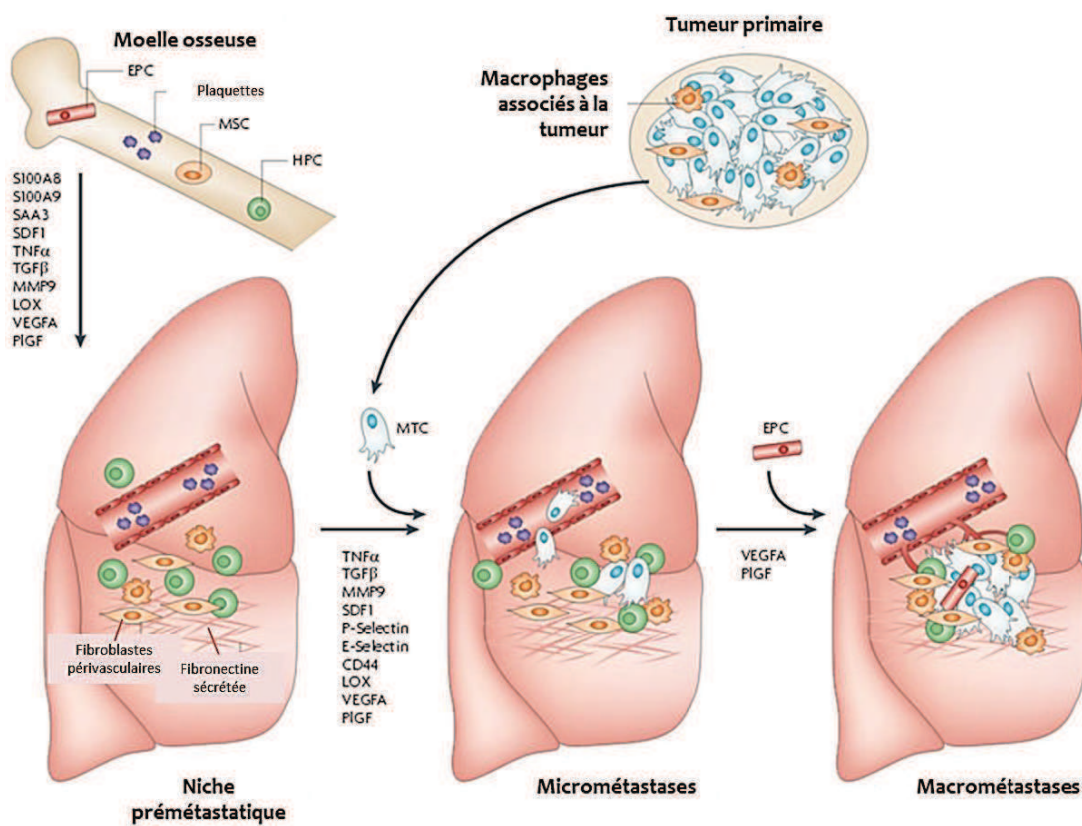


Figure 35 : Modèle de l'évolution de la niche métastatique

D'après Bethan Psaila et David Lyden³³⁵. HPC : Progéniteurs hématopoïétiques, EPC : Progéniteurs endothéliaux, MTC : Cellules tumorales métastatiques, MSC : Cellules souches mésenchymateuses

La niche pré-métastatique résulte d'une adaptation de l'environnement cible avant l'arrivée des cellules tumorales grâce à la sécrétion de facteurs par la tumeur primitive³³⁹⁻³⁴¹. En réponse aux facteurs sécrétés par la tumeur primitive tels VEGFA, PIGF et le TGF- β , des progéniteurs hématopoïétiques dérivés de la moelle osseuse, des plaquettes et des CSM

sont recrutés au niveau de la niche pré-métastatique de manière à créer un environnement propice à l'adhésion et l'invasion des cellules tumorales^{339,340}. Ces cellules souches dérivées de la moelle osseuse exprimant VEGFR1 se localisent au site pré-métastatique avant les cellules tumorales et sécrètent fortement la fibronectine, essentielle pour l'attraction et l'adhésion de ces cellules tumorales. La mobilisation des cellules myéloïdes VEGFR1+ depuis la moelle osseuse et leur recrutement au niveau de la niche pré-métastatique résulte de la sécrétion de VEGFA et PlGF par les cellules tumorales au site primaire³³⁹. Des chimiokines inflammatoires permettent également le recrutement des cellules hématopoïétiques et tumorales au niveau de la niche³⁴⁰. Dans certains modèles de poumons pré-métastatiques, le TGF- β , le TNF α et VEGFA libérés de la tumeur primaire induisent l'expression de protéines inflammatoires S100A8 et S100A9 spécifiquement dans le parenchyme pulmonaire. Le traitement avec des anticorps dirigés contre S100A8 et S100A9 inhibe l'infiltration de cellules myéloïdes et réduit de 80 à 90% la colonisation des poumons par les cellules tumorales³⁴⁰. Dans le cas particulier de l'os, les ostéoclastes sont capables de promouvoir la mobilisation et la prolifération des cellules souches dérivées de la moelle osseuse, constituant un site métastatique intéressant notamment grâce aux facteurs libérés par le remodelage³⁴². Au niveau de la niche pré-métastatique, les cellules myéloïdes recrutées collaborent avec d'autres types cellulaires comme les cellules stromales et endothéliales résidentes, permettant ainsi d'aider à l'ancrage et la croissance de la lésion métastatique grâce aux chimiokines, facteurs de croissance, enzymes de dégradation de la matrice et molécules d'adhésion qu'elles induisent au sein de la niche. Le remodelage au sein de la niche est primordial. Ainsi, pour permettre l'invasion et la croissance métastatique, de nombreux facteurs tels les cytokines inflammatoires RANKL³⁴³⁻³⁴⁵ et les MMPs^{339,346} voient leur expression augmenter. Notons l'importance du TGF- β dans le processus de remodelage de la matrice notamment en tant qu'inducteur de MMPs. Le TGF- β produit par les cellules myéloïdes peut également interférer directement avec le système immunitaire de manière à protéger les cellules tumorales présentes au sein des niches et empêcher leur détection par les cellules immunitaires³⁴⁷. Le rôle des plaquettes au sein des niches est également primordial en tant que réserve de TGF- β , chimiokines et facteurs angiogéniques. De plus, les fibroblastes présents localement, sources de MMPs et sensibles aux différents facteurs comme le TGF- β , prolifèrent rapidement, déposent des composants de la MEC de manière accrue et participent ainsi à la progression métastatique³⁴⁸. Enfin, l'hypoxie favorise les niches et donc le développement métastatique³³⁵. Le TGF- β exerce donc des effets durant les

stades précoces du développement métastatique à savoir durant la genèse des niches pré-métastatiques et dans le maintien des caractéristiques de la niche mais également dans l'intravasation, la dissémination, l'extravasation et la colonisation du site secondaire. De nombreuses études soulignent les effets pro-métastatiques du TGF- β comme l'observation d'un immunomarquage plus fort dans les cellules de métastases de cancer du sein que dans les cellules de la tumeur primaire ; ou encore une augmentation du niveau de TGF- β 1 dans les cellules tumorales circulantes. Ces métastases peuvent être inhibées par certaines stratégies thérapeutiques inhibant la voie de signalisation du TGF- β telles l'utilisation d'anticorps neutralisant, de récepteur soluble ou encore d'inhibiteur du récepteur de type I. Enfin le TGF- β est capable d'induire l'expression de différents gènes cibles hautement impliqués dans le processus métastatique (invasion, intravasation, dissémination, extravasation, adressage, angiogenèse) tels « chemokine (C-X-C motif) receptor 4 » (CXCR4)³⁴⁹, « angiopoietin-like 4 » (ANGPTL4)³⁵⁰, PTHrP³⁵¹, « Connective Tissue Growth Factor » (CTGF) et IL-11³⁵².

c. TGF- β et angiogenèse

L'angiogenèse tumorale est cruciale pour la croissance et l'invasion tumorale, permettant d'amener les nutriments et l'oxygène nécessaires au développement tumoral via les vaisseaux sanguins. Elle permet également l'intravasation des cellules tumorales dans le système sanguin, entraînant ainsi la dissémination métastatique. Le TGF- β 1 exerce un rôle important dans le développement vasculaire physiologique et est capable d'induire l'angiogenèse³⁵³⁻³⁵⁷. Il est capable d'induire un environnement pro-angiogénique via l'induction de cibles directes connues pour être des médiateurs clés dans ce phénomène, que sont VEGF et CTGF^{352,358}. Les conditions hypoxiques dans lesquelles se trouve la tumeur peuvent induire en association avec le TGF- β une augmentation du niveau d'acides ribonucléiques messagers (ARNm) de VEGF grâce à l'activation de l'« hypoxia inducible factor 1 » (HIF1). Différents modèles démontrent le rôle primordial du TGF- β 1 sécrété par les cellules tumorales dans l'angiogenèse tumorale³⁵⁹. Des niveaux élevés d'ARNm de TGF- β 1 dans les cancers du sein sont associés à une augmentation de la densité des vaisseaux sanguins, ces deux paramètres étant corrélés à un mauvais pronostic pour les patients³⁶⁰. D'autres études diagnostiques suggèrent que le niveau de TGF- β 1 circulant dans le plasma est associé à l'induction de l'angiogenèse tumorale et est de mauvais pronostic pour les patients^{307,361-363}. Les niveaux de TGF- β 1 semblent également corrélés à l'expression du facteur angiogénique VEGF³⁶⁴. Le TGF- β 1 est capable d'induire l'angiogenèse de manière

directe ou indirecte. En effet, il est capable d'induire l'expression de VEGF qui agit directement sur les cellules endothéliales pour stimuler leur prolifération et leur migration et ainsi créer de nouveaux vaisseaux³⁶⁵. De plus, il stimule indirectement l'angiogenèse grâce à son activité chimioattractive des monocytes, eux-mêmes capables de libérer des cytokines angiogéniques^{353,355,366,367}. Le TGF- β 1 induit des changements du microenvironnement entraînant des conditions favorables pour la migration des cellules endothéliales et la formation de capillaires. Capable d'induire l'expression des métalloprotéases MMP-2 et -9 et d'inhiber l'inhibiteur de protéase TIMP dans les cellules tumorales et les cellules endothéliales³⁶⁸⁻³⁷³, il est responsable des phénomènes de migration et d'invasion requis dans l'angiogenèse^{374,375}.

d. TGF- β et échappement au système immunitaire

Lors du développement tumoral, l'organisme est capable de reconnaître les cellules cancéreuses et d'utiliser les cellules immunitaires telles les lymphocytes T et cellules NK pour les éliminer spécifiquement. Cependant, une des caractéristiques majeures des cellules tumorales est leur capacité à contourner ce système de surveillance en diminuant localement la réponse immune par différents mécanismes. Entre autre, la sécrétion et l'activation de TGF- β 1 par les cellules tumorales stimule le développement et la progression tumorale en échappant à la surveillance du système immunitaire³⁷⁶. Les cellules cancéreuses sont alors capables de tirer profit des propriétés immunosuppressives du TGF- β . Le TGF- β est en effet capable d'inhiber la prolifération et la différenciation fonctionnelle des lymphocytes T, des cellules NK, des neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes B^{367,377,378}. En plus de promouvoir la tumorigénicité en réprimant localement les fonctions immunes, le TGF- β inhibe l'expression des antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité, rendant la surface des cellules tumorales moins immunogène³⁷⁹⁻³⁸¹. Il est également capable d'inhiber la fonction des cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques³⁸² empêchant ainsi l'activation des lymphocytes T. De plus, le TGF- β est capable de réprimer localement la production de facteurs cytolytiques tels que la perforine, les facteurs sécrétés activateurs de caspase granzyme A et B et les cytokines pro-apoptotiques Fas-ligand et IFN γ ³⁸³.

5.4. TGF- β et ostéosarcomes

Le rôle du TGF- β est très étudié dans les cancers d'origine épithéliale. Ses effets sur les tumeurs mésoenchymateuses semblent moins bien connus malgré l'importance de cette cytokine dans les différents processus physiologiques et pathologiques affectant cet ensemble cellulaire et tissulaire. Les travaux réalisés sur les rôles du TGF- β dans les ostéosarcomes soulignent ses effets pro-tumoraux et pro-métastatiques. En effet, le TGF- β augmente dans les sérums de patients atteints d'ostéosarcome par rapport à des sérums d'individus sains. De même, l'augmentation de TGF- β dans les sérums de patients métastatiques est plus importante que chez les patients non métastatiques³⁸⁴. L'expression des isoformes TGF- β 1 et - β 3 est associée au développement de métastases pulmonaires³⁸⁵. La forte expression de TGF- β est corrélée aux ostéosarcomes de haut grade et s'accompagne d'une moins bonne réponse à la chimiothérapie^{386,387} soulignant ses effets pro-tumoraux.

Plusieurs expériences ont démontré le rôle pro-migratoire du TGF- β dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome, par des mécanismes d'action directs ou indirects³⁸⁸⁻³⁹⁰. La cascade de signalisation du TGF- β associée à d'autres facteurs semble être associée à la promotion de la motilité cellulaire et à l'invasion des cellules d'ostéosarcome lors du processus dit « EMT-like » qu'elle induit³⁹¹. Le TGF- β est également connu en tant que facteur pro-angiogénique dans l'ostéosarcome^{392,393}. L'utilisation d'anticorps anti-TGF- β combinée à l'action des cellules dendritiques entraînent des effets anti-tumoraux concluants en partie dus à la restauration de la réponse immune³⁹⁴. Le TGF- β semble également important au sein de l'environnement tumoral en participant au cercle vicieux qui s'établit entre les cellules tumorales et les cellules osseuses mais également par ses effets sur les cellules souches présentes. Le TGF- β est capable de maintenir la « souche » des CSM dans ce contexte pathologique et promeut la production de cytokines pro-tumorales par ces cellules³⁹⁵. En plus de l'induction de la chimiorésistance, la tumorigénicité, la néovasculogenèse et le potentiel métastatique des cellules d'ostéosarcome, le TGF- β 1 associé à l'hypoxie induit également leur dédifférenciation, source de cellules souches cancéreuses hautement résistantes. L'inhibition du TGF- β reverse ce phénomène et inhibe l'autorenouvellement de ces cellules souches cancéreuses³⁹⁶. Enfin, certains travaux ont démontré des effets bénéfiques à inhiber la voie de signalisation du TGF- β dans les ostéosarcomes notamment grâce à l'utilisation de l'inhibiteur chimique SB-431542³⁹⁷.

5.5. Approches thérapeutiques anticancéreuses inhibant le TGF- β

En tant que promoteur de tumeurs durant les stades tardifs du développement tumoral et facteur pro-métastatique, le TGF- β constitue une cible thérapeutique intéressante. L'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β est donc étudiée en cancérologie et regroupe trois stratégies majeures. La première repose sur le ciblage du ligand, la seconde le ciblage de l'interaction ligand-récepteur et la troisième le ciblage de la transduction du signal et font l'objet d'essais précliniques et cliniques (Figure 36).

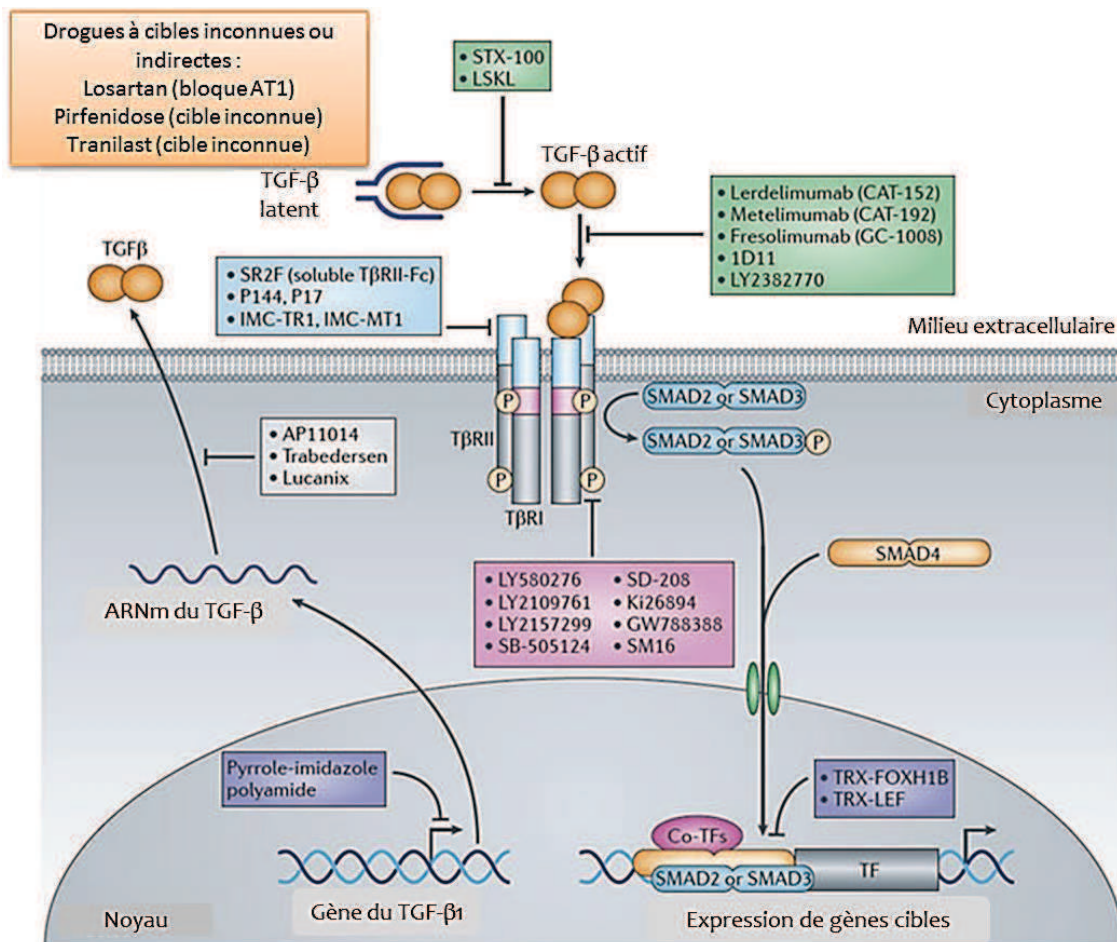


Figure 36 : Approches thérapeutiques anticancéreuses à l'essai inhibant le TGF- β

D'après Rosemary J. Akhurst et Akiko Hata³²¹

a. Ciblage du ligand

Le ciblage du ligand se fait généralement grâce à l'utilisation de molécules antisens composées de 13 à 25 nucléotides et responsables de la dégradation d'ARNm auquel elles peuvent s'apparier. L'utilisation d'anticorps monoclonaux est intéressante au vu de

l'importante production de TGF- β par les cellules tumorales et le microenvironnement durant la progression tumorale. AP-12009 (Trabedersen, Antisense, Pharma) est une molécule oligonucléotidique antisens responsable de l'extinction du gène codant le TGF- β_2 ³⁹⁸ dont l'expression est de mauvais pronostic dans le glioblastome et le cancer du pancréas. Des études *in vitro* sur des cellules de gliome ou dans un modèle murin de cancer du pancréas ont montré l'efficacité de cette drogue sur la diminution de la prolifération, la migration, la croissance tumorale et métastatique^{399,400}. Des résultats prometteurs ont été obtenus chez des patients atteints de gliome de haut grade récurrent ou résistant et permettent un essai clinique de phase III⁴⁰¹. Des phases I/II dans les néoplasmes pancréatiques, le mélanome et les néoplasmes du colon montrent également des résultats encourageants⁴⁰⁰. Le Belagenpumatucel-L ou Lucanix™, qui propose un mode d'action similaire neutralisant la production d'ARNm du TGF- β_2 produit par les cellules tumorales, permet de restaurer la reconnaissance immunitaire des cellules tumorales⁴⁰². AP11014 et AP15012 sont deux autres molécules antisens testées en essais pré-cliniques dans d'autres cancers.

b. Ciblage de l'interaction ligand-récepteur

Le ciblage de l'interaction ligand-récepteur se base sur des thérapies utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre le ligand ou ses récepteurs, des inhibiteurs chimiques ou des récepteurs solubles.

L'anticorps monoclonal 1D11 (Genzyme Corp., Sanofi) liant les TGF- β_1 , - β_2 et - β_3 a permis de supprimer les métastases pulmonaires issues du cancer du sein dans un modèle murin en restaurant la réponse immunitaire anti-tumorale⁴⁰³. Il diminue également la perte osseuse par réduction de l'expression de PTHrP et son régulateur Gli2⁴⁰⁴. Un autre anticorps monoclonal 2G7 a démontré son efficacité dans l'inhibition des métastases du cancer du sein en augmentant l'activité des cellules NK⁴⁰⁵. Trois autres anticorps, GC-1008 (Fresolimumab), CAT-152 (Lerdelimumab) and CAT-192 (Metelimumab), sont actuellement testés en clinique et pré-clinique. GC-1008 est testé dans des phases I/II d'essais cliniques chez des patients atteints de carcinome rénal et myélome multiple et montre une bonne tolérance⁴⁰⁶. Deux essais cliniques sur GC-1008 sont en cours sur les cancers du sein métastatique et le gliome.

Une autre solution permettant de bloquer l'interaction TGF- β -récepteurs est l'utilisation de récepteurs solubles. Des récepteurs solubles T β RII et T β RIII ont été testés dans des études pré-cliniques³¹⁹. L'expression du récepteur soluble T β RII diminue les

métastases des cancers du sein et du pancréas⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹, et celle de T β RIII inhibe les métastases pulmonaires en administration intrapéritonéale chez la souris nude⁴¹⁰.

Enfin, l'anticorps monoclonal PF-03446962 dirigé contre T β RI empêche la fixation du TGF- β à son récepteur. Cet anticorps semble actif en tant qu'agent anti-angiogénique. Un essai clinique de phase II de cette même molécule chez des patients atteints de mésothéliome pleural malin est en cours.

c. Ciblage de la transduction du signal

Deux stratégies existent pour bloquer la transduction du signal après liaison du ligand à ses récepteurs. La première consiste en l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité kinase des récepteurs et la seconde cible les molécules intracellulaires impliquées dans la voie de signalisation du TGF- β telles les Smads⁴⁰⁴.

Le ciblage de l'activité kinase des récepteurs a été très étudié dans le traitement des cancers, en particulier pour la facilité de production de ces drogues et la capacité d'administration par voie orale⁴⁰⁴. Le blocage de la voie de signalisation par ces inhibiteurs semble plus efficace que par les molécules antisens ou le ciblage de l'interaction ligand-récepteur mais sont cependant moins spécifiques. La plupart de ces molécules inhibitrices de l'activité kinase des récepteurs agit par inhibition de l'activité catalytique du site de liaison à l'ATP de T β RI.

SB-431542 (GlaxoSmithKline) inhibe T β RI en empêchant la phosphorylation de Smad-2 et Smad-3. Cette molécule est capable d'inhiber la prolifération des cellules d'ostéosarcome et la motilité et l'angiogenèse des cellules de gliome^{397,411}. Ce composé induit également la maturation des cellules dendritiques et l'activité des cellules T CD8⁺⁴¹². Il est également capable de restaurer la différenciation terminale des ostéoblastes permettant de supprimer la croissance du myélome multiple⁴¹³. Ki26894, LY364937 et le SD-208 sont d'autres inhibiteurs de T β RI et ont montré des résultats encourageants *in vitro* et *in vivo* sur des lignées cellulaires de cancer du sein et gastrique^{414,415}, dans des modèles de gliome⁴¹⁶ et dans des modèles de mélanome métastatique⁴¹⁷.

LY2109761 est une molécule inhibant l'activité kinase de T β RI et T β RII. Ce composé inhibe la formation de métastases dans des modèles de cancer du sein, du pancréas et colorectal⁴¹⁸⁻⁴²⁰.

LY2157299 (Eli-Lilly & Co) est un inhibiteur de l'activité kinase de T β RI kinase testé en essais cliniques sur des patients atteints de gliome, glioblastome, cancer pancréatique et carcinome hépatocellulaire.

Une autre approche de blocage de l'activité kinase du récepteur est le blocage du site de liaison au substrat par un peptide mimant Smad-2 ou -3 comme démontré dans les cellules Mv1Lu⁴²¹.

L'utilisation de petites molécules peptidiques capables de lier les protéines Smads comme Trx-SARA réduit la formation de complexe entre Smad-2/-3 et Smad-4⁴⁰⁴ et inhibe l'EMT dans des cellules épithéliales de cancer du sein⁴²².

IV. Objectifs de la Thèse

Le rôle pro-tumoral et pro-métastatique du TGF- β , très étudié dans les tumeurs d'origine épithéliale, semble cependant moins connu dans les tumeurs d'origine mésenchymateuse telles l'ostéosarcome. Pourtant, avec sa présence en grande quantité dans la matrice osseuse, il semble être un facteur de choix pour le développement tumoral et métastatique. Cette cytokine hautement impliquée dans les modifications de la matrice extracellulaire et le remodelage osseux constitue un élément indispensable du microenvironnement tumoral. En effet, le TGF- β en tant qu'acteur du cercle vicieux s'établissant entre les cellules tumorales et les cellules osseuses, participe au processus tumoral et métastatique. L'ostéosarcome, tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente, voit ses taux de survie faibles et inchangés depuis plus de 20 ans. Il existe donc une nécessité de trouver de nouvelles thérapies innovantes dans cette pathologie, ciblant à la fois la tumeur et son microenvironnement osseux.

Les objectifs de cette thèse s'inscrivent donc dans ce contexte de manière à mieux comprendre les effets du TGF- β , en particulier par la voie des Smads, dans l'ostéosarcome. Pour cela, nous avons développé différentes stratégies inhibitrices agissant à différents endroits de la cascade de signalisation. La première consiste en la surexpression du Smad-inhibiteur naturel Smad7 dans les cellules d'ostéosarcome. La seconde réside dans l'inhibition du récepteur T β RI, par l'utilisation d'un inhibiteur chimique spécifique, le SD-208. La troisième utilise l'halofuginone, un alcaloïde connu entre autre pour ses effets inhibiteurs de la voie de signalisation du TGF- β . Pour chacune de ces stratégies, nous nous sommes intéressés à leurs effets sur la croissance tumorale et le développement métastatique, après avoir vérifié leurs effets en tant qu'inhibiteurs de la voie de signalisation du TGF- β . Ces travaux se sont en particulier intéressés aux effets de ces trois stratégies sur la prolifération cellulaire et l'apoptose ainsi que sur le microenvironnement tumoral osseux. En effet, nous avons porté un intérêt au remodelage osseux et plus particulièrement à l'ostéolyse, processus hautement impliqué dans la pathologie et dans le cercle vicieux établi. Enfin, les objectifs de cette thèse sont de mieux comprendre les effets du TGF- β dans le processus métastatique en s'intéressant en particulier aux processus de migration et d'invasion cellulaire et à l'angiogenèse. Ainsi, cette thèse a pour objectif d'évaluer le potentiel anti-

tumoral et anti-métastatique des inhibiteurs de la voie de signalisation du TGF- β pour un éventuel transfert clinique dans l'ostéosarcome.

Résultats

Partie I : Intérêts du ciblage de la voie de signalisation du TGF- β dans l'ostéosarcome

I. Complément d'introduction et rationnel de l'étude

L'article présenté dans cette première partie évalue les effets du TGF- β dans l'ostéosarcome et le potentiel anti-tumoral de l'inhibition de sa signalisation en développant deux stratégies. La première consiste en une approche moléculaire par surexpression du Smad-inhibiteur Smad7 dans nos lignées d'ostéosarcome. La seconde est une approche pharmacologique utilisant le SD-208, un inhibiteur chimique de T β RI.

1. Smad7 : Smad-inhibiteur

1.1. Régulation de la voie de signalisation du TGF- β par Smad7

Le Smad-inhibiteur Smad7 est considéré comme l'inhibiteur de la voie de signalisation du TGF- β contrairement à Smad6 qui semble spécifique des BMPs, mais est également capable d'inhiber les voies des BMPs et des Activines. Ses domaines N-terminal et MH2 sont essentiels à ses activités inhibitrices^{423,424}.

Smad7 est capable d'inhiber la voie de signalisation du TGF- β par différents mécanismes. Sa capacité à former un complexe avec les récepteurs de type I lui permet d'inhiber la phosphorylation de R-Smad et la formation du complexe R-Smad-Co-Smad⁴²⁵. Smad7 peut également recruter les E3 ubiquitines ligases Smurf1 et Smurf2. Par liaison aux Smurfs dans le noyau et translocation dans le cytoplasme, il entraîne ainsi la dégradation du récepteur de type I en induisant son ubiquitination et l'adressage au protéasome. De plus, la phosphatase GADD34-PP1c peut être recrutée au niveau de T β RI par Smad7, responsable de la déphosphorylation et donc l'inactivation du récepteur²³⁰. Il a également été démontré que dans certaines lignées cellulaires, Smad7 est retenu dans le noyau malgré la stimulation au TGF- β et y exerce ses effets inhibiteurs⁴²⁶. Les effets inhibiteurs de Smad7 peuvent être également indépendants de T β RI. Enfin, Smad7 est capable de lier l'ADN grâce à son domaine MH2 et empêche ainsi la formation du complexe Smad-ADN^{426,427}. En effet, il est capable de lier l'ADN au niveau des répétitions « CAGA » du SBE mais également au niveau des éléments de réponse à l'activine. La dégradation de Smad7 est régulée par la balance existant entre son acétylation, sa déacétylation et son ubiquitination par différentes enzymes.

Smad7 est un régulateur important de la voie de signalisation du TGF- β , des activines, de Nodal et des BMPs. De manière intéressante, sa transcription est induite par le TGF- β et les BMPs, responsable ainsi d'un rétrocontrôle négatif, et régulée par d'autres facteurs d'autres voies de signalisation (Figure 37)⁴²⁸. La transcription de Smad7 peut également être induite par des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, l'IFN- γ ou le TNF- α ⁴²⁹. Smad7 est également capable d'activer différentes voies de signalisation telles Erk, JNK et p38 et ne se comporte donc pas seulement comme un inhibiteur mais également comme un acteur agissant au carrefour de différentes voies de signalisation de manière dépendante du contexte cellulaire⁴³⁰⁻⁴³².

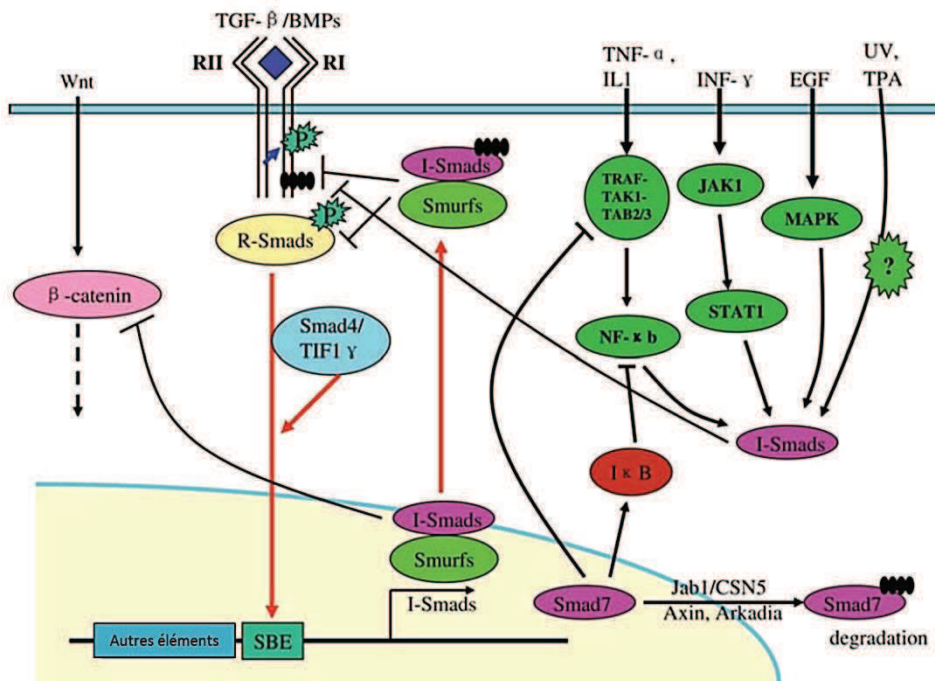


Figure 37 : Les Smad-inhibiteurs au carrefour des voies de signalisation

D'après Xiaohua Yan⁴³³

1.2. Intérêt du ciblage de Smad7 en cancérologie

Le bénéfice à inhiber le TGF- β en cancérologie commence à être admis et différentes approches ont déjà montré leurs avantages. En tant que régulateur négatif de la voie de signalisation du TGF- β , la surexpression de Smad7 semble être une stratégie moléculaire de choix pour démontrer l'importance de l'inhibition de cette cascade. De manière intéressante, la surexpression de Smad7 dans les cellules de mélanome diminue leur production de MMP-2 et -9 et s'accompagne d'une inhibition de la capacité d'invasion des

cellules *in vitro* et d'une diminution de la tumorigénicité *in vivo*. De plus, la surexpression de Smad7 retarde l'établissement et la croissance de métastases osseuses issues du mélanome *in vivo*^{434,435}. L'inhibition de la voie des Smads inhibe l'expression de différents gènes cibles du TGF- β impliqués dans l'adressage de métastases à l'os^{434,436} et Smad7 semble donc avoir un rôle clé dans l'inhibition de la formation de métastases ostéolytiques. Les mécanismes par lesquels Smad7 inhibe les capacités d'invasion des cellules tumorales semblent être liés à sa capacité à stabiliser les liaisons entre cellules notamment via l'induction de la N-cadhérine et ses effets sur la β -caténine⁴³⁷. Des travaux récents démontrent également le rôle protecteur de Smad7. Le facteur de transcription NR4A1 (également appelé Nur77, TR3 ou NGF-IB) promeut l'invasion tumorale et le développement métastatique du cancer du sein en stimulant la voie de signalisation du TGF- β par les Smads par induction de la dégradation de Smad7. Il est établi dans cette étude une corrélation significative entre la phosphorylation de Smad2 et l'expression de NR4A1 ainsi qu'une inhibition significative de la survie sans rechute quand NR4A1 est exprimé (n = 175 patients)⁴³⁸. Une autre étude a démontré le rôle du miRNA-520g dans l'induction de l'EMT et la promotion de métastases du carcinome hépatocellulaire en inhibant Smad7⁴³⁹. Ce miRNA-520g est en effet associé au développement métastatique et à la récurrence chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire et semble être un bon marqueur pronostic de cette pathologie. Il a été démontré que l'expression et le niveau protéique de Smad7, en tant que cible de ce miRNA, sont significativement diminués chez ces patients par rapport aux tissus sains. Enfin, l'expression du cluster de gène miRNA424-503 contribue à l'hyperactivation du TGF- β et induit le développement de métastases du cancer du sein *in vivo* en ciblant différents régulateurs négatifs du TGF- β dont Smad7⁴⁴⁰. Cette étude suggère que la surexpression observée du cluster miRNA424-503 dans les lésions de cancer du sein est associée à l'inhibition de Smad7 et Smurf2 et à l'activation du TGF- β .

L'ensemble de ces travaux soulignent l'importance de Smad7 en tant qu'inhibiteur de la voie de signalisation du TGF- β . Son inhibition semble corrélée au processus métastatique et souligne donc l'intérêt de stimuler ce facteur en cancérologie. Facilement surexprimable *in vitro*, il constitue une preuve de concept originale et intéressante pour mieux comprendre les effets du TGF- β en cancérologie. Les travaux précédemment cités soulignent également les perspectives thérapeutiques intéressantes que pourrait ouvrir un inducteur pharmacologique de Smad7.

2. Le SD-208, inhibiteur chimique de T β RI

2.1. Notions chimiques et mécanisme d'action du SD-208

Le SD-208 ou 2-(5-Chloro-2-fluorophényl)-4-[(4-pyridyle)amino]pteridine est un composé chimique de formule brute C₁₇H₁₀ClFN₆ et de poids moléculaire 352.752903 g/mol. Il appartient à la famille des ptéridines tout comme l'acide folique ou encore le méthotrexate. Le SD-208 est un inhibiteur spécifique de l'activité kinase du récepteur T β RI (IC₅₀ =49 nM). Il inhibe en effet de manière compétitive la liaison de T β RI à l'ATP, empêchant ainsi son activité kinase.

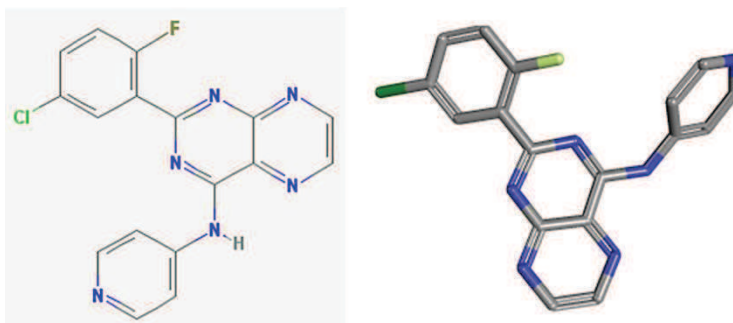


Figure 38 : Structures 2D et 3D du SD-208

Structure 2D (gauche) et 3D (droite) du SD-208, d'après le site <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

2.2. SD-208 et cancérologie

Le ciblage de la transduction du signal en inhibant l'activité kinase des récepteurs a été très étudié dans le traitement des cancers, en particulier pour la facilité de production de ces drogues et la possibilité d'administration par voie orale. Parmi ces molécules, le SD-208 semble être un candidat intéressant. En effet, en tant qu'inhibiteur spécifique de la voie de signalisation du TGF- β , le SD-208 a démontré sa capacité à inhiber l'invasion et la migration *in vitro* des cellules de mélanome⁴¹⁷, de gliome⁴¹⁶, d'adénocarcinome pancréatique⁴⁴¹ et de carcinome mammaire⁴⁴². De manière intéressante, cet inhibiteur chimique a démontré des effets bénéfiques sur l'inhibition de la croissance de tumeurs primaires comme le gliome⁴¹⁶, l'adénocarcinome pancréatique^{441,443} et le carcinome mammaire⁴⁴² mais également sur l'inhibition de métastases osseuses issues du mélanome⁴¹⁷, de cancer du pancréas⁴⁴¹ et de cancer du sein⁴⁴². Le SD-208 semble avoir des effets particulièrement importants sur l'environnement tumoral. En effet, il inhibe l'expression de gènes cibles du TGF- β impliqués

dans l'ostéolyse, l'angiogenèse et le remodelage de la MEC^{417,441,443,444}. Enfin, il augmente l'immunogénicité des cellules de gliome⁴¹⁶ ainsi que l'infiltrat de lymphocytes B dans le cadre de tumeurs pancréatiques⁴⁴³. De manière intéressante, il semble diminuer l'hyperalgésie TGF- β dépendante induite dans les cancers osseux⁴⁴⁵.

Au vu de leurs effets anti-cancéreux et anti-métastatiques, le SD-208 et la surexpression de Smad7, en tant qu'inhibiteurs de la voie de signalisation du TGF- β , nous apparaissent comme des approches intéressantes pour notre étude. De manière intéressante, ces deux stratégies employées inhibent la voie du TGF- β à différents niveaux de la cascade de signalisation, permettant ainsi de comparer leurs effets et de mieux comprendre le rôle du TGF- β dans l'ostéosarcome.

II. Article 1 : Clinical Cancer Research (Publié)⁴⁴⁶

Overexpression of Smad7 blocks primary tumor growth and lung metastasis development in osteosarcoma

Audrey Lamora^{1,4}, Julie Talbot^{1,3}, Gwenola Bougras^{1,3}, Jérôme Amiaud^{1,3}, Marion Leduc^{1,3}, Julie Chesneau^{1,3}, Julien Taurelle^{1,3}, Verena Stresing^{1,3}, Marie Cécile Le Deley⁵, Marie Françoise Heymann^{1,3}, Dominique Heymann^{1,3}, Françoise Redini^{1,3} and Franck Verrecchia^{1,3}

¹INSERM, UMR 957, Equipe labellisée Ligue contre le Cancer 2012, Nantes, France; ²Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Nantes, France; ³CHU Hôtel Dieu, Nantes, France; ⁴Inserm Liliane Bettencourt School, Pharm.D-PhD student; ⁵Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Running title: Role of TGF- β in osteosarcoma

Keywords: bone remodeling, metastasis, osteosarcoma, Smad7, TGF- β

Financial support: INSERM, Ligue contre le Cancer (Allocation doctorale to AL), Ligue contre le Cancer (Equipe labellisée 2012)

Address correspondence to: Franck Verrecchia, INSERM UMR957, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44000 Nantes, France, Phone: +33 240412842, Fax: +33 240412860, E-mail: franck.verrecchia@inserm.fr

Potential conflicts of interest: NO

Overexpression of Smad7 Blocks Primary Tumor Growth and Lung Metastasis Development in Osteosarcoma

Audrey Lamora^{1,2,3,4}, Julie Talbot^{1,2,3}, Gwenola Bougras^{1,2,3}, Jérôme Amiaud^{1,2,3}, Marion Leduc^{1,2,3}, Julie Chesneau^{1,2,3}, Julien Taurelle^{1,2,3}, Verena Stresing^{1,2,3}, Marie Cécile Le Deley⁵, Marie Françoise Heymann^{1,2,3}, Dominique Heymann^{1,2,3}, Françoise Redini^{1,2,3}, and Franck Verrecchia^{1,2,3}

Abstract

Purpose: Osteosarcoma is the main malignant primary bone tumor in children and adolescents for whom the prognosis remains poor, especially when metastasis is present at diagnosis. Because transforming growth factor- β (TGF β) has been shown to promote metastasis in many solid tumors, we investigated the effect of the natural TGF β /Smad signaling inhibitor Smad7 and the T β RI inhibitor SD-208 on osteosarcoma behavior.

Experimental Design: By using a mouse model of osteosarcoma induced by paratibial injection of cells, we assessed the impact of Smad7 overexpression or SD-208 on tumor growth, tumor microenvironment, bone remodeling, and metastasis development.

Results: First, we demonstrated that TGF β levels are higher in serum samples from patients with osteosarcoma compared with healthy volunteers and that TGF β /Smad3 signaling pathway is activated in clinical samples. Second, we showed that Smad7 slows the growth of the primary tumor and increases mice survival. We furthermore demonstrated that Smad7 expression does not affect *in vitro* osteosarcoma cell proliferation but affects the microarchitectural parameters of bone. In addition, Smad7-osteosarcoma bone tumors expressed lower levels of osteolytic factors such as RANKL, suggesting that Smad7 overexpression affects the "vicious cycle" established between tumor cells and bone cells by its ability to decrease osteoclast activity. Finally, we showed that Smad7 overexpression in osteosarcoma cells and the treatment of mice with SD208 inhibit the development of lung metastasis.

Conclusion: Taken together, these results demonstrate that the inhibition of the TGF β /Smad signaling pathway may be a promising therapeutic strategy against tumor progression of osteosarcoma, specifically against the development of lung metastasis. *Clin Cancer Res*; 20(19); 5097–112. ©2014 AACR.

Introduction

Osteosarcoma is the most common primary malignant bone tumor in children and adolescents with a second peak of incidence in adults over the age of 65 (1). Although several predisposing environmental (e.g., ionizing radiation) and genetic (e.g., *TP53*) factors have been identified (2), the exact etiology of this disease remains unknown (3). These rare tumors, believed to originate from mesenchymal cells forming the primitive bone, preferentially grow in the metaphysis of long bone (4). Approximately 20% of

patients have lung metastasis at initial diagnosis and an additional 40% will develop metastasis during the later stages of disease. The presence of metastasis at diagnosis is the most important predictor of disease-free survival with a 5-year survival rate of only 20% for osteosarcoma patients with metastasis compared with 65% for patients with localized disease (5). The standard treatment of osteosarcoma consists of complete surgical resection associated with neoadjuvant and adjuvant chemotherapy composed of 4 agents: doxorubicin, cisplatin, methotrexate or ifosfamide (6). These combined treatment protocols have significantly improved survival of the nonmetastatic patients over the past several decades (7, 8). Unfortunately, such therapeutic strategies have a limited efficacy in the treatment of metastatic disease, and the metastatic relapse or recurrent conditions have remained unchanged over the last 3 decades (8). Treating metastatic osteosarcoma thus remains a challenge in bone cancer (9).

Transforming growth factor- β (TGF β) family members are a class of cytokines that control a variety of biologic processes, including proliferation, differentiation, extracellular matrix production, and apoptosis. Three isoforms of TGF β exist in mammals: TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3.

¹INSERM, UMR 957, Equipe labellisée Ligue contre le Cancer 2012, Nantes, France. ²Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Nantes, France. ³CHU Hôtel Dieu, Nantes, France. ⁴Inserm Liliane Bettencourt School, Paris, France. ⁵Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.

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

Corresponding Author: Franck Verrecchia, INSERM, UMR 957, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44000 Nantes, France. Phone: 33-240412842; Fax: 33-240412860; E-mail: franck.verrecchia@inserm.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3191

©2014 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

We have demonstrated that the TGF β /Smad signaling pathway plays a crucial role in osteosarcoma metastatic progression. We have first shown that TGF β levels are higher in serum samples from patients with osteosarcoma compared with healthy volunteers and that the TGF β /Smad3 signaling pathway is activated in clinical samples of patients. Second, using a murine model of osteosarcoma, we demonstrated that blocking the TGF β /Smad signaling pathway via overexpression of inhibitory Smad slows the growth of the primary bone tumor mainly by affecting the tumor microenvironment by controlling the "vicious cycle" established between tumor cells and bone cells. Third, blocking TGF β signaling inhibits the development of lung metastasis at least by inhibition of cell migration and invasion. Here, we show for the first time that blocking TGF β signaling represents a novel therapeutic approach for the treatment of lung metastasis in patients with osteosarcoma, which has a poor prognosis.

Dimers of TGF β initiate the canonical signaling cascade via the serine/threonine kinase receptor cell surface complexes (T β RI and T β RII), which phosphorylate the ligand-specific receptor-activated Smads (R-Smad: Smad2 or Smad3). Upon phosphorylation by type I receptors, R-Smads form a heteromeric complex with the Common-Smad, Smad4. The R-Smad/Smad4 complex then translocates to the nucleus to regulate gene transcription (10–13). A third group of Smad proteins, the inhibitory Smads (Smad7), inhibits the canonical Smad signaling (14, 15) by different means; Smad7 (i) binds T β RI and prevents R-Smad phosphorylation, (ii) recruits E3-type ubiquitin ligases to the receptor complexes ultimately leading to their degradation, and (iii) interacts with GADD34, the regulatory subunit of the protein phosphatase PP1 to inactivate T β RI (10–16).

The role of TGF β in cancer is complex. During the first stages of the development of primitive tumors from epithelial origin, the TGF β /Smad cascade acts as a tumor suppressor mainly through inhibition of cell proliferation and/or promotion of cell apoptosis (11, 12, 17). Contrarily, during the later stages, the TGF β cascade promotes tumor progression mainly by its ability to stimulate epithelial-to-mesenchymal transition, tumor invasion, metastatic dissemination, and/or evasion of the immune system (12, 13, 17). With regard to bone cancers, most studies have focused on the role of TGF β in the development of bone metastasis. The contributions of TGF β to breast cancer and melanoma bone metastasis have been well described (18–21). TGF β promotes bone metastasis by its ability to promote the metastatic process by stimulating MMP2 production and thus promoting cellular invasion of melanoma (19, 20). It has been reported that TGF β contributes to the establishment of a vicious cycle

between epithelial tumor cells and bone cells. Briefly, the tumor cells secrete osteoclast-activating factors that promote bone degradation, thus stimulating the release of factors which in turn will promote bone metastasis development (22, 23). In this context, it has been shown that overexpression of the TGF β inhibitor Smad7 in melanoma cells reduces the development of melanoma bone metastasis, and that the use of chemical inhibitors targeting T β RI reduces the development and progression of both melanoma and breast cancer bone metastasis (21). With regard to primary bone sarcomas, few studies have described the role of TGF β on tumor development. It has been shown that the production of TGF β 1 is associated with high-grade osteosarcoma (24, 25) and that TGF β stimulates the growth of several osteosarcoma cell lines in culture (26), suggesting that TGF β could favor osteosarcoma development.

In this study, we particularly demonstrate that the overexpression of the inhibitory Smad, Smad7, in osteosarcoma cells and treatment of mice with a specific inhibitor of T β RI (SD-208) block the development of osteosarcoma lung metastasis.

Materials and Methods

Measurement of circulating TGF β levels in serum

The levels of circulating TGF β s were measured in serum from healthy controls ($n = 20$) from the Etablissement Français du Sang (EFS) and patients with osteosarcoma ($n = 40$) from the OS 2006 protocol (PAC SARCOMÉ, Sarcome 09/0603, EudraCT No. 2006-00337727) with the Bio-Plex Pro Assay TGF β Standard 3-Plex system (Bio-Rad). Serum samples were obtained with written informed consent.

Cell cultures and reagents

HOS and SaOS2 osteosarcoma cells were purchased from ATCC (CRL-1544 and HTB-85, respectively) and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone Perbio). All cell lines were authenticated by short tandem repeat (STR) profiling. TGF β 1 and BMP-6, and G418 were, respectively, from R&D System Inc. and Sigma. SD-208 has been synthesized by the laboratory CEISAM UMR6230, Nantes University (France).

Western blot analysis

Western blot analysis were performed as previously described (27). Membranes were immunoblotted with anti-phospho-Smad3 (Millipore), anti-Smad3 (Millipore), anti-Smad7 (Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-Erk (Cell Signaling Technology), anti-Erk (Cell Signaling), or anti- β -actin (Sigma) antibodies.

Proliferation assay

Cell growth and viability were determined by using a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) Reagent Assay Kit (Roche Molecular Biomedicals).

Table 1. Primer sequence for quantitative RT-PCR

	Sens	Antisens
<i>ANGPTL4</i>	gAC CCg gCT CAC AAT gTC	CCC TgA ggC Tgg ATT TCA
<i>Col1A1</i>	CTg gAC CTA Aag gTg cTg cT	gCT CCA gCC TCT CCA TCT TT
<i>CTGF</i>	CTC CTg Cag gCT AgA gAA gC	gAT gCA CTT TTT gCC CTT CTT
<i>CXCR4</i>	CCg Agg AAA Tgg gCT CAG ggg A	TgA Tgg AgT AgA Tgg Tgg gCA ggA
<i>GAPDH</i>	Tgg gTg TgA ACC Atg AgA AgT Atg	ggT gCA ggA ggC ATT gCT
<i>ID1</i>	AAT CAT gAA AgT CgC Cag Tg	ATg TCg Tag AgC AgC ACg TTT
<i>IL11</i>	gCA gCg gAC Agg gAA ggg TTA A	ACA ggC TCA gCA CgA CCA gg
<i>MMP2</i>	AgA Agg CTg TgT TCT TgT CAG	Agg CTg gTC AgT ggC TTg
<i>OPN</i>	gAg ggC TTg gTT gTC AgC	CAA TTC TCA Tgg Tag TgA gTT TTC C
<i>PAI-1</i>	Cag ACC Aag AgC CTC TCC AC	ATC ACT Tgg CCC Atg AAA Ag
<i>RANKL</i>	TCg TTg gAT CAC AgC ACA TCA	TCg TTg gAT CAC AgC ACA TCA
<i>VEGF</i>	CTT gCC TTg CTg CTC TAC CTC C	CAT CCA TgA ACT TCA CCA CTT CgT

Real-time polymerase chain reaction

Total RNA from cell lines was extracted using NucleoSpinRNAII (Macherey Nagel). Total RNA from tumors was extracted using the TRizol reagent (Invitrogen Life Technologies) after mechanical grinding with Turrax (IKA). qRT-PCR were performed as previously described (27). Primer sequences are provided in Table 1.

Transient cell transfections, reporter assays, and plasmid constructs

Transient cell transfections were performed with jetPEI (polyplus-transfection). The pRLMPLP-*Renilla* luciferase expression vector was cotransfected in all experiments to monitor transfection efficiencies. Luciferase activity was determined with the dual-luciferase reporter assay system (Promega). The (CAGA)₉-Luc construct was used as a reporter construct specific for Smad3/4-driven signaling (28). The pcDNA-Smad7 vector is a kind gift from Dr. Alain Mauviel (19).

Osteosarcoma mouse model

Four-week-old female Rj:NMRI-nude mice (Elevages Janvier) were maintained under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA Pays de la Loire No. 06; project authorization No. CEEA-2010-23) and under the supervision of authorized investigators. The mice were anesthetized by inhalation of an isoflurane/air mixture (1.5%, 1 L/min) before receiving an intramuscular injection of 1×10^6 HOS or SaOS2 osteosarcoma cells in close proximity to the tibia, leading to a rapidly growing tumor in soft tissue with secondary contiguous bone invasion. One day after HOS cells injection, some mice received different doses (20 or 60 mg/kg) of SD-208 or control vehicle by daily gavage. The tumor volume (V) was calculated from the measurement of 2 perpendicular diameters using a caliper, according to the following formula: $V = 0.5 \times L \times (S)^2$, as previously described (29). Mice were sacrificed when the tumor volume reached 2,500 mm³ for ethical reasons.

Under these conditions, pulmonary metastasis developed when tumor volumes were $\geq 2,000$ mm³.

Micro-CT analysis

Analysis of bone microarchitecture was performed as previously described (27) at different tumor volumes (250, 1,000, and 2,500 mm³). All tibiae/fibulae were scanned using the same parameters (pixel size 18 μ m, 50 kV, 0.5-mm Al filter, and 0.8 degrees per rotation step). Three-dimensional reconstructions and analysis of bone parameters were performed using the CTvol and CTan software (Skyscan).

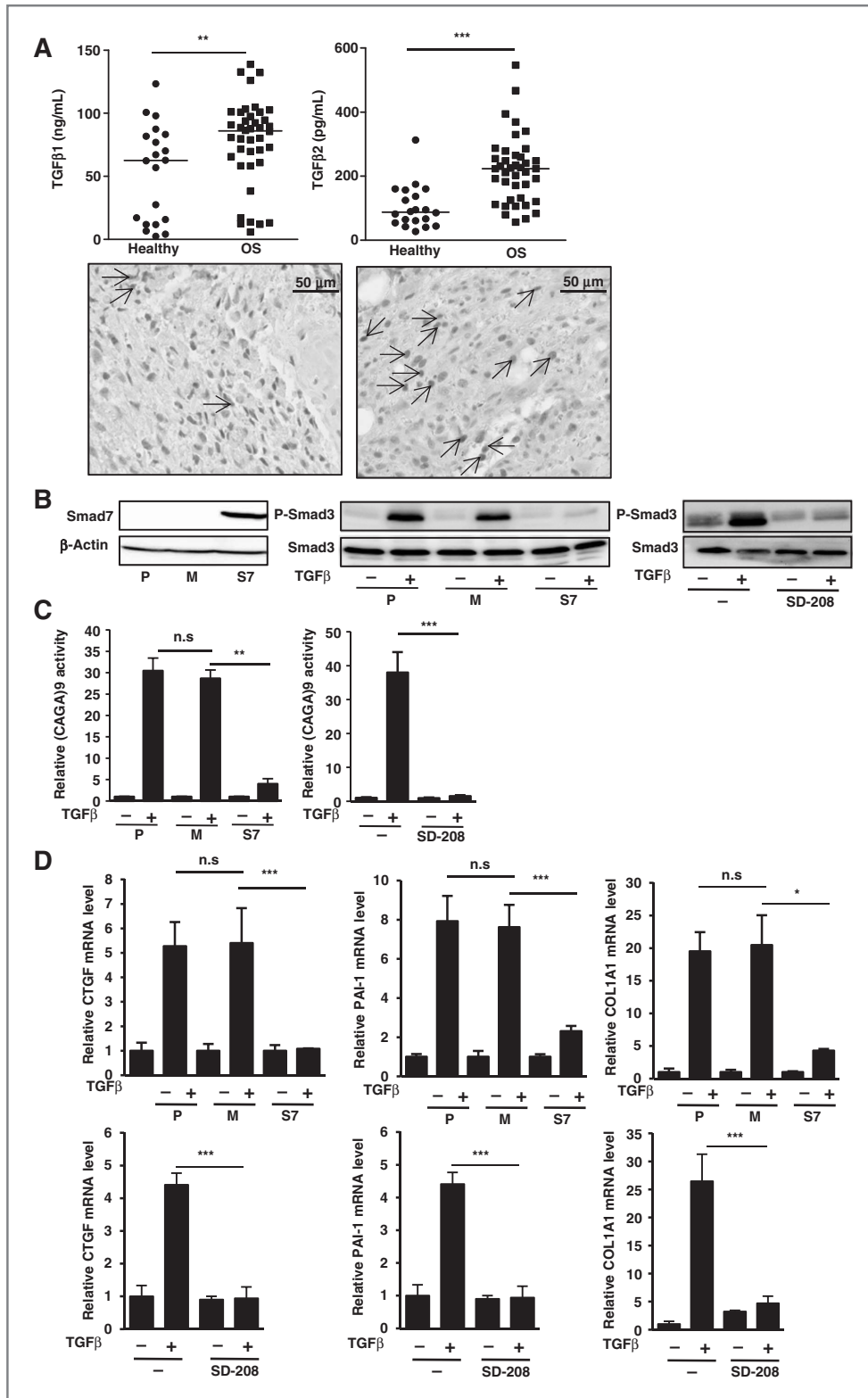
Histologic analysis

After sacrifice, the tibiae were conserved and fixed in 10% buffered formaldehyde, decalcified (4% EDTA, 0.2% paraformaldehyde, pH 7.4), and embedded in paraffin. Three-micrometer sections of tumor-bearing tibiae were cut and stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) to analyze osteoclast activity. Lungs were fixed in 10% buffered formaldehyde and embedded in paraffin. Lung sections (3- μ m-thick) were mounted on glass slides and stained with hematoxylin–eosin (HE).

Immunohistochemistry of human and mice tumor samples

Three-micrometer sections of human tumor tissues (embedded in paraffin) were cut and stained for phospho-Smad3 using rabbit polyclonal anti-phospho-Smad3 antibody (Abcam). Patient tumor clinical samples collected at Nantes University Hospital (Nantes, France) were obtained following patient informed consent and after ethical approval by the Nantes University Hospital Ethics Committee.

Sections (3 μ m) of mice tumor tissues (embedded in paraffin) were cut and stained for osterix, RANKL, osteocalcin, caspase-3, Ki67, and CD146 using, respectively, rabbit polyclonal anti-osterix (Abcam), anti-RANKL (Santa Cruz Biotechnology), anti-osteocalcin (Abcam), anti-caspase-3 (Cell Signaling), anti-Ki67 (Dako), anti CD146 (Abcam) antibodies. Immunodetection was performed



using DAB Substrate-Chromogen (Dako) and counter-stained with hematoxylin.

Collagen degradation

The degradation of collagen was evaluated by the measure of pyridinoline excretion in mice serum using the MicroVue Serum PYD EIA Kit.

Transwell motility and invasion

Osteosarcoma cells (30,000 cells/well) were pretreated with 5 ng/mL TGF β in the presence or absence of SD-208 (10 μ mol/L) for 24 hours and seeded onto the upper surface of transwell inserts (Falcon) coated with 0.1 mg/mL of growth factor-reduced Matrigel (Biocoat; BD Biosciences) for the invasion assay, or on uncoated transwells (migration assay) and incubated at 37°C for 48 hours. At the end of the incubation period, cells on the upper surface of the inserts were wiped off, and the cells on the underside of the membrane were fixed, stained with "crystal violet" and counted by bright-field microscopy in 5 random fields.

Gelatin zymography

Cells were cultured for 48 hours without serum and their conditioned media were analyzed by gelatin zymography in 10% polyacrylamide gels containing 1 mg/mL gelatin (Sigma-Aldrich) as described previously (19).

Statistical analysis

All analyses were performed using GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software). Results of *in vitro* experiments were analyzed with the unpaired *t*-test and are given as means \pm SD. For *in vivo* experiments, results from groups overexpressing Smad7 were compared with control groups (parental and mock) and results from mice treated with SD-208 were compared with untreated mice using the unpaired *t*-test and are given as means \pm SEM. Results of animal survival were analyzed using the log-rank test. Results with $P < 0.05$ were considered significant.

Results

High levels of TGF β 1 and TGF β 2 are measured in serum samples from patients with osteosarcoma

TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3 levels were measured in the serum samples of 40 patients with osteosarcoma and com-

pared with 20 age-matched healthy volunteers. As shown in Fig. 1A (top), TGF β 1 (left) and TGF β 2 (right) concentrations measured in the serum were significantly higher in the serum samples of patients with osteosarcoma compared with healthy volunteers ($P < 0.01$ and $P < 0.0001$ for TGF β 1 and TGF β 2, respectively). Note that the TGF β 3 serum levels were very low, under the limit of detection in our experimental conditions (not shown). Second, immunohistochemical experiments were performed to analyze the levels of phospho-Smad3 in 6 clinical samples of patients with osteosarcoma. As shown in Fig. 1A (bottom), a high level of phospho-Smad3 was detected in the nucleus of osteosarcoma cells, demonstrating the activation of the TGF β /Smad3 cascade. Interestingly, this level of phospho-Smad3 was higher in clinical samples from patients with pulmonary metastasis than without pulmonary metastasis at diagnosis (Fig. 1A, right vs. left).

Overexpression of Smad7 and a chemical inhibitor of T β RI (SD-208) block the TGF β /Smad3 signaling pathway in osteosarcoma cells

To evaluate the effect of Smad7 overexpression on osteosarcoma growth and progression, 2 human osteosarcoma cell lines (HOS and SaOS2) were stably transfected with either empty pcDNA or pcDNA-Smad7 encoding *Smad7*. First, endogenous Smad7 was not detectable in either parental or mock-transfected HOS and SaOS2 cells, whereas Smad7-transfected osteosarcoma cells expressed high levels of the protein (Fig. 1B, left and Supplementary Fig. S1A). Second, Smad7 expression inhibits the ability of TGF β to induce the phosphorylation of Smad3 (Fig. 1B, middle), to transactivate the Smad3/4-specific reporter construct (CAGA)₃-luc (Fig. 1C, left), and to stimulate the expression of *CTGF*, *PAI-1*, and *COL1A1* (Fig. 1D, top). Similar results were obtained with the SaOS2 cell line (Supplementary Fig. S1). Note that the overexpression of Smad7 partially inhibits a BMP-specific target gene such as *ID1* (Supplementary Fig. S1C) but not the ability of TGF β to induce the activation of MAPKs such as ERK_{1/2} (Supplementary Fig. S1D). To specifically target the TGF β cascade, we secondly studied the effect of a T β RI inhibitor, the chemical compound SD-208. As expected, SD-208 (10 μ mol/L) effectively blocks the ability of TGF β to induce

Figure 1. Evaluation of TGF β levels in serum of patients with osteosarcoma. Overexpression of Smad7 and SD-208 in HOS cells block the TGF β /Smad3 cascade. A, top, comparison of TGF β 1 (left) and TGF β 2 (right) levels in serum from healthy age-matched controls ($n = 20$) or patients with osteosarcoma ($n = 40$; median; ***, $P < 0.005$; **, $P < 0.01$); bottom, clinical tumor samples of patients with osteosarcoma with ($n = 3$, right) or without ($n = 3$, left) pulmonary metastasis at diagnosis were immunostained with phospho-Smad3 antibody. One representative photomicrograph per group is shown. Arrows indicate the localization of P-Smad3 in the nucleus of osteosarcoma cells. B, left: Smad7 production was detected by Western blot analysis in HOS cells [parental (P), mock- (M), and Smad7-transfected cells (S7)]; middle: phospho-Smad3 and Smad3 were detected by Western blot analysis in parental (P), mock- (M), and Smad7-transfected (S7) HOS cells treated or not with TGF β 1 (5 ng/mL) for 15 minutes; right: parental HOS cells were treated with TGF β (5 ng/mL, 15 minutes) in the presence or absence of SD-208 (10 μ mol/L). After incubation, phospho-Smad3 and Smad3 levels were detected by Western Blot analysis of whole cell lysates. C, cells were transfected with the Smad3/4-specific construct (CAGA)₃-luc. Twenty-four hours after transfection, TGF β (5 ng/mL) was added and incubation was continued for another 48 hours in the presence or absence of SD-208 (10 μ mol/L) as indicated. Bars, means \pm SD of at least three independent experiments, each performed in duplicate (***, $P < 0.005$; **, $P < 0.01$). D, cells were treated with TGF β 1 (5 ng/mL) for 6 or 24 hours in the presence or absence of SD-208 (10 μ mol/L as indicated). After incubation, mRNA steady-state levels of the specific TGF β target genes *CTGF* (6 hours), *PAI-1* (24 hours), and *COL1A1* (24 hours) were determined by quantitative RT-PCR. Bars, means \pm SD of at least three independent experiments, each performed in duplicate (***, $P < 0.005$; *, $P < 0.05$).

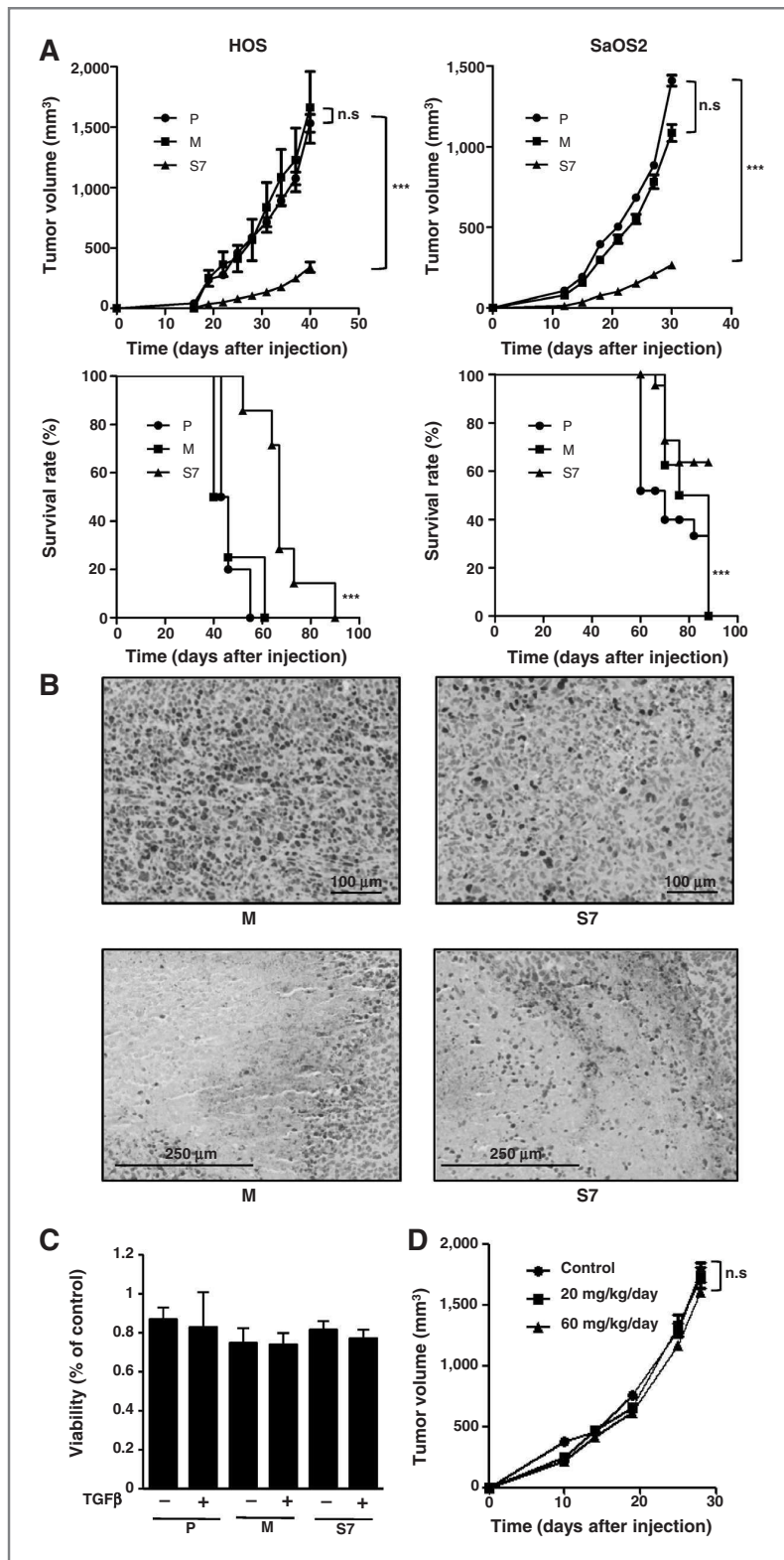


Figure 2. Overexpression of Smad7 inhibits tumor growth in the HOS and SaOS2 osteosarcoma models and improves animal survival. **A**, mice were injected either with 1×10^6 parental (P), mock- (M), and Smad7-transfected (S7) HOS cells ($n = 10$ for parental, $n = 4$ for mock, and $n = 7$ for Smad7 cells, left) or with 1×10^6 parental (P), mock- (M), and Smad7-transfected (S7) SaOS2 cells ($n = 22$ for parental, $n = 8$ for mock, and $n = 22$ for Smad7 cells, right). The results are representative of 2 independent experiments (mean \pm SEM; ***, $P < 0.005$). Top, the mean tumor volumes were calculated from day 1 to day 40 for HOS group (left) or from day 1 to day 30 for SaOS2 group (right). Bottom, overall survival rates for each groups. The survival rates were calculated from day 1 to day 90, when the last mouse was euthanized (in the Smad7 group). **B**, tumor samples (tumor sizes at 250 mm^3) of the mock and Smad7 HOS group were fixed, embedded in paraffin, sectioned, and stained with Ki67 (top) or caspase-3 (bottom). Representative photomicrographs per group for HOS osteosarcoma mice are shown. **C**, parental (P), mock- (M), and Smad7-transfected (S7) HOS cells were treated with TGF β 1 (5 ng/mL) for 6 days. After incubation, cell viability was evaluated by XTT test. Bars, means \pm SD of two independent experiments, each performed in 6 replicate. **D**, intramuscular paratibial injections of 1×10^6 HOS tumor cells were performed in 3 groups of nude mice (vehicle, SD-208 20 mg/kg/day and SD-208 60 mg/kg/day, $n = 6$ mice for each group). The mean tumor volumes were calculated from day 1 to day 28.

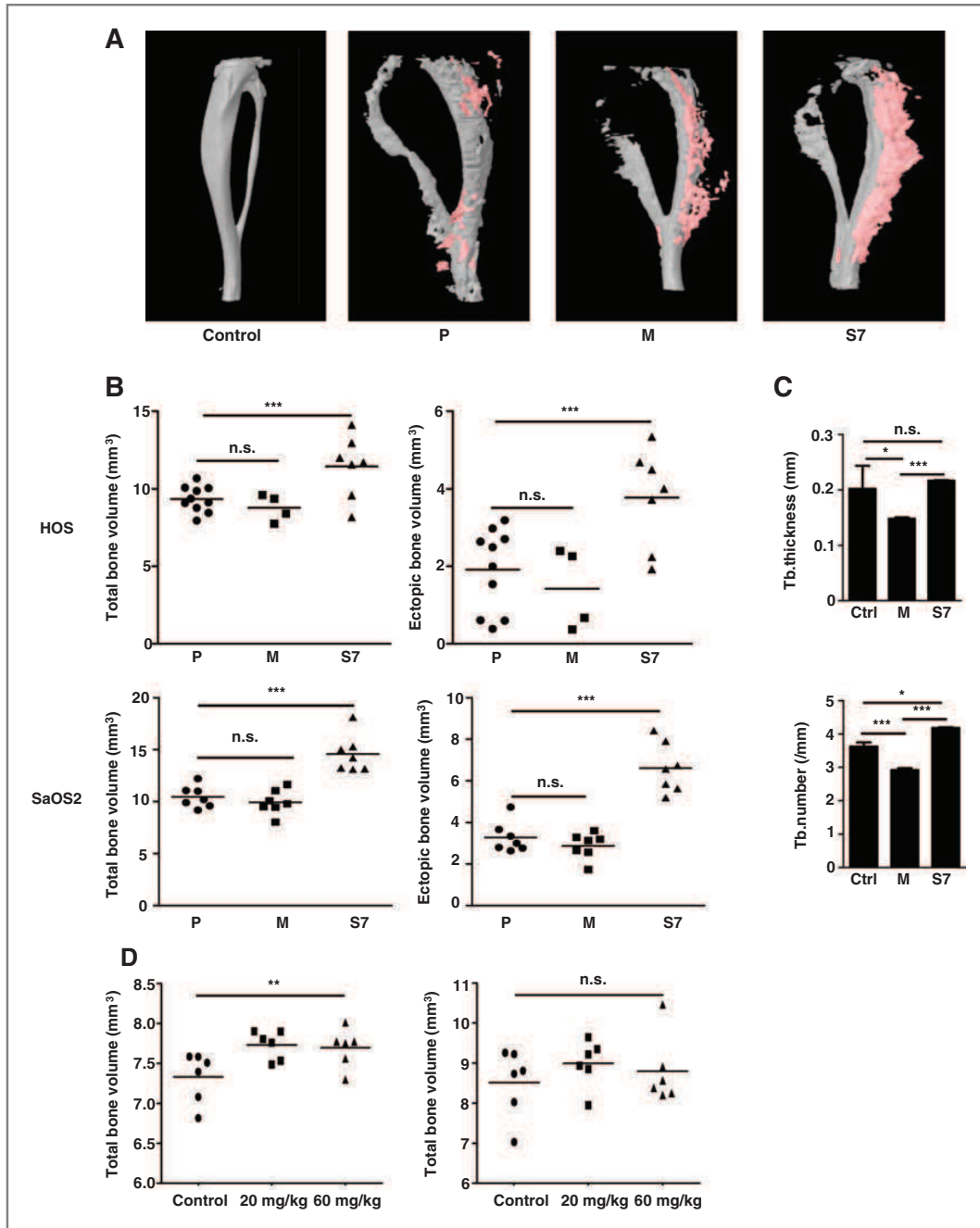
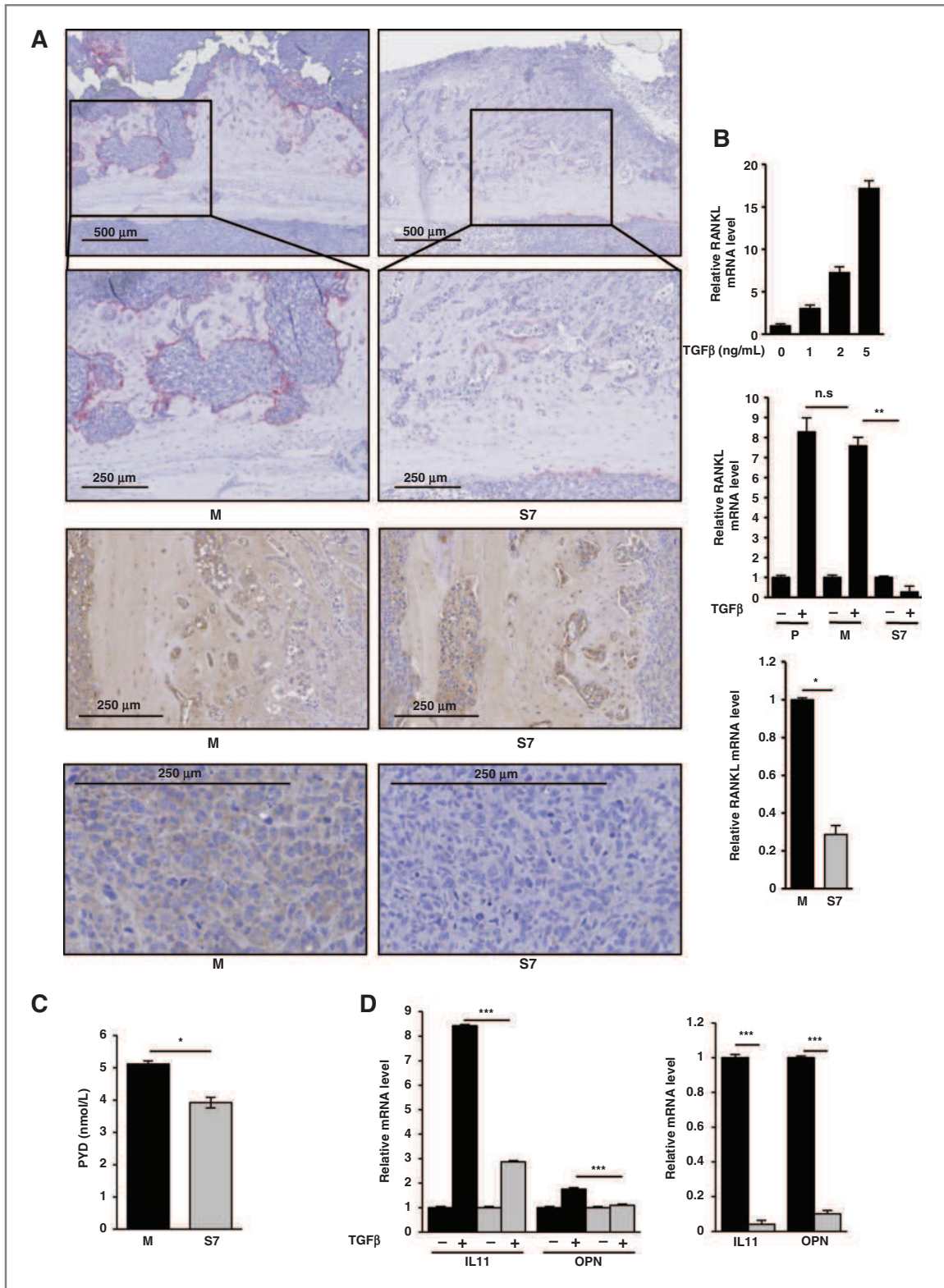


Figure 3. Overexpression of Smad7 in tumor cells inhibits tumor-associated bone resorption. Mice were either injected with 1×10^6 parental (P), mock- (M), and Smad7-transfected (S7) HOS cells ($n = 10$ for parental, $n = 4$ for mock and $n = 7$ for Smad7 cells) or with 1×10^6 parental (P), mock- (M), and Smad7-transfected (S7) SaOS2 cells ($n = 7$ for parental, $n = 7$ for mock, and $n = 7$ for Smad7). The results are representative of 2 independent experiments. **A**, 3D reconstructions of one representative tibia/fibula of each group (parental, mock, and Smad7 HOS cells) were performed when tumor sizes were approximately 2,500 mm³ and compared with a healthy group bearing no tumors (control). **B**, left: graphs represent the total bone volume of each individual animal in a given group injected with either HOS cells (top) or with SaOS2 cells (bottom); **right**: graph represents the mean ectopic bone volume of each individual animal in a given group injected with either HOS cells (top) or with SaOS2 cells (bottom); **right**: graph represents the mean trabecular (Tb.) thickness (top) and the number of bone trabecular (bottom) in mock and Smad7 HOS groups compared with control group corresponding to mice bearing no tumors (**, $P < 0.005$; *, $P < 0.05$). **C**, histograms represent the mean trabecular (Tb.) thickness (top) and the number of bone trabecular (bottom) in mock and Smad7 HOS groups compared with control group corresponding to mice bearing no tumors (**, $P < 0.005$; *, $P < 0.05$). **D**, intramuscular paratibial injections of 1×10^6 HOS tumor cells were performed in 3 groups of nude mice (vehicle, SD-208 20 mg/kg/day and SD-208 60 mg/kg/day). The bone volumes of tibia were measured both at the leg having undergone the injection of tumor cells (right) and at the counterpart legs (left) when tumor volume reached 1,000 mm³. Graphs represent the bone volume of each individual animal in a given group (**, $P < 0.01$).



the phosphorylation of Smad3 (Fig. 1B, right), to transactivate the Smad3/4-specific reporter construct (CAGA)₃-luc (Fig. 1C, right), and to stimulate the expression of *CTGF*, *PAI-1*, and *COL1A1* (Fig. 1D, bottom) in HOS cells and in SaOS2 cells (Supplementary Fig. S1). Note that in contrast to Smad7 overexpression, the SD-208 inhibitor is able to block the ability of TGF β to activate the phosphorylation of ERK_{1/2} (Supplementary Fig. S1D, bottom).

These results confirmed that both Smad7 overexpression and SD-208 block the TGF β /Smad3 cascade in osteosarcoma cells.

Overexpression of Smad7 in osteosarcoma cell lines dramatically inhibits *in vivo* tumor growth

A preclinical experimental model of osteosarcoma induced by paratibial injection of osteosarcoma cells was developed. Smad7 overexpression in HOS or SaOS2 cells inhibited tumor growth in both models (Fig. 2A, top). The mean tumor size at day 40 in mice injected with parental or mock-transfected HOS cells was $1,531.8 \pm 73.4 \text{ mm}^3$ and $1,663.9 \pm 297.0 \text{ mm}^3$ respectively, compared with only $341.5 \pm 43.4 \text{ mm}^3$ in mice injected with HOS-S7 cells (means \pm SEM, $P < 0.005$; Fig. 2A, top HOS panel). Similar results were obtained in the SaOS2 model (Fig. 2A, top SaOS2 panel). Consequently, Smad7 overexpression resulted in an increased animal survival in both models (Fig. 2A, bottom). In this context, immunohistochemical staining for the proliferative marker Ki67 in tumor samples from mice showed that Smad7 overexpression decreased cell proliferation as compared with the mock-transfected group (Fig. 2B, top) when the tumor sizes reached 250 mm^3 . By contrast, caspase-3 immunostaining of the same samples showed no significant difference between mice injected with Smad7-transfected cells and animals receiving mock-transfected cells (Fig. 2B, bottom). To better understand the mechanisms underlying the effect of Smad7 on osteosarcoma tumor growth, we next carried out *in vitro* experiments. Interestingly, treatment of osteosarcoma cells with TGF β (5 ng/mL) did not affect osteosarcoma cell proliferation even after 6 days of TGF β treatment, whether the cells expressed Smad7 or not (Fig. 2C). In contrast to the effect of Smad7 overexpression, the treatment of mice with SD-

208 (20 or 60 mg/kg/day) does not affect the *in vivo* tumor growth of osteosarcoma (Fig. 2D).

These results demonstrate that overexpression of Smad7 reduced *in vivo* tumor growth and suggest that this effect is not because of a direct effect of Smad7 on osteosarcoma cell proliferation.

Smad7 overexpression in HOS and SaOS2 osteosarcoma cells inhibits tumor-associated bone resorption

Because osteosarcoma-associated alteration of bone remodeling plays a central role in the development and progression of osteosarcoma bone tumors, we evaluated the ability of Smad7 and SD-208 to alter tumor-associated bone remodeling. The microarchitecture of bone in mice bearing osteosarcoma tumors was first examined when the tumor sizes reached $2,500 \text{ mm}^3$ using a high-resolution X-ray micro-CT system.

Visual inspection of the 3D reconstructions of the tibia suggests that Smad7 overexpression enhanced the tumor-associated bone formation in HOS osteosarcoma models (Fig. 3A). Indeed, the total bone volume in mice injected with parental or mock-transfected HOS cells was 9.34 ± 0.08 and $8.77 \pm 0.15 \text{ mm}^3$ respectively, compared with $11.44 \pm 0.28 \text{ mm}^3$ in mice bearing HOS-S7 tumors ($P < 0.005$; Fig. 3B, HOS left panel). Similarly, Smad7 overexpression enhanced total bone volume in mice injected with SaOS2 cells (Fig. 3B, SaOS2 left panel).

We next determined whether this increase in total bone volume was due either to direct new bone formation (ectopic bone) and/or to an inhibition of bone resorption. As shown in Fig. 3B (HOS right panel), the ectopic bone volume in mice injected with parental or mock-transfected HOS cells was significantly lower than in mice bearing HOS-S7 tumors ($1.91 \pm 0.11 \text{ mm}^3$ and $1.43 \pm 0.26 \text{ mm}^3$ vs. $3.77 \pm 0.18 \text{ mm}^3$ respectively, $P < 0.005$). Similarly, Smad7 enhanced ectopic bone volume in the SaOS2 model ($P < 0.005$; Fig. 3B, SaOS2 right panel). We then analyzed the ability of Smad7 to alter bone osteolysis by evaluating the trabecular number (Tb.N) and trabecular thickness (Tb.Th) when tumor sizes were around 250 mm^3 , because at higher volumes ($1,000 \text{ mm}^3$ or $2,500 \text{ mm}^3$) trabecular bone is completely destroyed by the tumor cells (data not shown). As shown in Fig. 3C (top), mice injected

Figure 4. Overexpression of Smad7 in osteosarcoma reduces osteoclast activity. A, tumor samples (tumor sizes at $1,000 \text{ mm}^3$) of the mock and Smad7 group were fixed, embedded in paraffin, sectioned, and stained for TRAP (red stained cells, top), osteocalcin (middle), and RANKL (bottom). Representative photomicrographs per group for HOS osteosarcoma mice are shown. B, *RANKL* mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR in the presence or absence of TGF β as indicated. Bars, mean \pm SD of at least three independent experiments carried out in duplicate (top). Parental (P), mock- (M), and Smad7-transfected (S7) HOS cells were treated with TGF β 1 (5 ng/mL) for 24 hours. After incubation, *RANKL* mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR (middle). RNA was extracted from tumor biopsies of mice injected with mock- (black) or Smad7 (gray) transfected HOS cells. *RANKL* mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR (bottom). Bars, means \pm SD of at least 3 independent experiments, performed in duplicate (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). C, concentrations of pyridinoline in mice serum of the mock and Smad7 groups were measured using the MicroVue Serum PYD EIA Kit. Bars, means \pm SEM of two independent experiments, performed in duplicate (*, $P < 0.05$). D, left: treatment of mock- (black) and Smad7-transfected (gray) HOS cells with TGF β 1 (5 ng/mL) for 24 hours. After incubation, *IL11* and *OPN* mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. Bars, mean \pm SD of at least 3 independent experiments carried out in duplicate (***, $P < 0.005$); right: RNA was extracted from tumor biopsies of mice injected with mock- (black) and Smad7 (gray) transfected HOS cells. *IL11* and *OPN* mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. Bars, mean \pm SD of 2 independent experiments carried out in duplicate (***, $P < 0.005$).

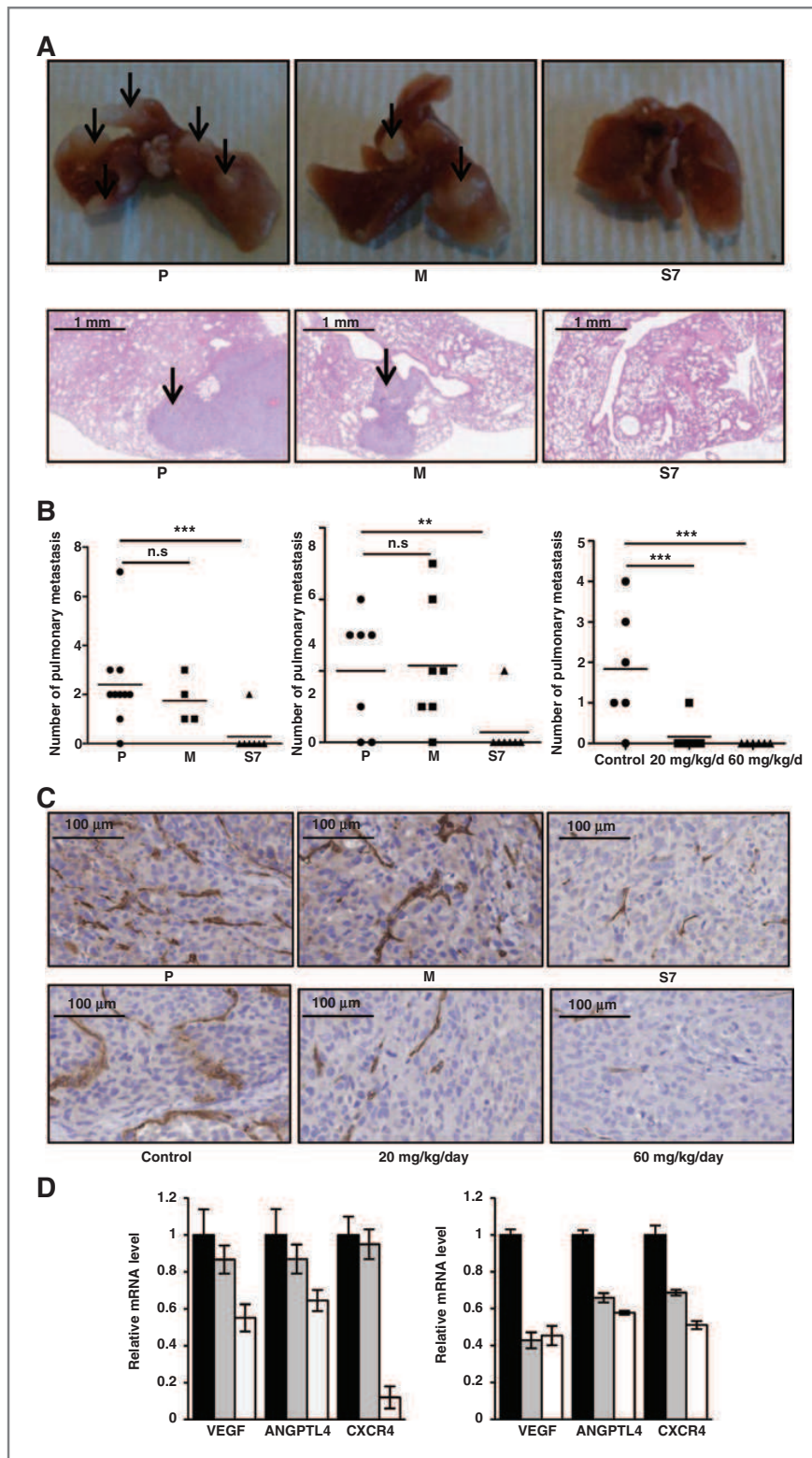


Figure 5. Overexpression of Smad7 in osteosarcoma and treatment of mice with SD-208 block lung metastasis development. Mice were either injected with parental (P), mock- (M), and Smad7-transfected (S7) osteosarcoma cells (HOS or SaOS2) or injected with parental-HOS cells and treated with vehicle or SD-208 as indicated. Mice were sacrificed when tumor sizes reached 2,500 mm³ and lungs were removed. **A**, photographs of representative lungs of P, M, and S7 HOS group. Arrows point to lung metastasis (top). H&E staining of lungs. Arrows indicate metastatic tumor cells (bottom). **B**, graphs indicate individual (dots) and mean (lines) numbers of lung metastasis measured in lungs from each group (***, $P < 0.005$; **, $P < 0.01$), respectively for P, M, and S7-HOS model (left), P, M, and S7-SAOS2 model (middle) and for mice treated or not with SD-208 (right). **C**, tumor samples (tumor sizes at 2,500 mm³) of the P, M, and S7 group (top) and from mice treated or not with SD-208 as indicated (bottom) were fixed, embedded in paraffin, sectioned, and stained with CD146. Representative photomicrographs per group for HOS osteosarcoma mice are shown. **D**, RNA was extracted from tumor biopsies of mice injected with P (black), M (gray), and S7 (white) transfected HOS cells (left) or from tumor biopsies from mice treated with SD-208 at 20 mg/kg/day (gray), SD-208 at 60 mg/kg/day (white), or with vehicle (black; right). *VEGF*, *ANGPTL4*, and *CXCR4* mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. Bars, mean \pm SD of 2 independent experiments carried out in duplicate.

with mock-transfected HOS cells had a lower Tb.Th than mice bearing HOS-S7 tumors (0.15 ± 0.01 mm vs. 0.22 ± 0.01 mm, $P < 0.005$). Moreover, the Tb.N was also lower in the mock group than in the HOS-S7 tumor-bearing group (2.92 ± 0.03 mm vs. 4.18 ± 0.02 mm; $P < 0.005$; Fig. 3C, bottom). Note that Tb.Th and Tb.N in mice bearing HOS-S7 tumors are similar to those observed in healthy control mice. Interestingly, although the treatment of mice with SD-208 affects bone remodeling with a significant increase of tibia bone volume in the absence of tumor (Fig. 3D, left) as previously described (30), the SD-208 does not affect significantly the tumor-associated bone remodeling (Fig. 3D, right).

These results demonstrate that in contrast with SD-208 mice treatment, overexpression of Smad7 in osteosarcoma cells both decreased tumor-associated bone osteolysis and promoted tumor-associated bone formation.

Overexpression of Smad7 in HOS and SaOS2 osteosarcoma cells reduces osteoclast activity

The activity of osteoclasts and osteoblasts, 2 cell lineages implicated in bone remodeling, was then assessed during the early stages of tumor growth (tumor size ≤ 250 mm³ or $\leq 1,000$ mm³). TRAP staining in sections of tumor-bearing tibia showed that HOS-S7 tumor cells reduced the number of TRAP⁺ multinucleated cells at the interface between tumor and cortical bone (Fig. 4A, top) and in the growth plate (not shown), relative to the control conditions at the same tumor size (1,000 mm³). Similar results were obtained when tumors had reached 250 mm³ (data not shown). By contrast, osteocalcin (Fig. 4A, middle) and osterix (data not shown) immunostaining of the same samples showed no significant difference between mice injected with Smad7-transfected cells and animals receiving mock-transfected cells.

To understand the effect of Smad7 on osteoclast activity, we analyzed *RANKL* gene expression in HOS osteosarcoma cell lines. qRT-PCR analysis indicated that the mRNA steady-state level of *RANKL* was increased in response to TGF β and that Smad7 overexpression prevented such induction (Fig 4B, top and middle, respectively). Moreover, Smad7 overexpression decreased *RANKL* production by HOS tumor cells (Fig. 4A, bottom) evaluated by immunohistochemical experiments. In accordance with this observation, HOS-S7 bone tumors expressed significantly lower mRNA levels of *RANKL* (Fig. 4B, bottom). Finally, the degradation of collagen evaluated by the measure of pyridinoline excretion in mice serum is decreased when Smad7 is overexpressed in osteosarcoma cells (Fig. 4C).

In addition to *RANKL*, the expression of other TGF β target genes implicated in bone remodeling (18, 20, 21) such as *interleukin-11* (IL11) and *osteopontin* (OPN) is decreased when Smad7 is overexpressed. As shown in Fig. 4D, q-PCR analysis indicated that the *IL11* and *OPN* expressions were increased in response to TGF β and that Smad7 overexpression prevented such induction (Fig 4D, left). HOS-S7 bone tumors expressed signifi-

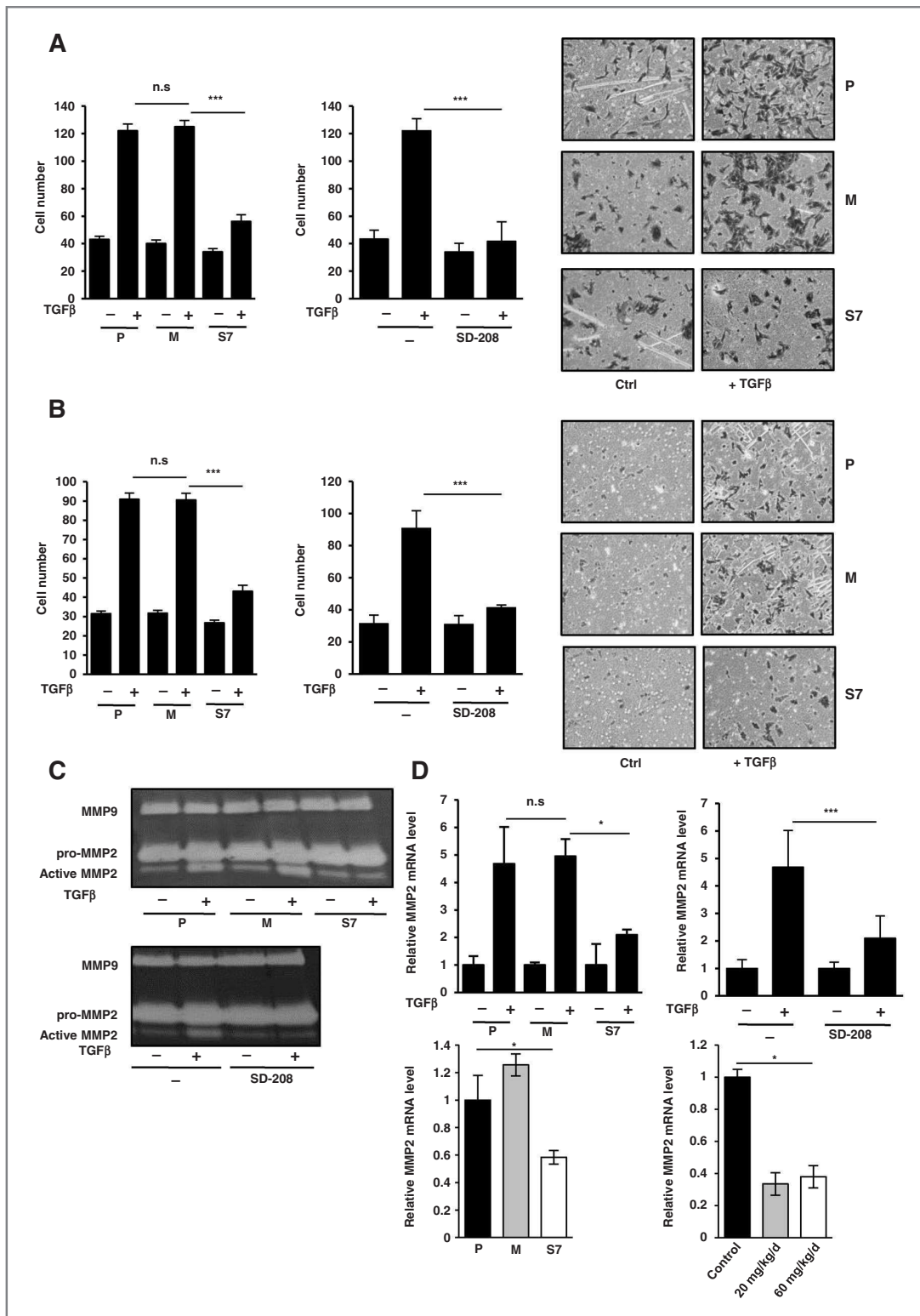
cantly lower levels of *IL11* and *OPN* mRNA (Fig. 4D, right).

These results demonstrate that Smad7 overexpression decreases osteoclast activity and thus bone osteolysis at least in part via the modulation of osteolytic genes such as *RANKL*.

Overexpression of Smad7 in HOS and SaOS2 osteosarcoma cells or treatment of mice with SD-208 inhibits dissemination of pulmonary metastasis

To evaluate the effect of Smad7 on pulmonary metastasis development (Fig. 5A), the lungs of mice were removed when primary tumor volumes reached 2,500 mm³. As shown in Fig. 5B, a high incidence of pulmonary metastasis was observed in mice inoculated with parental or mock-transfected HOS cells, respectively 9 of 10 (90%) and 4 of 4 (100%) mice. By contrast, only 1 of 7 (14%) mice bearing HOS-S7 cells developed lung metastasis (Fig. 5B, left). As shown in Fig. 5B (middle), similar results were obtained in the SaOS2 model. Remarkably, the treatment of mice with SD-208 inhibits the development of lung metastasis. As shown in Fig. 5B (right), 5 of 6 (83.3%) mice treated with vehicle (control group) developed lung metastasis. By contrast, only 1 of 6 (16.7%) mice treated with 20 mg/kg/day developed lung metastasis, and no mice treated with 60 mg/kg/day developed lung metastasis. Interestingly, immunohistochemical staining for the endothelial marker CD146 in mice tumor samples showed that Smad7 overexpression or SD-208 treatment dramatically decreased the angiogenic process as compared respectively with the parental and mock-transfected groups or with the untreated group (Fig. 5C). In addition, qPCR analysis from mice biopsies indicated that the expression by tumor cells of *VEGF* (implicated in the angiogenic process), and *CXCR4* and *ANGPTL4* (respectively identified as key players to prime breast cancer cells for metastasis toward the lungs and/or the bones) were both reduced when Smad7 was overexpressed or when mice were treated with SD-208 (Fig. 5D).

The influence of Smad7 overexpression in osteosarcoma cells or the treatment of tumor cells with SD-208 was then examined on several aspects of tumor cell behavior *in vitro*. As shown in Fig. 6 and in Supplementary Fig. S2, Smad7 overexpression in HOS and SaOS2 cells or treatment of HOS cells with SD-208 lead to a strongly reduced capacity of TGF β to stimulate cell migration (Fig. 6A and Supplementary Fig. S2A) and invasion (Fig. 6B and Supplementary Fig. S2B). In addition, exogenous TGF β -induced secretion of the active form of matrix metalloproteinase MMP2 was strongly diminished both in Smad7-transfected cells and in cells treated with SD-208 (Fig. 6C and supplementary Fig. S2C). qRT-PCR analysis indicated a reduction of TGF β -induced *MMP2* mRNA levels in Smad7-transfected- or SD-208-treated cells (Fig. 6D, top). *MMP2* mRNA steady-state levels were increased by approximately 5-fold in parental and mock-transfected HOS cells, but only by 2-fold in HOS-S7 cells after



treatment of osteosarcoma cells with TGF β (5 ng/mL) for 24 hours. Similar results were obtained when Smad7 was overexpressed in SaOS2 cells (Supplementary Fig. S2D) or when osteosarcoma cells were treated with SD-208 (Fig. 6D, right and Supplementary Fig. S2D, right). In addition, both HOS-S7 bone tumors and HOS cells from mice treated with SD-208 expressed significantly lower levels of MMP2 (Fig. 6D, bottom).

These results demonstrated that overexpression of Smad7 in osteosarcoma cells or treatment of mice with SD-208 blocks the formation of lung metastasis.

Discussion

Increased TGF β 1 mRNA and/or protein expression has been correlated with a wide range of cancers such as colorectal cancer, gastric carcinoma, or prostate cancer (31–34). This increase in serum TGF β 1 production and/or TGF β 1 staining in tumor cells has been associated with disease progression to metastasis in these carcinomas (31). Here, we demonstrated that high concentrations of TGF β 1 and TGF β 2 measured in serum of patients is associated with osteosarcoma disease. In addition, using clinical samples, we demonstrated that the Smad3 cascade is activated in osteosarcoma cells particularly in high-risk patients when lung metastasis are detected at diagnosis. Previous studies have reported that high levels of TGF β 1 mRNA in tumor cells are associated with high-grade osteosarcoma, which shows an aggressive behavior and frequently metastasizes to lung or other sites (24). These observations together with our results suggest that high levels of TGF β 1 in serum could be associated with a poor prognosis in osteosarcoma.

Following these observations, we first inhibited the Smad signaling cascade in osteosarcoma cells via the overexpression of the inhibitory Smad, Smad7, and then we used the chemical inhibitor of T β RI, SD-208, to specifically inhibit the signaling cascade downstream the

receptor T β RI. By using various *in vitro* approaches, we demonstrated that Smad7 overexpression and SD-208 efficiently inhibit the TGF β transcriptional response mediated by Smad3/4 in 2 human osteosarcoma cell lines, HOS and SaOS2.

Using a murine model of osteosarcoma induced by paratibial injection of osteosarcoma cells overexpressing Smad7, we then demonstrated that Smad7 overexpression slows primary tumor growth, a process associated with a reduction of the immunohistochemical staining for the proliferative marker Ki67. Because TGF β is a cytokine widely implicated in the control of cell proliferation (17), the effect of TGF β and overexpression of Smad7 was studied on osteosarcoma cell proliferation *in vitro*. In contrast to previous observations that demonstrated an effect of TGF β on cell proliferation (35, 36), no effect of TGF β and/or Smad7 overexpression was observed on the *in vitro* proliferation rate of osteosarcoma cells under our experimental conditions, suggesting that Smad7 does not directly affect the proliferation of osteosarcoma cells but rather affects the tumor microenvironment indirectly involved in the control of tumor cell proliferation.

In this context, because osteosarcoma-associated alterations of bone remodeling play a central role in the development and progression of osteosarcoma, we studied the effect of Smad7 on bone remodeling. We clearly demonstrated that Smad7 overexpression in osteosarcoma cells slows bone destruction associated with the tumor growth. In this context, we demonstrated that this process was mainly associated with a reduction of trabecular bone destruction during the early stages of tumor growth (when tumor volumes were below 250 mm³) and with an increase of ectopic bone formation during the late stages of tumor growth (when tumor volumes were greater than 1000 mm³). The presence of a "vicious cycle" established between tumor proliferation and paratumor osteolysis plays a crucial role in the

Figure 6. Overexpression of Smad7 in osteosarcoma cells or treatment of cells with SD-208 inhibit the ability of TGF β to induce osteosarcoma cell migration and invasion. A and B, left: 30,000 parental, mock-, or Smad7-transfected HOS cells pretreated during 24 hours with 5 ng/mL TGF β were seeded onto the upper surface of uncoated (A) or transwell coated with 2 μ g Matrigel (B) inserts. Forty-eight hours after incubation in the presence or absence of TGF β (5 ng/mL), the cells on the underside of the membrane were fixed, stained with "crystal violet," and counted by bright-field microscopy in 5 random fields (magnification: \times 200). Bars, mean \pm SD of at least 3 independent experiments carried out in duplicate (***, $P < 0.005$); middle: 30,000 parental HOS cells pretreated during 24 hours with 5 ng/mL TGF β in the presence or absence of SD-208 (as indicated) were seeded onto the upper surface of uncoated (A) or transwell coated with 2 μ g Matrigel (B) inserts. Forty-eight hours after incubation in the presence or absence of TGF β (5 ng/mL) and SD-208 (as indicated), the cells on the underside of the membrane were fixed, stained with "crystal violet," and counted by bright-field microscopy in 5 random fields (magnification: \times 200). Bars, mean \pm SD of at least 3 independent experiments carried out in duplicate (***, $P < 0.005$); right: photographs of representative random fields (magnification: \times 200) of each group. C, top: zymography analysis of conditioned media from 48 hours serum-free cultures of HOS-P, -M, and -S7 cells treated with 5 ng/mL TGF β or untreated. A Coomassie blue stained gel representative of 3 independent experiments is shown; bottom: zymography analysis of conditioned media from 48 hours serum-free cultures of HOS cells treated with 5 ng/mL TGF β in the presence or absence of SD-208 (10 μ mol/L). A Coomassie blue stained gel representative of 3 independent experiments is shown. D, top: HOS-P, -M, and -S7 cells were incubated with TGF β 1 (5 ng/mL) for 24 hours (left). HOS cells were incubated with TGF β 1 (5 ng/mL) in the presence or absence of SD-208 (10 μ mol/L) for 24 hours (right). After incubation, MMP2 mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. Bars, mean \pm SD of at least 3 independent experiments carried out in duplicate (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.005$). Bottom, RNA was extracted from tumor biopsies of mice injected with parental (black), mock- (gray), and Smad7- (white) transfected HOS cells (left). RNA was extracted from tumor biopsies of mice injected with HOS cells and treated with SD-208 at 20 mg/kg/day (gray), SD-208 at 60 mg/kg/day (white), or with vehicle (black; right). MMP2 mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. Bars, mean \pm SD of 2 independent experiments carried out in duplicate (*, $P < 0.05$).

development of primary bone tumors (37). Cancer cells produce soluble factors that activate directly or indirectly via osteoblasts, the osteoclast differentiation, and maturation (38, 39). In turn, during bone degradation, osteoclasts allow the release of growth factors stored in the mineralized bone matrix that are able to stimulate tumor growth. In this context, we demonstrated that the resulting increase in bone volume observed after Smad7 overexpression in osteosarcoma cells is due in large part to the inhibition of osteoclast activity. The decrease of TRAP activity at the growth plate level, which is not in direct contact with the tumor, suggests that Smad7 overexpression affects the ability of the tumor cells to produce a soluble factor able to regulate osteoclast activity. Here, we clearly demonstrated that Smad7 overexpression in osteosarcoma cells inhibits their ability to produce RANKL or IL11, 2 cytokines that play a central role in bone osteolysis process (40). Together, these results suggest that Smad7 slows the tumor growth by acting at least at the tumor environment level, by inhibiting the tumor associated bone osteolysis.

Surprisingly, we did not observe a significant effect of SD-208 on tumor growth. Several hypotheses can be proposed to explain this difference between Smad7 and SD-208 effects on tumor growth. First, we cannot rule out that Smad7 may also exert some of its action independently from its role as a TGF β signaling inhibitor. Indeed, Smad7 is able to inhibit other signaling pathways such as the cascade of bone morphogenetic protein family members (BMP), highly involved in bone formation (41). This hypothesis seems unlikely because the BMPs are known to promote bone formation. Thus, we can hypothesize that BMP inhibitors should promote bone degradation by inhibiting the bone formation in contrast to the results observed by overexpression of Smad7. Second, Smad7 might have several distinct functions in cellular signaling (12). For example it has been shown that Smad7 overexpression is able to potentiate apoptosis in prostate carcinoma and in PC-3U cells (12). In addition, Smad7 is also able to activate some signaling pathways such as the JNK cascade (42). Although we have not observed an effect of Smad7 on the proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells, or on the ability of TGF β to stimulate the MAPK pathway, we cannot rule out this hypothesis. Third, the inefficiency of SD-208 on tumor growth can be explained by its inability to reduce the tumor-associated bone osteolysis. Indeed, although a systemic treatment of mice with SD-208 promotes bone formation in absence of tumor as previously described (30), this systemic treatment does not seem to reduce the tumor associated bone osteolysis in contrast with the overexpression of Smad7 effect in osteosarcoma cells. In addition, the HOS mice model used in these experiments is a high aggressive model with a fast bone degradation associated with tumor growth. The effectiveness of a local mice treatment with SD-208 directly into the tumor cells using a less aggressive model should be tested.

Finally, we showed that both Smad7 overexpression and SD-208 strongly affect the ability of the primary bone tumor to develop lung metastasis, demonstrating the crucial role of TGF β /Smad signaling pathway in the metastatic process of osteosarcoma. During the last decades, the role of TGF β in the metastatic process of carcinomas has been widely described. A major step in this process is the ability of TGF β to stimulate epithelial-to-mesenchymal transition and thus the ability of tumor cells to invade adjacent tissues (17). In the context of osteosarcoma cells that are from mesenchymal origin, we specifically demonstrated that Smad7 overexpression and SD-208 block the ability of TGF β to stimulate osteosarcoma migration and invasion. In this context, we clearly demonstrated that Smad7 and SD-208 are able to block TGF β -induced MMP2 activity, mainly involved in the invasion process such as described in the context of melanoma bone metastasis (19, 20). Another major step in the metastatic process is the ability of TGF β to stimulate tumor-associated angiogenesis and thus the dissemination of tumor cells into the bloodstream (17). In this context, we clearly demonstrated that both Smad7 and SD-208 reduce the angiogenic process as shown by immunohistochemical staining for the endothelial marker CD146. In addition, both Smad7 and SD-208 inhibit TGF β -induced VEGF expression, mainly involved in the angiogenic process. Moreover, both Smad7 and SD-208 are able to inhibit the ability of TGF β to stimulate the expression of *ANGPT4* and *CXCR4* identified as key players to prime breast cancer cells for metastasis respectively toward the lungs (43) and toward the bones or the lungs (44).

In conclusion, this report provides evidence that blocking TGF β signaling may represent a novel therapeutic approach to treat lung metastasis in patients with osteosarcoma, which have a poor prognosis.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: A. Lamora, F. Redini, F. Verrecchia

Development of methodology: A. Lamora, J. Talbot, G. Bougras, J. Amiaud, M. Leduc, J. Chesneau, F. Verrecchia

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): A. Lamora, M.C. Le Deley, M.F. Heymann, F. Verrecchia

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): A. Lamora, J. Talbot, J. Amiaud, M. Leduc, J. Chesneau, D. Heymann, F. Redini, F. Verrecchia

Writing, review, and/or revision of the manuscript: A. Lamora, V. Stresing, D. Heymann, F. Redini, F. Verrecchia

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): A. Lamora, J. Talbot, J. Amiaud, M. Leduc, J. Chesneau, J. Taurelle, F. Verrecchia

Study supervision: A. Lamora, M.C. Le Deley, M.F. Heymann, F. Verrecchia

Acknowledgments

The authors thank Nicolas Pelletier, Arnaud Tessier, and Jacques Lebreton (CEISAM UMR6230, Nantes University, France) for the synthesis of SD-208.

Grant Support

This work was supported by INSERM, Ligue contre le Cancer (Allocation doctorale to A. Lamora), Ligue contre le Cancer (Equipe labellisée 2012), and Fondation Bettencourt Schueller.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked

advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received November 28, 2013; revised July 8, 2014; accepted July 18, 2014; published OnlineFirst August 8, 2014.

References

- Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer* 2009;125:229–34.
- Broadhead ML, Clark JCM, Myers DE, Dass CR, Choong PFM. The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review. *Sarcoma* 2011; 2011:1–12.
- Yarber JL, Agulnik M. Targeted therapies in bone sarcomas: current approach and future directions. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; 20:973–9.
- Meyers PA, Gorlick R. Osteosarcoma. *Pediatr Clin North Am* 1997; 44:973–89.
- Hughes DPM. Strategies for the targeted delivery of therapeutics for osteosarcoma. *Expert Opin Drug Deliv* 2009;6:1311–21.
- Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M, Kroep JR, Taminiu AHM, Hogendoorn PCW, et al. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? *Eur J Cancer* 2011;47: 2431–45.
- Ando K, Mori K, Corradini N, Redini F, Heymann D. Mifamurtide for the treatment of nonmetastatic osteosarcoma. *Expert Opin Pharmacother* 2011;12:285–92.
- PosthumaDeBoer J, Witlox MA, Kaspers GJL, van Royen BJ. Molecular alterations as target for therapy in metastatic osteosarcoma: a review of literature. *Clin Exp Metastasis* 2011;28: 493–503.
- Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 2007;369:1742–57.
- Feng X-H, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:659–93.
- Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685–700.
- Park SH. Fine tuning and cross-talking of TGF- β signal by inhibitory Smads. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:9–16.
- Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol* 2013;25:76–84.
- Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, et al. Identification of Smad7, a TGF- β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* 1997;389:631–5.
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF- β receptor and functions as an antagonist of TGF- β signaling. *Cell* 1997; 89:1165–73.
- Verrecchia F, Mauviel A, Farge D. Transforming growth factor- β signaling through the Smad proteins: role in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2006;5:563–9.
- Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J Pathol* 2011;223:205–18.
- Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, et al. TGF- β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 1999;103: 197–206.
- Javelaud D, Delmas V, Möller M, Sextius P, André J, Menashi S, et al. Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells inhibits their tumorigenicity *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 2005; 24:7624–9.
- Javelaud D, Mohammad KS, McKenna CR, Fournier P, Luciani F, Niewolna M, et al. Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis. *Cancer Res* 2007;67: 2317–24.
- Mohammad KS, Javelaud D, Fournier PGJ, Niewolna M, McKenna CR, Peng XH, et al. TGF- β -RI kinase inhibitor SD-208 reduces the development and progression of melanoma bone metastases. *Cancer Res* 2011;71:175–84.
- Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002;2:584–93.
- Kozlow W, Guise TA. Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005;10:169–80.
- Franchi A, Arganini L, Baroni G, Calzolari A, Capanna R, Campanacci D, et al. Expression of transforming growth factor- β isoforms in osteosarcoma variants: association of TGF- β 1 with high-grade osteosarcomas. *J Pathol* 1998;185:284–9.
- Mohseny AB, Cai Y, Kuijijer M, Xiao W, van den Akker B, de Andrea CE, et al. The activities of Smad and Gli mediated signalling pathways in high-grade conventional osteosarcoma. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2012;48:3429–38.
- Matsuyama S, Iwadata M, Kondo M, Saitoh M, Hanyu A, Shimizu K, et al. SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor- β -induced proliferation of human osteosarcoma cells. *Cancer Res* 2003;63:7791–8.
- Talbot J, Brion R, Picarda G, Amiaud J, Chesneau J, Bougras G, et al. Loss of connexin43 expression in Ewing's sarcoma cells favors the development of the primary tumor and the associated bone osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:553–64.
- Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF- β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 1998;17:3091–100.
- Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann M-F, 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.
- Mohammad KS, Chen CG, Balooch G, Stebbins E, McKenna CR, Davis H, et al. Pharmacologic inhibition of the TGF- β type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone. *PLoS ONE* 2009;4:e5275.
- Levy L, Hill CS. Alterations in components of the TGF- β superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:41–58.
- Dalal BI, Keown PA, Greenberg AH. Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor- β 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:381–9.
- Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, et al. High levels of transforming growth factor- β 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression. *Gastroenterology* 1996; 110:375–82.
- Wikström P, Stattin P, Franck-Lissbrant I, Damber JE, Bergh A. Transforming growth factor- β 1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate* 1998;37:19–29.
- Pfeilschifter J, D'Souza SM, Mundy GR. Effects of transforming growth factor- β on osteoblastic osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1987; 121:212–8.
- Kloen P, Jennings CL, Gebhardt MC, Springfield DS, Mankin HJ. Expression of transforming growth factor- β (TGF- β) receptors, TGF- β 1 and TGF- β 2 production and autocrine growth control in osteosarcoma cells. *Int J Cancer* 1994;58:440–5.
- Halvorson KG, Sevcik MA, Ghilardi JR, Rosol TJ, Mantyh PW. Similarities and differences in tumor growth, skeletal remodeling and pain in an osteolytic and osteoblastic model of bone cancer. *Clin J Pain* 2006;22:587–600.

Lamora et al.

38. Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, Boyce BF, et al. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* 1996;98:1544-9.
39. Grano M, Mori G, Minielli V, Cantatore FP, Colucci S, Zallone AZ. Breast cancer cell line MDA-231 stimulates osteoclastogenesis and bone resorption in human osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:1097-100.
40. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-42.
41. Mochizuki T, Miyazaki H, Hara T, Furuya T, Imamura T, Watabe T, et al. Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor- β superfamily signaling. *J Biol Chem* 2004;279:31568-74.
42. Mazars A, Lallemand F, Prunier C, Marais J, Ferrand N, Pessah M, et al. Evidence for a role of the JNK cascade in Smad7-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:36797-803.
43. Padua D, Zhang XH-F, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, et al. TGF β primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* 2008;133:66-77.
44. Liang Z, Wu T, Lou H, Yu X, Taichman RS, Lau SK, et al. Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res* 2004;64:4302-8.

Clinical Cancer Research



Overexpression of Smad7 Blocks Primary Tumor Growth and Lung Metastasis Development in Osteosarcoma

Audrey Lamora, Julie Talbot, Gwenola Bougras, et al.

Clin Cancer Res 2014;20:5097-5112. Published OnlineFirst August 8, 2014.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/1078-0432.CCR-13-3191](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3191)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2014/08/16/1078-0432.CCR-13-3191.DC1.html>

Cited Articles This article cites by 44 articles, 7 of which you can access for free at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/20/19/5097.full.html#ref-list-1>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

III. Conclusion partielle et perspective

Dans cet article, nous démontrons une augmentation significative des concentrations en TGF- β 1 et - β 2 dans les sérums de patients atteints d'ostéosarcome par rapport à des individus sains. De plus, nous avons démontré l'activation de la voie TGF- β /Smad dans des échantillons biologiques. De manière intéressante, cette activation de la voie de signalisation par les Smads est augmentée dans les tumeurs des patients métastatiques. Ces résultats constituent le rationnel de notre étude en faveur d'un rôle pro-tumoral du TGF- β dans l'ostéosarcome.

Nos deux approches développées dans cet article ont permis de démontrer l'intérêt du ciblage de la voie de signalisation du TGF- β dans les ostéosarcomes. En effet, la surexpression de Smad7 dans les cellules tumorales a permis d'inhiber significativement la croissance tumorale *in vivo* en affectant notamment le remodelage osseux associé à la tumeur. La surexpression de Smad7 augmente la formation d'os ectopique et inhibe l'ostéolyse. Cette inhibition de l'ostéolyse s'accompagne d'une inhibition de la sécrétion de RANKL par les cellules tumorales et d'une inhibition de l'expression de différents gènes impliqués dans l'ostéolyse et le cercle vicieux qui s'établit dans cette pathologie.

Bien que le SD-208 ne semble pas avoir d'effets sur la croissance de la tumeur primitive ni sur le remodelage osseux associé, les deux stratégies utilisées ont permis d'inhiber significativement le développement des métastases pulmonaires. Cette inhibition s'accompagne d'une diminution de la capacité des cellules à migrer et envahir notamment via la réduction de l'expression et de l'activité de MMP-2. De plus, la surexpression de Smad7 et le SD-208 inhibe l'expression de différents gènes impliqués dans le processus métastatique mais également dans l'angiogenèse.

En conclusion, les résultats présentés dans cet article démontrent l'intérêt d'inhiber la voie de signalisation du TGF- β par les Smads dans l'ostéosarcome. Cette inhibition pourrait conduire vers des perspectives thérapeutiques intéressantes pour les patients et particulièrement chez les patients métastatiques. Les perspectives de ce travail ont donc été de trouver un agent chimique permettant d'inhiber la voie de signalisation du TGF- β en étant capable de sur-exprimer Smad7. Après des recherches bibliographiques, nous avons porté notre intérêt sur l'halofuginone, un candidat répondant à ces critères.

Partie II : Évaluation du potentiel anti-tumoral de l'halofuginone dans l'ostéosarcome

I. Complément d'introduction et rationnel de l'étude

1. Découverte de l'halofuginone

L'halofuginone est un alcaloïde dérivé de la plante *Dichroa febrifuga*. Le premier dérivé actif de type quinazoline isolé des racines de cette plante chinoise, la fébrifugine, a été utilisé durant des siècles contre le paludisme. Cet extrait figurait comme le plus efficace des antipaludéens testé parmi les extraits de 600 plantes. De formule brute $C_{16}H_{21}O_3N_3$, ce composé actif possède des propriétés antipaludéennes contre *Plasmodium falciparum* sensible ou résistant à la chloroquine. La fébrifugine est efficace contre *Plasmodium vivax* et plus active que la quinine contre *Plasmodium lophurae*, *Plasmodium gallinaceum* et *Plasmodium cynomolgi*. A cause de ses effets toxiques gastro-intestinaux et hépatiques, la structure chimique de la fébrifugine a été utilisée comme modèle pour la synthèse de dérivés analogues inhibant le parasite *in vitro*⁴⁴⁷ et *in vivo*⁴⁴⁸ et présentant des toxicités moindres. Parmi ces analogues de la fébrifugine, l'halofuginone {7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidinyl)-2-oxopropyl]-4(3H)-quinazolinone} (Figure 39) a été utilisé pour la prévention de coccidioses chez les volailles⁴⁴⁹⁻⁴⁵¹ ou contre certains protozoaires chez le bétail⁴⁵². Le motif pipéridine est essentiel pour l'activité de l'halofuginone. De par son grand intérêt antipaludéen, de nombreux rapports sur sa synthèse ont été publiés et décrivent sa complexité chimique et les problèmes pouvant être rencontrés durant sa synthèse⁴⁵³⁻⁴⁵⁸.

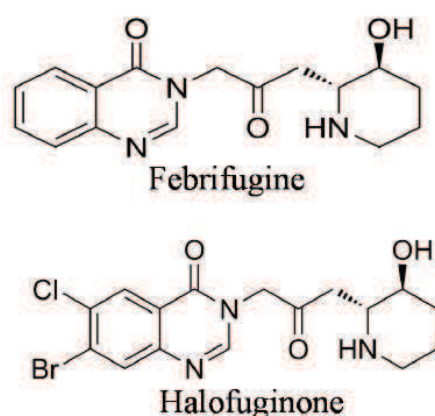


Figure 39 : Structures chimiques de la fébrifugine et l'halofuginone

D'après Mark Pines et Itai Spector⁴⁵⁹

C'est au cours de son utilisation chez les volailles que les propriétés anti-fibrotiques de l'halofuginone ont été mises en évidence. Grâce à ces observations, il a été démontré que l'halofuginone inhibe l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ du collagène de type I^{460,461}. La capacité de l'halofuginone à inhiber le processus fibrotique semble résider dans cette capacité à réduire la synthèse de collagène et simultanément d'induire l'activité de collagénases^{462,463} en augmentant notamment la synthèse de TIMPs⁴⁶⁴ qui régulent l'activité des MMPs. De plus, la voie de signalisation du TGF- β par les Smads, hautement impliquée dans la fibrose par l'induction de la production de protéines matricielles est inhibée par l'halofuginone. En effet, l'halofuginone inhibe la phosphorylation de Smad3⁴⁶⁰ et augmente l'expression du Smad-inhibiteur Smad7 dans de nombreux types cellulaires⁴⁶⁵⁻⁴⁶⁹. L'inhibition de la phosphorylation de Smad3 est retrouvée *in vivo* dans des modèles de dystrophie musculaire^{470,471} ou de nombreuses tumeurs^{469,472}.

2. Halofuginone et cancers

De manière intéressante, l'halofuginone inhibe de nombreux acteurs de l'angiogénèse. *In vitro*, cette molécule inhibe l'expression de MMP-2 ou la formation de tubes capillaires. *In vivo*, l'halofuginone inhibe l'angiogénèse dans le gliome⁴⁷³, le carcinome de la vessie⁴⁷⁴, les tumeurs de Wilms⁴⁷⁵, le mélanome⁴⁷⁶ et les cancers du pancréas⁴⁷⁷ et de la prostate⁴⁷⁸. De plus, l'halofuginone inhibe le diamètre et la longueur de vaisseaux sanguins au sein de tumeurs pancréatiques chez la souris⁴⁵⁹. Dans de nombreux cas, cette inhibition de l'angiogénèse s'accompagne de l'inhibition de la transition de fibroblastes en myofibroblaste, de la réduction du dépôt de MEC et de l'inhibition de la croissance tumorale. L'halofuginone inhibe également les métastases pulmonaires de carcinome hépatocellulaire⁴⁷⁹ et les métastases osseuses de mélanome⁴⁸⁰. L'intérêt de cette molécule en cancérologie semble d'autant plus important qu'elle synergise avec les effets d'agents chimiothérapeutiques tels que le docetaxel dans les cancers de la prostate, la vincristine et la dactinomycine dans les tumeurs de Wilm's et la gemcitabine dans les cancers du pancréas. Cet effet synergique de l'halofuginone associé à de faibles doses d'agents de chimiothérapie permet de réduire le volume et le poids tumoral avec une efficacité comparable à de fortes doses de chimiothérapie, ce qui permettrait peut-être de réduire les effets secondaires liés à ces agents^{469,481}.

3. Halofuginone et apoptose

L'halofuginone est connu pour être un inducteur de l'apoptose de nombreux types cellulaires. Cette molécule inhibe la prolifération cellulaire de tumeurs bénignes en inhibant la synthèse d'ADN et en induisant ainsi leur mort programmée⁴⁸². Dans les lignées cellulaires de leucémie aigue promyélocytaire, l'apoptose induite par l'halofuginone est associée à la régulation de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire⁴⁸³. L'induction de l'apoptose dans le myélome multiple par l'halofuginone s'accompagne notamment du clivage de PARP et des caspases-3, -8 et -9 ainsi que de l'inhibition des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et X-IAP⁴⁸⁴. L'induction de l'apoptose par l'halofuginone dans des modèles de cancers du pancréas, de mélanome ou du sein s'accompagne également souvent de l'inhibition de la phosphorylation de Smad3, de la migration cellulaire et de la dégradation de la matrice⁴⁵⁹.

4. Halofuginone et essais cliniques

L'halofuginone est actuellement testé dans des essais cliniques portant sur le sarcome de Kaposi successif au VIH, la sclérodermie et la dystrophie musculaire de Duchenne. Son administration orale a été favorablement évaluée dans un essai clinique de phase I chez des patients atteints de tumeurs solides avancées⁴⁸⁵. La dose maximale tolérée est de 3,5 mg/jour et s'accompagne de vomissements, nausées et fatigue. Aucune toxicité n'est observée à une dose de 1 mg/jour et la dose recommandée dans le cadre d'une administration chronique est de 0,5 mg/jour accompagnée d'antiémétiques. La sécurité, la tolérance et la pharmacocinétique de cette molécule sont actuellement évaluées chez des patients atteints de myopathie de Duchenne pour laquelle la fibrose est la complication principale⁴⁵⁹.

L'halofuginone soulève encore de nombreuses questions quant à ses mécanismes d'action. En effet, cette molécule inhibe la fibrose principalement en inhibant la phosphorylation de Smad3 par le TGF- β ^{486,487} et inhibe la différenciation des cellules Th17 conduisant en une inhibition de l'inflammation⁴⁸⁸⁻⁴⁹⁰. Ces deux effets majeurs observés peuvent être le résultat de deux mécanismes d'action différents ou d'un seul et même mécanisme d'action. L'hypothèse la plus évoquée qui pourrait servir de lien entre ces deux

effets apparemment indépendants serait l'action de l'halofuginone en tant qu'inhibiteur de la voie de signalisation du TGF- β , facteur à la fois impliqué dans la fibrose et la réponse inflammatoire. Bien que les effets de l'halofuginone et ses mécanismes d'action soient encore mal compris, le traitement par cet agent permet de préserver l'architecture tissulaire et ainsi d'empêcher la progression des pathologies. En effet, le processus tumoral et métastatique dépend étroitement du microenvironnement et les cellules cancéreuses se développent plus facilement dans des tissus fibrotiques^{469,472}. L'halofuginone, en réduisant la fibrose et l'inflammation et en préservant l'architecture des tissus, empêchant ainsi la formation de niches, permet ainsi de réduire l'implantation des cellules cancéreuses.

Au vu i) de l'intérêt de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β dans l'ostéosarcome, ii) des effets anti-cancéreux de l'halofuginone en jouant à la fois sur les cellules tumorales et sur le microenvironnement, iii) de ses effets inhibiteurs de la voie de signalisation du TGF- β en augmentant notamment l'expression de Smad7 et iv) des perspectives intéressantes soulevées par les essais cliniques dont cette molécule fait l'objet, nous nous sommes intéressés au potentiel anti-tumoral de l'halofuginone dans l'ostéosarcome.

II. Article 2 : Oncotarget (Accepté pour publication)

Anticancer activity of halofuginone in a preclinical model of osteosarcoma : inhibition of tumor growth and lung metastases

Audrey Lamora^{1,4}, Mathilde Mullard^{1,3}, Jérôme Amiaud^{1,3}, Régis Brion^{1,3}, Dominique Heymann^{1,3}, Françoise Redini^{1,3} and Franck Verrecchia^{1,3}

¹INSERM, UMR 957, Equipe labellisée Ligue contre le Cancer 2012, Nantes, France; ²Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Nantes, France; ³CHU Hôtel Dieu, Nantes, France; ⁴Inserm Liliane Bettencourt School, Pharm.D-PhD student

Address correspondence to: Franck Verrecchia, INSERM UMR957, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44000 Nantes, France, Phone: +33 240412842, Fax: +33 240412860, E-mail: franck.verrecchia@inserm.fr

Keywords: halofuginone, osteosarcoma, TGF- β , metastases, bone remodeling

Running title: Halofuginone inhibits osteosarcoma progression

Financial support: INSERM, Ligue contre le Cancer (Allocation doctorale to AL), Ligue contre le Cancer (Equipe labellisée 2012)

Disclosure of Potential Conflicts of Interest: NO

Anticancer activity of halofuginone in a preclinical model of osteosarcoma : inhibition of tumor growth and lung metastases

Audrey Lamora¹⁻⁴, Mathilde Mullard¹⁻³, Jérôme Amiaud¹⁻³, Régis Brion¹⁻³, Dominique Heymann¹⁻³, Françoise Redini¹⁻³ and Franck Verrecchia¹⁻³

¹INSERM, UMR 957, Equipe labellisée Ligue contre le Cancer 2012, Nantes, France

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

³CHU Hôtel Dieu, Nantes, France

⁴Inserm Liliane Bettencourt School, Pharm.D-PhD student

Correspondence to:

Franck Verrecchia, e-mail: franck.verrecchia@inserm.fr

Keywords: halofuginone, osteosarcoma, TGF- β , metastases, bone remodeling

Abstract

Osteosarcoma is the main malignant primary bone tumor in children and adolescents for whom the prognosis remains poor, especially when metastases are present at diagnosis. Because we recently demonstrated that TGF- β /Smad cascade plays a crucial role in osteosarcoma metastatic progression, we investigated the effect of halofuginone, identified as an inhibitor of the TGF- β /Smad3 cascade, on osteosarcoma progression. A preclinical model of osteosarcoma was used to evaluate the impact of halofuginone on tumor growth, tumor microenvironment and metastasis development. *In vivo* experiments showed that halofuginone reduces primary tumor growth and lung metastases development. *In vitro* experiments demonstrated that halofuginone decreases cell viability mainly by its ability to induce caspase-3 dependent cell apoptosis. Moreover, halofuginone inhibits the TGF- β /Smad3 cascade and the response of TGF- β key targets involved in the metastases dissemination process such as MMP-2. In addition, halofuginone treatment affects the "vicious cycle" established between tumor and bone cells, and therefore the tumor-associated bone osteolysis. Together, these results demonstrate that halofuginone decreased primary osteosarcoma development and associated lung metastases by targeting both the tumor cells and the tumor microenvironment. Using halofuginone may be a promising therapeutic strategy against tumor progression of osteosarcoma specifically against lung metastases dissemination.

Introduction

Osteosarcoma, the most common primary malignant bone tumor in children and adolescents (median age of diagnosis: 18 years) [1], represents the third highest cause of cancer-related death in this age group [2]. The survival rate that reaches approximately 50–70% at 5 years depending on the series have unfortunately remained unchanged during the last few decades [3]. The standard treatment of osteosarcoma consists of complete

surgical resection associated with neoadjuvant and adjuvant chemotherapy composed of several agents such as doxorubicin, cisplatin, methotrexate or ifosfamide [4]. Radiotherapy is rarely used due to the radiation resistance of this type of tumor. Many patients die from metastatic diseases, lungs being the most common metastatic site for osteosarcoma [5]. The lack of response to conventional treatment in osteosarcoma patients and the poor prognosis for

the metastatic forms of the pathology underscore the urgency to develop novel therapeutic strategies.

Alterations of bone remodeling associated with osteosarcoma development play a central role in the progression of this disease. Osteosarcoma is thus characterized by abnormal osteoid bone formation and tumor-associated bone osteolysis which correlates with poor prognosis [6] and plays a crucial role in the establishment of a vicious cycle between the bone and cancer cells [7]. Briefly, the tumor cells secrete several factors able to induce, directly or indirectly the differentiation and maturation of osteoclasts leading to bone osteolysis [8,9]. In turn, this osteoclastic bone destruction allows the release of growth factors stored in mineralized bone matrix which stimulate cancer cells and thus the tumor growth [7–9].

One of these factors stored in the bone matrix and released during the tumor-associated bone osteolysis is TGF- β 1, a member of the TGF- β family. Although the role of TGF- β in cancer is complex, it is commonly accepted that during the later stages of disease, the TGF- β cascade promotes tumor progression mainly by its ability to stimulate epithelial to mesenchymal transition (in the context of carcinoma), tumor invasion, metastatic dissemination and/or escape from the immune system [10]. Concerning osteosarcoma, we recently demonstrated that TGF- β 1 levels are higher in the serum of patients compared to healthy donors and that TGF- β /Smad3 signaling pathway is activated in human biopsies. Second, we showed that blocking the TGF- β /Smad signaling pathway by overexpressing Smad7, a specific Smad inhibitor, slows down the growth of the primary tumor. This is mainly because Smad7 overexpression in tumor cells affects the "vicious cycle" established between

tumor cells and bone cells by its ability to decrease osteoclast activity. Importantly, we showed that Smad7 overexpression in osteosarcoma cells or the treatment of mice with the T β RI inhibitor SD-208 inhibits the development of lung metastases demonstrating that the inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway may represent a promising therapeutic strategy against tumor progression of osteosarcoma specifically against the development of lung metastases [11].

Halofuginone hydrobromide, 7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidinyl)-2-oxopropyl]-4(3H)-quinazolinone, is a derivative alkaloid from febrifugine isolated from a Chinese plant *Dichroa febrifuga*. Halofuginone was first identified as an inhibitor of type I collagen synthesis and is used as an anti-fibrotic drug [12]. In the context of cancer, halofuginone has recently showed its ability to reduce Kaposi sarcoma lesions in a completed phase II clinical trial in patients with AIDS-related Kaposi sarcoma [13]. In addition, by using different experimental models, halofuginone was shown to be effective against cancer progression for example, in the case of breast cancer [14], melanoma bone metastasis [15], myeloma [16], pancreas [17], Wilms tumor [18], hepatocellular carcinoma [19], bladder carcinoma [20], glioma [21] and prostate cancer [22].

Because the effects of halofuginone against cancer and fibrosis diseases are mainly associated with its ability to inhibit the TGF- β signaling pathway and because we demonstrated that blocking TGF- β is a promising therapeutic strategy against tumor progression of osteosarcoma, the aim of this work was to evaluate the effect of halofuginone on osteosarcoma progression and metastatic development.

Results

Halofuginone inhibits *in vivo* tumor growth

To investigate the effect of halofuginone on osteosarcoma progression, we firstly used a mice preclinical experimental model of osteosarcoma induced by paratibial injection of HOS cells that mimics the human disease. As shown in Figure 1A, the treatment of mice with halofuginone significantly inhibited the tumor growth in dose dependent manner. The mean tumor size at day 30 was $2524.3 \pm 12.5 \text{ mm}^3$, $2891.1 \pm 54.5 \text{ mm}^3$, $1949.8 \pm 154.5 \text{ mm}^3$, $1336.6 \pm 50.8 \text{ mm}^3$ and $1329.1 \pm 70.1 \text{ mm}^3$ when the mice were treated respectively with vehicle (control group) or with 0.2 $\mu\text{g/day}$, 0.5 $\mu\text{g/day}$, 1 $\mu\text{g/day}$ or 5 $\mu\text{g/day}$ of halofuginone. In this context, immunohistochemical staining for the proliferative marker Ki67 in mice tumor samples showed that halofuginone treatment decreases tumor cell proliferation (Fig. 1B) during the first stage of tumor development (tumor sizes around 500 mm^3). In addition, immunohistochemical staining for the apoptotic marker caspase-3 in the same samples showed that the treatment of mice with halofuginone increases tumor cell apoptosis (Fig. 1C).

Together, these results demonstrate that the treatment of mice with halofuginone reduces *in vivo* tumor growth and suggest that this effect is mainly due to a decrease of tumor cell proliferation associated with an increase of cell death.

Halofuginone induces *in vitro* cell death

To better understand the mechanisms involved in halofuginone-induced inhibition of osteosarcoma tumor growth, we next performed *in vitro* experiments. We firstly demonstrated that halofuginone significantly inhibits the viability of four osteosarcoma cell lines in a dose dependent manner after 24h incubation (Fig. 2A). We secondly studied whether the reduced survival of osteosarcoma cells by halofuginone was associated

with apoptosis induction. Flow cytometric annexin V/PI assay showed that halofuginone induces an early and late apoptotic cell populations in a dose- and time-dependent manner (Fig. 2B). The percentage of cells in early apoptosis (AnnexinV+/PI-) reached 0.62% in the absence of halofuginone and reached 3.05% and 5.37% after respectively 12h and 24h of cell treatment with 100 nM halofuginone. Similarly, the percentage of cells in late apoptosis (AnnexinV+/PI+) reached 0.69% in the absence of halofuginone and reached 1.08% and 3.82% after respectively 12h and 24h of treatment with 100 nM halofuginone. Thirdly, caspases-3/7 activity was measured in HOS and U2OS cells after 24h incubation with halofuginone. As shown in Figure 2C, halofuginone stimulated caspase-3/7 activity in a dose dependent manner. Finally, western immunoblotting analysis demonstrated the cleavage of caspase-3 and PARP in a dose dependent manner in HOS and U2OS cell lines (Fig. 2D).

Together, these results show that halofuginone inhibits cell viability *in vitro* and suggest that this effect is mainly due to a decrease of tumor cell proliferation possibly associated with an increase in cell death.

Halofuginone inhibits tumor associated bone osteolysis

Because osteosarcoma-associated alteration of bone remodeling plays a central role in the development and progression of primary bone tumors, we evaluated the ability of halofuginone to alter tumor-associated bone remodeling. To this aim, the bone microarchitecture was examined in mice bearing HOS tumors using a high-resolution X-ray micro-CT system. First, to evaluate the ability of halofuginone to affect the production of bone, we specifically quantified ectopic bone formation.

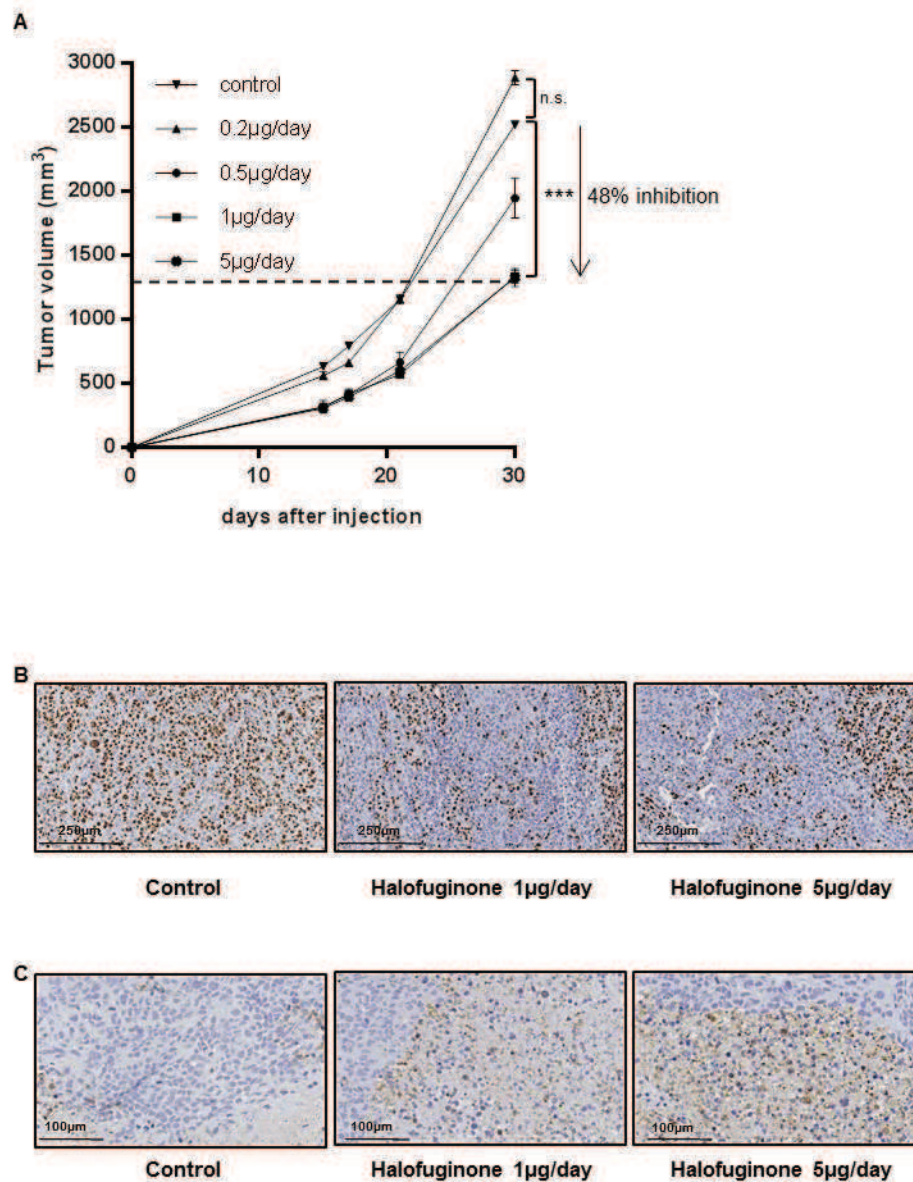


Figure 1: Halofuginone inhibits osteosarcoma primary tumor growth

A) Mice were injected with 2.10^6 HOS cells. One day after cell injection, mice were daily intraperitoneal injected with 0.2 µg/mouse, 0.5 µg/mouse, 1 µg/mouse or 5 µg/mouse halofuginone or with vehicle (control group). The results are representative of 2 independent experiments. The mean tumor volumes were calculated from day 1 to day 30. (Mean \pm SEM; *** $p < 0.005$). **B)** Tumor samples (tumor sizes around 500 mm³) were fixed, embedded in paraffin, sectioned and stained with Ki-67. Representative photomicrographs per group are shown. **C)** Tumor samples (tumor sizes around 500 mm³) were fixed, embedded in paraffin, sectioned and stained with Caspase-3. Representative photomicrographs per group are shown.

As shown in Figure 3A, the ectopic bone volume in mice treated with 1 µg/day and 5 µg/day halofuginone was significantly higher than in mice

injected with vehicle (1.99 ± 0.06 mm³ and 1.99 ± 0.08 mm³ vs. 0.81 ± 0.02 mm³ respectively, $p < 0.005$). We then analyzed the ability of

halofuginone to alter bone osteolysis by evaluating the specific trabecular bone volume (BV/TV), trabecular number (Tb.N) and trabecular thickness (Tb.Th) when the tumor sizes reached 1000 mm³. As shown in Figure 3B, control mice had lower trabecular bone volume than mice treated with 1 µg/day and 5 µg/day (6.72 ± 0.43 % vs. 16.45 ± 0.68 % and 12.37 ± 0.83 %, p<0.005 and p<0.05 respectively). Moreover, control mice had a significant lower Tb.Th than mice treated with for example 1 µg/day halofuginone (0.095 ± 0.004 mm vs. 0.120 ± 0.002 mm, p<0.05). Similarly, the Tb.N was also lower in the control group compared to the 1 µg/day halofuginone treated group (0.75 ± 0.06 /mm vs. 1.35 ± 0.04 /mm; p<0.005). Similar results are observed when tumor volumes reached around 500 mm³ (data not shown). Interestingly, systemic treatment of mice with halofuginone does not significantly affect bone volume in the absence of tumor (Fig. 3C). To understand the effect of halofuginone on bone osteolysis, we next analyzed the expression of two osteolytic genes, *RANKL* and *IL-11*, in tumor biopsies from mice. qRT-PCR analysis indicated that bone tumors from mice treated with 1 µg/day and 5 µg/day halofuginone expressed significantly lower mRNA levels of *RANKL* and *IL-11* than control groups (Fig. 3D, upper panel). Finally, halofuginone treatment inhibits the degradation of collagen evaluated by the measure of pyridinoline excretion in mice serum (Fig. 3D, lower panel) both when tumor volumes reached 1000 mm³ (left panel) and 2500 mm³ (right panel).

Together these results demonstrate that halofuginone both decreased tumor-induced bone osteolysis and promoted tumor-induced bone formation, and suggest that these effects are partly due to the ability of halofuginone to reduce the expression of *RANKL* and *IL-11* by tumors cells.

Treatment of mice with halofuginone inhibits the dissemination of pulmonary metastases

To evaluate the effect of halofuginone on pulmonary metastases development, the lungs mice were removed when primary bone tumor volumes reached 2500 mm³. As shown in Figure 4, halofuginone reduced the incidence of lung metastases. In the absence of halofuginone treatment, 10 mice out of 10 (100%) developed lung metastases. By contrast, only 3 of 4 (75%) mice treated with 0.2 µg/day halofuginone, 2 of 4 (50%) mice treated with 0.5 µg/day halofuginone and 4 out of 10 (40%) mice treated with 1 µg/day or 5 µg/day halofuginone developed lung metastases (Fig. 4A). As shown in Figure 4B, the treatment of mice with respectively 0.2 µg/day, 0.5 µg/day, 1 µg/day and 5 µg/day halofuginone also diminished the number of lung metastases when lungs are infected. No mice in the 5 µg/day and 1 µg/day halofuginone treated groups developed more than 5 lung metastases. By contrast, 8 mice in the control group developed more than 5 lung metastases.

Together, these results prove that halofuginone reduces both the incidence and the number of lung metastases.

Halofuginone blocks the TGF-β/Smad3 signaling pathway in osteosarcoma cells

Because halofuginone is known to reduce TGF-β signaling pathway in normal cells such as fibroblast [23] and in cancer cells such as melanoma [15] and promyelocytic leukemia [24], and because we recently demonstrated that TGF-β signaling plays a crucial role in the development of lung metastases in osteosarcoma, we then evaluated the effect of halofuginone on TGF-β signaling pathway in osteosarcoma cells. Firstly, we demonstrated that the incubation of HOS and/or U2OS cells with halofuginone during 10h do not affect cell viability

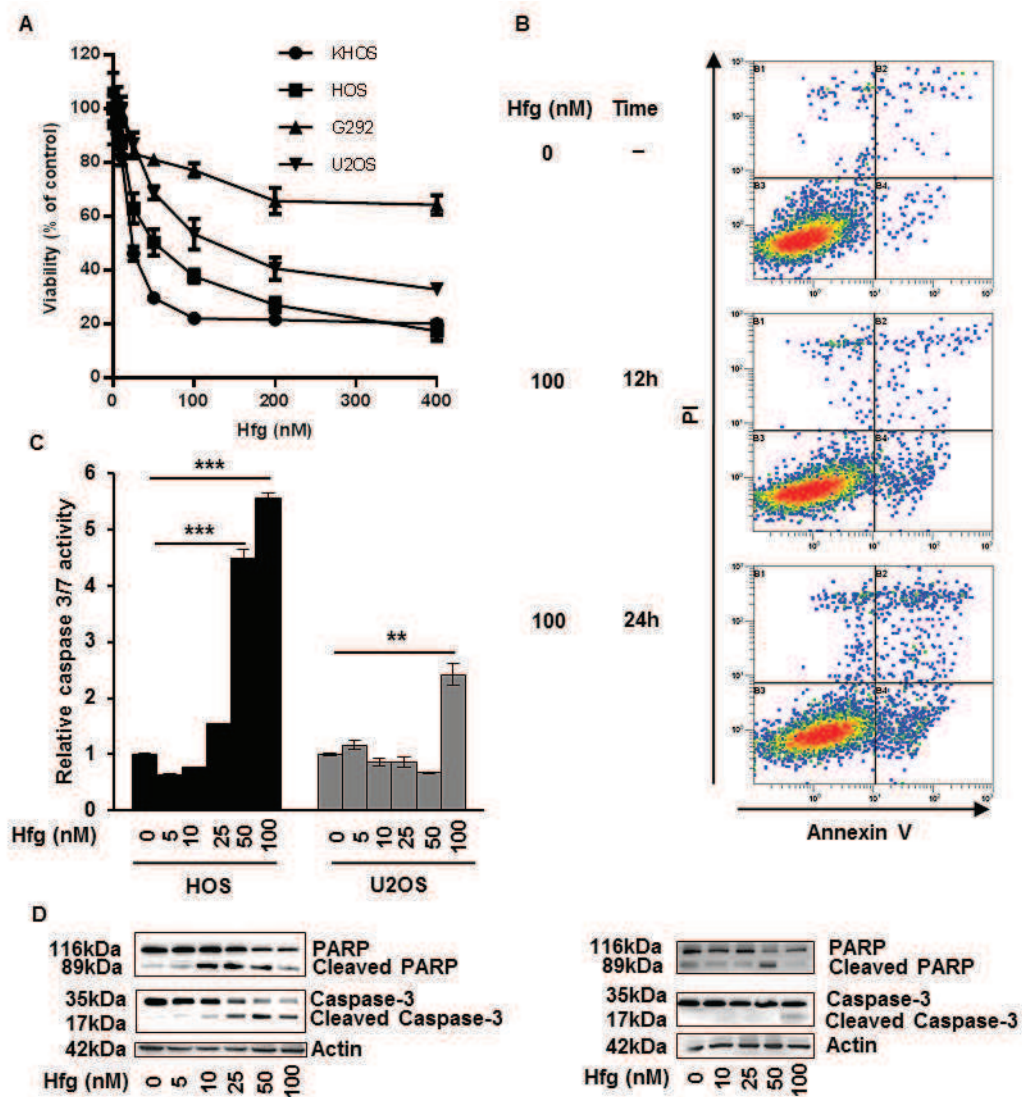


Figure 2: Halofuginone induces osteosarcoma cell death *in vitro*

A) Four osteosarcoma cell lines were treated for 24 hours with halofuginone as indicated. After incubation, cell viability was evaluated by WST-1 test. For each cell line, graph indicates the percentage of cell viability compared to untreated cells. Mean \pm S.D. of two independent experiments, each performed in sixuplicate is presented.

B) Representative dot plots of untreated HOS cells and HOS cells treated with 100 nM halofuginone for 12 and 24 hours are shown (Representative graphs of two experiments).

C) HOS and U2OS cells were treated with halofuginone as indicated for 24 hours. Relative caspase-3/7 activity was evaluated. Bars indicate the caspase-3/7 activity for each halofuginone concentration tested (mean \pm S.D.) of at least two independent experiments, each performed in triplicate (** $p < 0.005$, ** $p < 0.01$).

D) HOS cells (left panels) and U2OS cells (right panels) were treated with halofuginone as indicated for 24 hours. After incubation, Caspase-3 and PARP levels were detected by Western Blot analysis of whole cell lysates. Actin antibody was used as internal control. Representative blots of three experiments were shown.

(Fig. 5A). In this context, to specifically evaluate the effect of halofuginone on TGF- β signaling, we chose to treat the cells only during 10h, ie under experimental conditions which do not affect osteosarcoma cell viability. Halofuginone inhibits the ability of TGF- β to induce the phosphorylation of Smad3 (Fig. 5B), to transactivate the Smad3/4-specific reporter construct (CAGA)₉-luc (Fig. 5C, left panel), and to stimulate the expression of CTGF (Fig. 5C, right panel), a specific TGF- β signaling pathway target gene, in HOS cells. Similar results were obtained with the U2OS cell line (Supplementary Fig. S1). To better understand by which mechanism halofuginone inhibits TGF- β signaling pathway, we investigated the effect of halofuginone on Smad7, T β RI and T β RII expressions. As indicated in Figure 5D, halofuginone both induces Smad7 expression, and inhibits T β RI and T β RII expressions even at very low doses (5 nM).

Together, these results demonstrate that halofuginone inhibits TGF- β signaling pathway probably by its ability to increase Smad7 expression and to reduce the expression of the TGF- β receptors, T β RI and T β RII.

Halofuginone inhibits TGF- β key targets involved in the metastatic process

Since halofuginone is able to inhibit the TGF- β cascade in osteosarcoma cells, we evaluated the ability of halofuginone to inhibit TGF- β key targets involved in the metastatic process. As shown in Figure 6A, zymography assay demonstrated that halofuginone strongly reduces the activation of MMP-2 in osteosarcoma cells, a metalloproteinase that plays a crucial role in the cell invasion process. Moreover, as shown in Figure 6B, RT-qPCR analysis indicated that halofuginone inhibits the ability of TGF- β to induce MMP-2 expression. In addition, RT-qPCR analysis from mice biopsies indicated that the expression by tumor cells of CXCR4 and ANGPTL4, two TGF- β target genes identified as key players to prime cancer cells towards the lungs, were both reduced when mice were treated with halofuginone (Fig. 6C). Finally, immunohistochemical staining for the endothelial marker CD146 in mice tumor samples showed that halofuginone treatment significantly decreased the angiogenic process compared to the untreated group by decreasing the number of vessels and their average size (Fig. 6D).

Together, these results prove that halofuginone inhibits TGF- β key targets involved in the metastatic process of osteosarcoma.

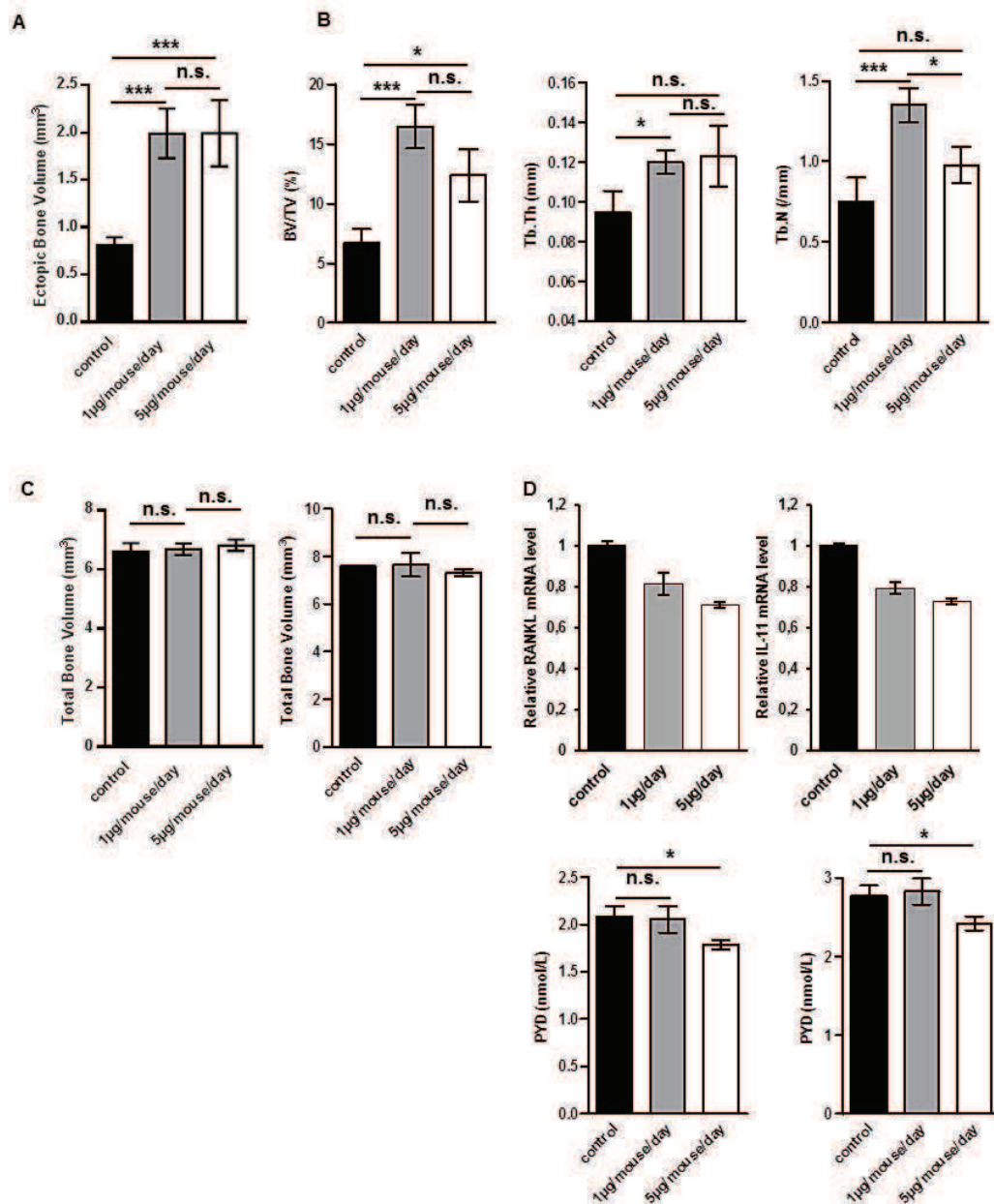


Figure 3: Halofuginone affects tumor associated bone remodeling

Paratibial injections of 2.10^6 HOS tumor cells were performed in 3 groups of nude mice (vehicle, halofuginone 1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$). Bone remodeling parameters were analysed on the tibia bearing tumor (A-B). **A**) Histogram represents the ectopic bone volume (mean \pm S.E.M.) when the tumor volume reached 2500 mm^3 in each group of 10 mice (treated with 1 $\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$ or 5 $\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$ halofuginone or vehicle) (** $p < 0.005$). **B**) Left panel : histogram represents the specific trabecular bone volume (mean \pm S.E.M.) when the tumor volume reached 1000 mm^3 in each group of 6 mice (treated with 1 $\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$ or 5 $\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$ halofuginone or vehicle) (** $p < 0.005$, * $p < 0.05$). Middle panel : Bars indicate the trabecular thickness (mean \pm S.E.M.) in each group (* $p < 0.05$). Right panel : Bars indicate the trabecular number (mean \pm S.E.M.) in each group (** $p < 0.005$, * $p < 0.05$). **C**) Left panel : Bone volumes of healthy controlateral legs were measured when the tumor volume reached 2500 mm^3 (left panel). Histograms represent the mean \pm S.E.M. in each group. Right panel :

Bone volumes of healthy contralateral legs were measured 35 days after HOS cell injection. Histograms represent the mean \pm S.E.M. in each group. **D)** Upper panels : RNA was extracted from tumor biopsies of mice treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$, or 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ halofuginone or vehicle. *RANKL* (left panel) and *IL-11* (right panel) mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. Bars indicate means \pm S.D. Lower panels : Concentrations of pyridinoline in mice serum of control, 1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ halofuginone groups were measured using the MicroVue Serum PYD EIA kit both when tumor volume reached 1000 mm^3 (left panel) and 2500 mm^3 (right panel). Bars indicate means \pm S.E.M performed in duplicate (* $p < 0.05$).

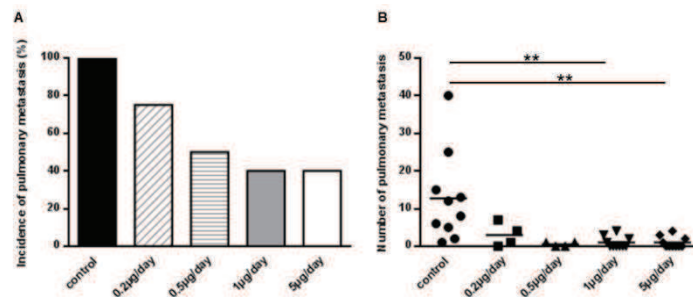


Figure 4: Treatment of mice with halofuginone inhibits lung metastases development

Mice were injected with HOS cells and treated with vehicle or halofuginone as indicated. Mice were sacrificed when tumor sizes reached 2500 mm^3 and lungs were removed. **A)** Histogram indicates lung metastases incidence in each group. **B)** Graph indicates individual (dots) and mean (lines) numbers of lung metastases counted in mice lungs from each group (** $p < 0.01$).

Discussion

Currently a variety of agents appear to be of potential clinical interest for osteosarcoma, with an emphasis on molecular targeted approaches of signaling pathways [25-28]. Basic research thus identified specific targets and developed adapted strategies for osteosarcoma tumor inhibition. However, many of these therapeutic strategies focus on a single aspect of osteosarcoma tumor development and target only one point of the 'vicious circle' between the tumor cells and bone cells, either the tumor cells or the tumor environment. These strategies have thus attempted to either induce apoptosis and/or cell cycle arrest of tumor cells or to target the tumor microenvironment by the inhibition of osteoclast-mediated bone destruction for example. During the last decade, new strategies have associated the use of chemotherapeutic drugs that target tumor cells and

drugs that target osteoclasts allowing a better response to treatment. Future directions and challenges could be the discovery of drugs able to target several key points of the 'vicious circle' established between tumor cells and bone cells in order to limit treatment escape.

In this study, we demonstrated that halofuginone inhibits tumor growth in human osteosarcoma xenograft model *in vivo*. To understand whether the tumor growth inhibition observed *in vivo* was due to the inhibition of osteosarcoma cell proliferation, to the induction of tumor cell apoptosis and/or to the drug effect on cell microenvironment, we have first tested the direct potential effect of halofuginone on osteosarcoma cell viability using WST-1 assay. As previously described in other tumor cell lines such as multiple

myeloma or melanoma cell lines [15,16], we demonstrated that all the four osteosarcoma cell lines tested are sensitive to halofuginone. In addition, annexin V/PI double staining showed that halofuginone induced apoptosis in a dose- and time-dependent manner. How halofuginone modulates intracellular signaling cascade leading to apoptosis is not fully understood. Signaling pathways that are able to induce apoptosis have been schematically classified into i) extrinsic pathways initiated by death receptors and ii) intrinsic pathways initiated by mitochondrial events [29]. Here, we demonstrated that halofuginone induced the cleavage and activation of caspase-3 a common mediator of both apoptotic pathways. In addition, we demonstrated that halofuginone induced the cleavage of PARP, a substrate of caspase-3 known as an indicator of DNA damage and apoptosis. Whatever the exact involvement of the intrinsic and/or extrinsic pathways, we clearly demonstrated that halofuginone induces *in vitro* and *in vivo* osteosarcoma cell death and thus inhibits the *in vivo* tumor growth. We next focused our attention on the effects of halofuginone on tumor cell microenvironment, specifically on bone remodeling. In this study, using microCT analysis, we demonstrated that halofuginone inhibits the tumor-associated bone destruction by both promoting ectopic bone formation and preventing trabecular bone osteolysis. As first hypothesis, our results suggest that halofuginone effects on bone remodeling could be explained indirectly by the death of tumor cells induced by halofuginone. Since

some studies showed that tumor cells produce osteoclast-activating factors which induce osteoclast precursor differentiation and activation [30,31], the consequence of the decrease of the tumor cell number may be a diminution of the production and the release of osteolytic factors produced by tumor cells thus contributing to decreased osteoclast activity. As second hypothesis, our results suggest that halofuginone may act on bone remodeling by its ability to block the TGF- β signaling pathway. As previously described in many cancer cells such as melanoma [15], we here demonstrated that halofuginone inhibits TGF- β /Smad3 signaling pathway by increasing *Smad7* expression and/or reducing *T β RI* and *T β RII* expressions. In this context, we demonstrated in tumor biopsies that halofuginone inhibits the expression of *RANKL* and *IL-11* mRNA, two TGF- β target-cytokines that play a central role in bone osteolysis [30-32]. In addition, we recently demonstrated that blocking TGF- β signaling by overexpression of *Smad7* in osteosarcoma cells inhibits the expression and release of osteolytic factors such as RANKL and IL-11 by tumor cells [11]. Finally, although the systemic treatment of mice with halofuginone did not show significant results on bone remodeling in the absence of tumor, we cannot rule out that halofuginone acts directly on osteoblast and or osteoclast activity. Here, we clearly demonstrated that halofuginone inhibits bone osteolysis associated to the tumor growth, which represents the first step of tumor development.

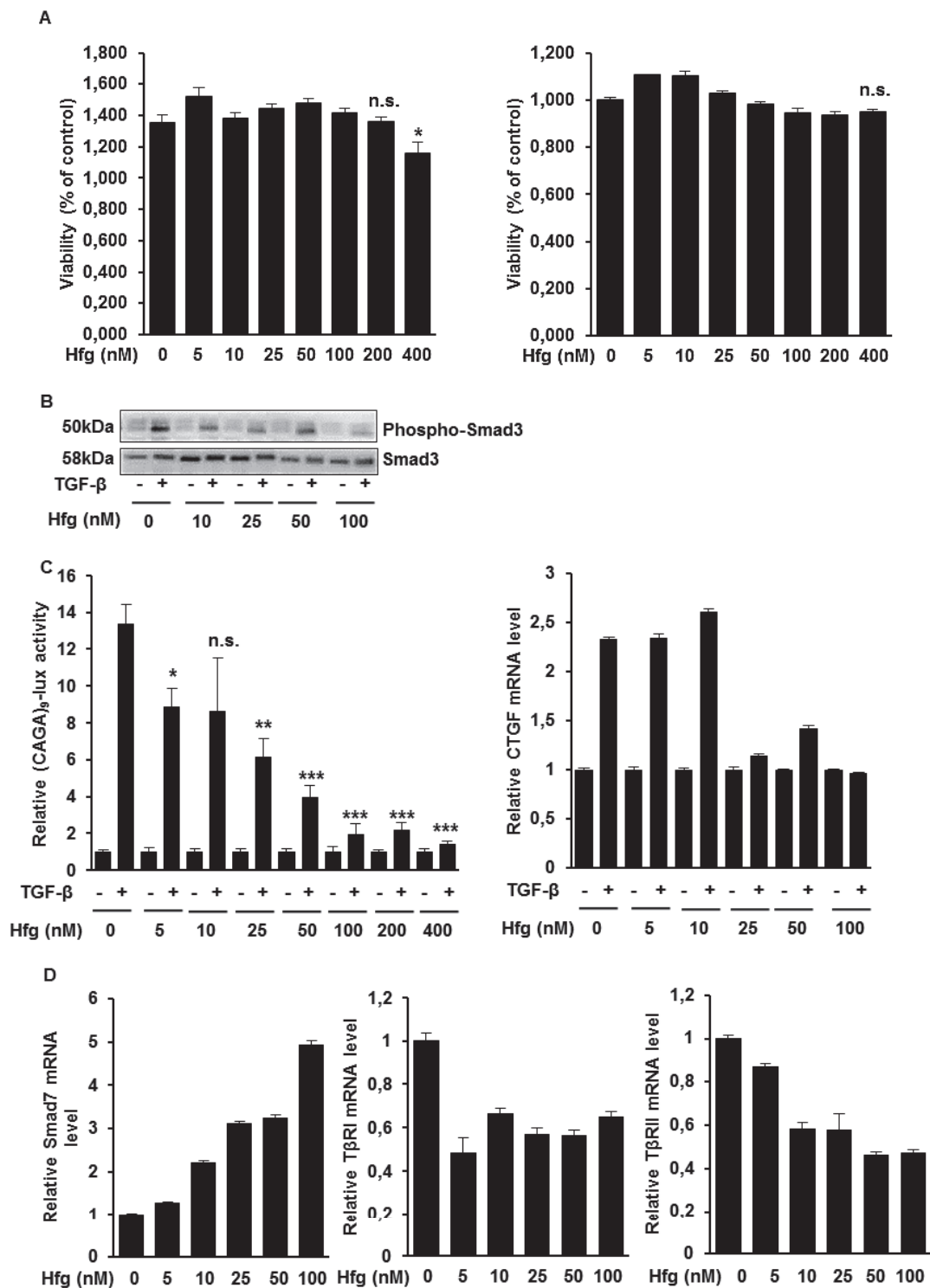


Figure 5: Halofuginone blocks the TGF- β /Smad3 cascade in osteosarcoma cells

A) HOS (left panel) and U2OS (right panel) cells were treated with halofuginone as indicated for 10 hours. After incubation, cell viability was evaluated by WST-1 test. For each cell line, histogram indicates the percentage of cell viability compared to untreated cells (Mean \pm S.D. of two independent experiments, each performed in sixplicate; * $p < 0.05$). **B)** HOS cells were treated for 4 hours with halofuginone and then for 30 min in the presence

or absence of TGF- β (5 ng/ml). Phospho-Smad3 levels were detected by Western Blot analysis of HOS whole cell lysates (upper panel). The specificity of the modulation was confirmed with an anti-Smad3 antibody (lower panel). **C)** Left panel : HOS cells were transfected with the Smad3/4-specific construct (CAGA)₉-luc. 24h after transfection, cells were treated with halofuginone for 4 hours and then for 6 hours in the presence or absence of TGF- β (5 ng/ml). Bars indicate mean \pm S.D. of at least two independent experiments carried out in triplicate (**p<0.005, **p<0.01, *p<0.05). Right panel : HOS cells were treated with halofuginone for 4 hours and then for 6 hours in the presence or absence of TGF- β (5 ng/ml). After incubations, mRNA steady-state levels of the specific TGF- β target genes *CTGF* was determined by quantitative RT-PCR. Bars indicate means \pm S.D. of at least two independent experiments, each performed in triplicate. **D)** HOS cells were treated or not with halofuginone during 10 hours as indicated. After incubations, mRNA steady-state levels of *Smad7* (left panel), *T β R1* (middle panel) and *T β R2* (right panel) were determined by quantitative RT-PCR. Bars indicate means \pm S.D. of at least two independent experiments, each performed in triplicate.

Finally, we have demonstrated that halofuginone inhibits the development of lung metastases. We recently showed that TGF- β signaling pathway plays a key role in the establishment and progression of osteosarcoma lung metastases. Indeed, overexpression of the Smad inhibitor Smad7, or the systemic injection of SD208, an inhibitor of T β R1 kinase, inhibits the TGF- β signaling cascade and thus reduces the expression of TGF- β -regulated metastatic genes and the ability of TGF- β to stimulate migration and invasion of osteosarcoma cells [11]. Here, we demonstrated that the ability of halofuginone to inhibit the TGF- β /Smad3 cascade in osteosarcoma reduces the expression and activity of MMP-2, a protein highly implicated in the migration and invasion processes [11,33,34]. Interestingly, halofuginone was also able to inhibit the ability of TGF- β to stimulate *ANGPTL4* and *CXCR4* expression, two factors identified as key players to prime cancer cells for metastasis respectively

towards the lungs [35] and towards the bones or the lungs [36]. Another major step in the metastatic process is the ability of TGF- β to stimulate tumor associated angiogenesis and thus the dissemination of tumor cells into the bloodstream [10]. In this context, we clearly demonstrated that halofuginone reduces the angiogenic process as shown by decreased immunohistochemical staining for the endothelial marker CD146, as previously reported with the inhibitor SD-208 [11].

To sum up, our data demonstrated that halofuginone decreased primary osteosarcoma development and associated lung metastases by targeting both the tumor cells and the bone remodeling. In this context, halofuginone represents a promising therapeutic drug that can act at different key points of osteosarcoma progression: on tumor cells by inducing their apoptosis, on tumor microenvironment by inhibiting tumor associated osteolysis and on the metastatic process mainly by inhibiting the TGF- β signaling pathway.

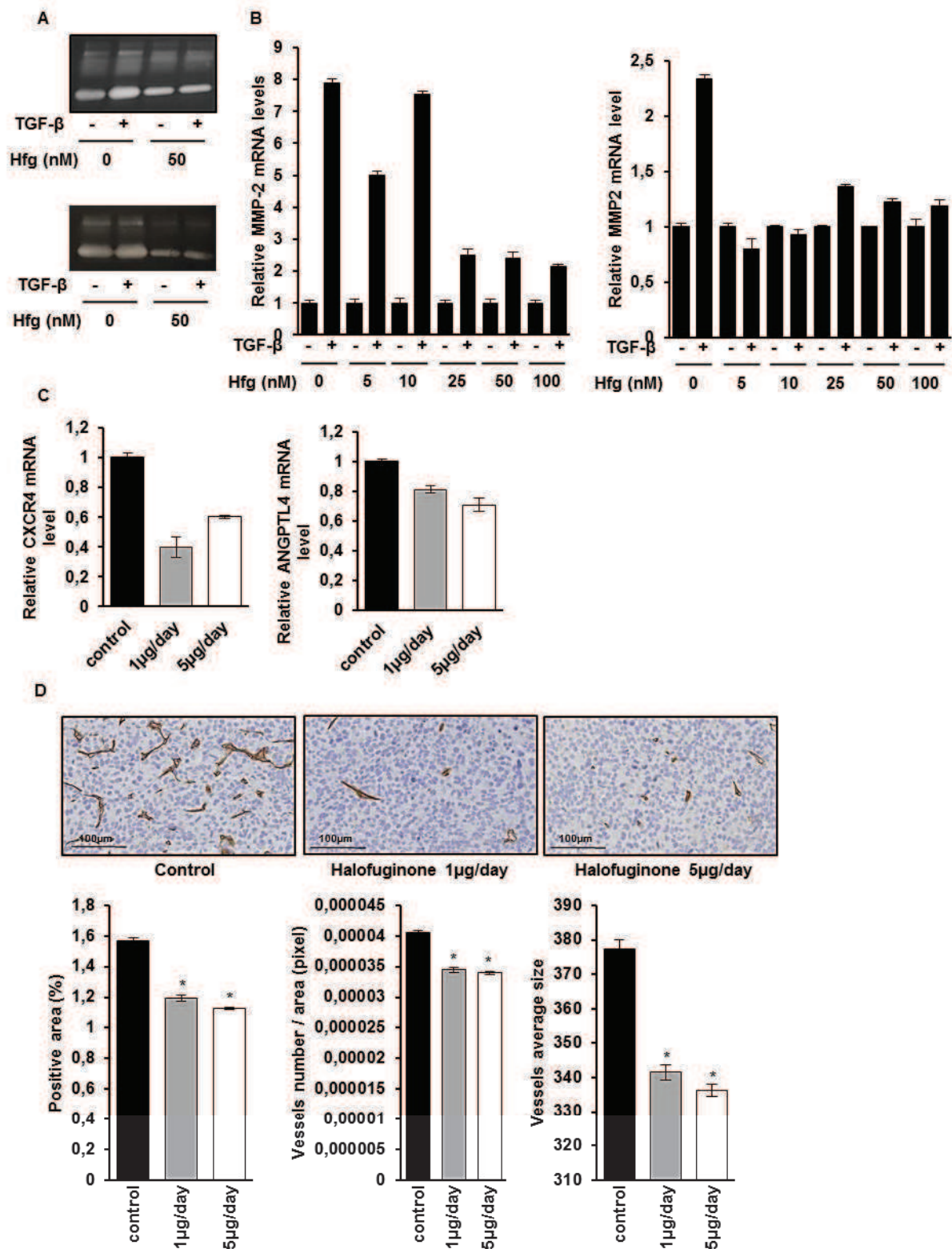


Figure 6: Halofuginone inhibits metastatic process

A) Zymography analysis of conditioned media from 10 h serum-free cultures of HOS (upper panel) and U2OS (lower panel) cells treated with halofuginone for 4 hours and then for 6h in the presence or absence of 5 ng/mL TGF- β . A Coomassie blue stained gel representative of three independent experiments is shown. **B)** HOS (left

panel) and U2OS (right panel) cells were treated with halofuginone for 4 hours and then for 6 hours in the presence or absence of TGF- β 1 (5 ng/ml). After incubation, *MMP-2* mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. Bars indicate mean \pm S.D. of at least two independent experiments carried out in triplicate (* $p < 0.05$; *** $p < 0.005$). **C**) RNA was extracted from tumor biopsies of mice treated with 1 μ g/mouse/day, 5 μ g/mouse/day halofuginone or vehicle. *CXCR4* (left panel) and *ANGPTL4* (right panel) mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. Bars indicate means \pm S.D. **D**) Tumor samples (tumor sizes at 500 mm³) from mice treated or not with halofuginone as indicated were fixed, embedded in paraffin, sectioned and stained with CD146. Representative photomicrographs per group for HOS osteosarcoma mice are shown. Histograms represent the percentage of positive area for CD146 (left panel), the number of vessels per total area (in pixel) (middle panel) and the average size of vessels (right panel) in each group of mice (Mean \pm SEM; * $p < 0.05$).

Materials and Methods

Cell culture and reagents

The human osteosarcoma cell lines MNNG/HOS (HOS, young female high-grade osteosarcoma from femur origin transformed *in vitro* by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine treatment), KHOS (derived from HOS by transformation using Kirsten murine sarcoma virus Ki-MSV), U2OS (young female osteosarcoma from tibia origin) and G292 (young female osteosarcoma) were purchased from the American Type Culture Collection (respectively CRL-1547™, CRL-1544™, HTB-96™, CRL-1423™) and cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyclonePerbio, Bezons, France) in a humidified 5% CO₂/air atmosphere at 37°C. All cell lines were passaged for less than 3 months and were authenticated by short tandem repeat (STR) profiling. TGF- β 1 and halofuginone (halofuginone hydrobromide, vetranal™) were respectively from R&D System, Inc (Minneapolis, MN) and Sigma (St Quentin-Fallavier, France). Halofuginone has been diluted in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Biowhittaker). Halofuginone has been diluted in DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Biowhittaker).

Osteosarcoma mouse model

Four-week-old female Rj:NMRI-nude mice (Elevages Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were maintained under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA Pays de la Loire n°06; project authorization n°1281.01) and under the supervision of authorized investigators. The mice were anesthetized by inhalation of a combination of isoflurane/air (1.5%, 1 L/min) before receiving an intramuscular injection of 2.10⁶ HOS osteosarcoma cells in close proximity to the tibia, leading to a rapidly growing tumor in soft tissue with secondary contiguous bone invasion. One day after HOS cells injection, some mice received different doses either 0.2 μ g/mouse/day (10 μ g/kg/day), 0.5 μ g/mouse/day (25 μ g/kg/day), 1 μ g/mouse/day (50 μ g/kg/day), 5 μ g/mouse/day (250 μ g/kg/day) of halofuginone or control vehicle (DPBS) by daily intraperitoneal injection. Note that the weight of each mouse was similar for each group at the beginning of the experiment and no weight loss was observed following treatment with halofuginone. The tumor volume (V) was calculated from the measurement of two perpendicular diameters using a caliper, according to the following formula: $V = 0.5 \times L \times (S)^2$ as previously described

[37]. Mice were sacrificed when the tumor volume reached 2500 mm³ for ethical considerations. Under these conditions, pulmonary metastases developed when primary tumor volumes were at least 2000 mm³.

Histologic analysis and immunohistochemistry of mice tumor samples

Tumor tissues were embedded in paraffin and 3- μ m sections were cut and stained for caspase-3, Ki-67 and CD146 using respectively rabbit polyclonal anti-caspase-3 (Cell Signaling), anti-Ki67 (Dako), anti-CD146 (Abcam) antibodies. Immunodetection was performed using DAB Substrate-Chromogen (Dako) and counterstained with hematoxylin. Quantification of relative caspase-3 positive surface, Ki-67 positive cells and CD146 immunostaining in tumor tissue were evaluated by ImageJ (NIH, Bethesda, MD) softwares.

Proliferation Assay

Osteosarcoma cell lines were plated in DMEM with 10% FBS and treated with halofuginone as indicated. Cell growth and viability were determined by using a WST-1 cell proliferation assay kit (Takara bio inc.). Absorbance of the samples was measured at 440nm wave length with Victor²[™] (Perkin Elmer, life sciences) ELISA reader after 2 hours incubation.

Cell cycle analysis

Osteosarcoma cell lines were incubated in the absence or the presence of halofuginone for 24h, trypsinized, washed twice and incubated in PBS containing 0.12% Triton X-100, 0.12mM EDTA and 100 μ g/mL ribonuclease A; 50 μ g/mL propidium iodide was then added to each sample for 20 min at 4°C. Cell cycle distribution was analysed by flow cytometry (Cytomics FC500; Beckman Coulter, Roissy, France) based on 2N and 4N DNA content.

Annexine-V assay

Osteosarcoma cells were cultured and treated with or without halofuginone for 12h or 24h. Cells were washed and resuspended in 1X binding buffer (BD pharmingen[™], BD Biosciences). Cells undergoing apoptosis were identified by flow cytometry (Cytomics FC500; Beckman Coulter, Roissy, France) after 20 min incubation with annexin V-FITC and propidium iodide.

Caspase 3/7 activity

Caspase 3/7 activity was measured using a Caspase-Glo assay kit (Promega). Briefly, cells were lysed in RIPA buffer (10 mM Tris pH8, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS) containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (1 mM sodium orthovanadate (Na₂VO₄), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM sodium fluoride (NaF), 10 mM N-ethylmaleimide (NEM), 2 μ g/ml leupeptin and 1 μ g/ml pepstatine) at 4 °C and protein concentration was determined by BCA kit (Sigma, St Quentin-Fallavier, France). An equal volume of reagents was added to a white-walled 96-well plate containing equal amounts of total protein extracts and incubated at room temperature for 1h. The luminescence of each sample was measured in a plate-reading luminometer Tristar LB941 (Berthold technologies).

Western blot analysis

Cells were lysed in RIPA buffer and protein concentration was determined as described above. Samples containing equal amounts of total protein extracts (depending on the antibody, 30–50 μ g) in Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to PVDF Transfer membrane (Thermo scientific). The membranes were blocked in 3% BSA-PBS-0.1% Tween at room temperature for 1 h and blots were probed overnight at 4°C with primary

antibodies anti-phospho-Smad3 (Millipore, Temecula, CA, USA), anti-Smad3 (Millipore), anti-PARP (Cell signaling technology, Beverly, USA), anti-Caspase 3 (Cell Signaling Technology) or anti- β -actin (Sigma) antibodies. After incubation, the membranes were washed three times with washing buffer (PBS containing 0.1% Tween) for 5 min. Membranes were then incubated for 1 h with 1:10,000 diluted secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) at room temperature. Specific proteins were detected using G-Box (Syngene, Cambridge, UK) after washing. Antibody binding was visualized with the enhanced chemiluminescence system (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific, Illkirch, France).

Micro-CT analysis

Analysis of bone microarchitecture was performed using the high-resolution X-ray micro-CT system for small-animal imaging SkyScan-1072 (SkyScan, Kartuizersweg, Belgium) at different tumor volumes (500, 1000 and 2500 mm³). All tibia/fibula were scanned using the same parameters (pixel size 18 μ m, 50kV, 0.5-mm aluminium filter and 0.6 degrees per rotation step). Analysis of bone parameters were performed using the CTan software (Skyscan). The bone volume (BV) of ectopic bone was quantified over the total length of tibia bearing 2500 mm³ tumor. Trabecular structures positioned 0.2 mm below the growth plate were quantified over a length of 1 mm at 1000 mm³ tumor volume since at higher tumor volume trabecular bone is completely destroyed by the tumor cells. Bone volume/trabecular volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th) and trabecular number (Tb.N) were determined.

Real-time polymerase chain reaction

Total RNA from cell lines was extracted using NucleoSpin[®]RNAII (Macherey Nagel, Duren, Germany). Total RNA from tumors was extracted

using the TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies) after mechanical grinding with Turrax (IKA, Staufen, Switzerland). Total RNA was reversed transcribed using the Maxima H minus first stand cDNA synthesis kit (Thermoscientific). Real-time monitoring of PCR amplification of complementary DNA was performed using DNA primers (primers sequences are available in Table 1) on CFX96 real-time PCR detector system (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) with SYBR PCR Master Mix buffer (Bio-Rad). Target gene expression was normalized to glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase (GAPDH) levels in respective samples as an internal standard.

Collagen degradation.

The degradation of collagen was evaluated by the measure of pyridinoline excretion in mice serum using the MicroVue Serum PYD EIA kit (Quidel, CA).

Transient cell transfection, reporter assay and plasmid construct

Transient cell transfections were performed with jetPEI[™] (Polyplus-transfection, Illkirch, France). The phRLMLP-*Renilla* luciferase expression vector was cotransfected in all experiments to monitor transfection efficiencies. Luciferase activity was determined with the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega, Charbonnieres, France). The (CAGA)₉-Luc construct was used as a reporter construct specific for Smad3/4-driven signaling.

Gelatin zymography.

Cells were cultured without serum for 10h and their conditioned media were analyzed by gelatin zymography in 10% polyacrylamide gels containing 1 mg/ml gelatin (Sigma-Aldrich) as described previously [33].

Statistical analysis

All analyses were performed using GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) or Excel. Results of in vitro experiments were analyzed with the unpaired t-test and are given as means \pm SD. For in vivo experiments, results from groups treated with 1 μ g/mouse/day or 5 μ g/mouse/day were compared with no treated control groups using the unpaired t-test and are

given as means \pm SEM. Results with $p < 0.05$ were considered significant.

Acknowledgments

We thank Ligue contre le Cancer, Ecole de l'INSERM and Fondation Bettencourt Schueller for their financial supports. No potential conflicts of interest were disclosed.

References

1. Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res.* 2009; 152:3-13.
2. Dass CR, Ek ET, Contreras KG, Choong PF. A novel orthotopic murine model provides insights into cellular and molecular characteristics contributing to human osteosarcoma. *Clin Exp Metastasis.* 2006; 23:367-80.
3. Ando K, Heymann M-F, Stresing V, Mori K, Rédini F, Heymann D. Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma. *Cancers.* 2013; 5:591-616.
4. Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M, Kroep JR, Taminiau AHM, Hogendoorn PCW, Egeler RM. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2011; 47:2431-45.
5. Patel SJ, Lynch JW, Johnson T, Carroll RR, Schumacher C, Spanier S, Scarborough M. Dose-intense ifosfamide/doxorubicin/cisplatin based chemotherapy for osteosarcoma in adults. *Am J Clin Oncol.* 2002; 25:489-95.
6. Clark JCM, Dass CR, Choong PFM. A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008; 134:281-97.
7. Halvorson KG, Sevcik MA, Ghilardi JR, Rosol TJ, Mantyh PW. Similarities and differences in tumor growth, skeletal remodeling and pain in an osteolytic and osteoblastic model of bone cancer. *Clin J Pain.* 2006; 22:587-600.
8. Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, Boyce BF, Yoneda T, Mundy GR. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest.* 1996; 98:1544-9.
9. Grano M, Mori G, Minielli V, Cantatore FP, Colucci S, Zallone AZ. Breast cancer cell line MDA-231 stimulates osteoclastogenesis and bone resorption in human osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 270:1097-100.
10. Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J Pathol.* 2011; 223:205-18.
11. Lamora A, Talbot J, Bougras G, Amiaud J, Leduc M, Chesneau J, Taurelle J, Stresing V, Le Deley MC, Heymann MF, Heymann D, Redini F, Verrecchia F. Overexpression of smad7 blocks primary tumor growth and lung metastasis development in osteosarcoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2014; 20:5097-112.
12. Pines M, Nagler A. Halofuginone: a novel antifibrotic therapy. *Gen Pharmacol.* 1998; 30:445-50.

13. Koon HB, Fingleton B, Lee JY, Geyer JT, Cesarman E, Parise RA, Egorin MJ, Dezube BJ, Aboulafia D, Krown SE. Phase II AIDS Malignancy Consortium trial of topical halofuginone in AIDS-related Kaposi sarcoma. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 2011; 56:64-8.
14. Jin ML, Park SY, Kim YH, Park G, Lee SJ. Halofuginone induces the apoptosis of breast cancer cells and inhibits migration via downregulation of matrix metalloproteinase-9. *Int J Oncol*. 2014; 44:309-18.
15. Juárez P, Mohammad KS, Yin JJ, Fournier PGJ, McKenna RC, Davis HW, Peng XH, Niewolna M, Javelaud D, Chirgwin JM, Mauviel A, Guise TA. Halofuginone inhibits the establishment and progression of melanoma bone metastases. *Cancer Res*. 2012; 72:6247-56.
16. Leiba M, Jakubikova J, Klippel S, Mitsiades CS, Hideshima T, Tai Y-T, Leiba A, Pines M, Richardson PG, Nagler A, Anderson KC. Halofuginone inhibits multiple myeloma growth in vitro and in vivo and enhances cytotoxicity of conventional and novel agents. *Br J Haematol*. 2012; 157:718-31.
17. Spector I, Honig H, Kawada N, Nagler A, Genin O, Pines M. Inhibition of pancreatic stellate cell activation by halofuginone prevents pancreatic xenograft tumor development. *Pancreas*. 2010; 39:1008-15.
18. Pinthus JH, Sheffer Y, Nagler A, Fridman E, Mor Y, Genina O, Pines M. Inhibition of Wilms tumor xenograft progression by halofuginone is accompanied by activation of WT-1 gene expression. *J Urol*. 2005; 174:1527-31.
19. Nagler A, Ohana M, Shibolet O, Shapira MY, Alper R, Vlodavsky I, Pines M, Ilan Y. Suppression of hepatocellular carcinoma growth in mice by the alkaloid coccidiostat halofuginone. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2004; 40:1397-403.
20. Elkin M, Miao HQ, Nagler A, Aingorn E, Reich R, Hemo I, Dou HL, Pines M, Vlodavsky I. Halofuginone: a potent inhibitor of critical steps in angiogenesis progression. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2000; 14:2477-85.
21. Abramovitch R, Dafni H, Neeman M, Nagler A, Pines M. Inhibition of neovascularization and tumor growth, and facilitation of wound repair, by halofuginone, an inhibitor of collagen type I synthesis. *Neoplasia N Y N*. 1999; 1:321-9.
22. Gavish Z, Pinthus JH, Barak V, Ramon J, Nagler A, Eshhar Z, Pines M. Growth inhibition of prostate cancer xenografts by halofuginone. *The Prostate*. 2002; 51:73-83.
23. Xavier S, Piek E, Fujii M, Javelaud D, Mauviel A, Flanders KC, Samuni AM, Felici A, Reiss M, Yarkoni S, Sowers A, Mitchell JB, Roberts AB, Russo A. Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone. *J Biol Chem*. 2004; 279:15167-76.
24. De Figueiredo-Pontes LL, Assis PA, Santana-Lemos BAA, Jácomo RH, Lima ASG, Garcia AB, Thomé CH, Araújo AG, Panepucci RA, Zago MA, Nagler A, Falcão RP, Rego EM. Halofuginone has anti-proliferative effects in acute promyelocytic leukemia by modulating the transforming growth factor beta signaling pathway. *PloS One*. 2011; 6:e26713.
25. Chou AJ, Geller DS, Gorlick R. Therapy for osteosarcoma: where do we go from here? *Paediatr Drugs*. 2008; 10:315-27.
26. Hattinger CM, Pasello M, Ferrari S, Picci P, Serra M. Emerging drugs for high-grade osteosarcoma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2010; 15:615-34.
27. Van Oosterwijk JG, Anninga JK, Gelderblom H, Cleton-Jansen A-M, Bovée JVMG. Update on targets and novel treatment options for high-grade

osteosarcoma and chondrosarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013; 27:1021-48.

28. Grignani G, Palmerini E, Dileo P, Asaftei SD, D'Ambrosio L, Pignochino Y, Mercuri M, Picci P, Fagioli F, Casali PG, Ferrari S, Aglietta M. A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard multimodal therapy: an Italian Sarcoma Group study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2012; 23:508-16.

29. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35:495-516.

30. Chirgwin JM, Guise TA. Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2000; 10:159-78.

31. Chirgwin JM, Mohammad KS, Guise TA. Tumor-bone cellular interactions in skeletal metastases. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004; 4:308-18.

32. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003; 423:337-42.

33. Javelaud D, Delmas V, Möller M, Sextius P, André J, Menashi S, Larue L, Mauviel A. Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells inhibits their tumorigenicity in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2005; 24:7624-9.

34. Javelaud D, Mohammad KS, McKenna CR, Fournier P, Luciani F, Niewolna M, André J, Delmas V, Larue L, Guise TA, Mauviel A. Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis. *Cancer Res.* 2007; 67:2317-24.

35. Padua D, Zhang XH-F, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massagué J. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell.* 2008; 133:66-77.

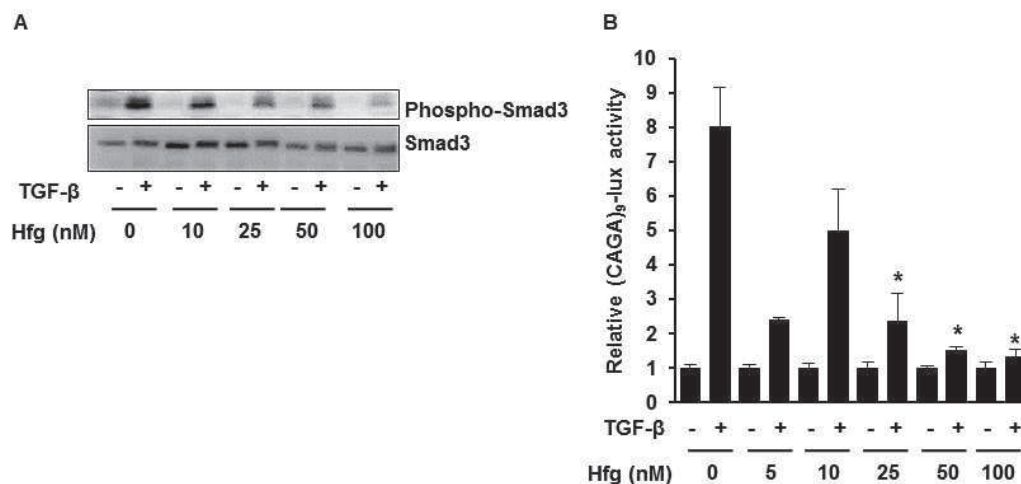
36. Liang Z, Wu T, Lou H, Yu X, Taichman RS, Lau SK, Nie S, Umbreit J, Shim H. Inhibition of breast

cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res.* 2004; 64:4302-8.

37. Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann M-F, 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.

	Sense	Antisense
<i>ANGPTL4</i>	gAC CCg gCT CAC AAT gTC	CCC TgA ggC Tgg ATT TCA
<i>CTGF</i>	CTC CTg Cag gCT AgA gAA gC	gAT gCA CTT TTT gCC CTT CTT
<i>CXCR4</i>	CCg Agg AAA Tgg gCT Cag ggg A	TgA Tgg AgT AgA Tgg Tgg gCA ggA
<i>GAPDH</i>	Tgg gTg TgA ACC Atg AgA AgT Atg	ggT gCA ggA ggC ATT gCT
<i>IL-11</i>	gCA gCg gAC Agg gAA ggg TTA A	ACA ggC TCA gCA CgA CCA gg
<i>MMP2</i>	AgA Agg CTg TgT TCT TTg CAg	Agg CTg gTC AgT ggC TTg
<i>RANKL</i>	TCg TTg gAT CAC AgC ACA TCA	TCg TTg gAT CAC AgC ACA TCA
<i>Smad7</i>	TTT gCC TCg gAC AgC TCA AT	TTT TTg CTC Cgc ACC TTC Tg
<i>TβRI</i>	gCA gAC TTA ggA CTg gCA gTA Ag	AgA ACT TCA ggg gCC ATg T
<i>TβRII</i>	CCA CCA CCA ggg CAT CCA	TCg Tgg TCC CAg CAC TCA

Table 1. Primer sequence for quantitative RT-PCR.

**Supplementary Figure S1: Halofuginone blocks the TGF-β/Smad3 cascade in U2OS cells**

A) U2OS cells were treated for 4 hours with halofuginone as indicated and then for 30 min in the presence or absence of TGF-β (5 ng/ml). Phospho-Smad3 levels were detected by Western Blot analysis of U2OS whole cell lysates (upper panel). Anti-Smad3 antibody was used as internal control (lower panel). **B)** U2OS cells were transfected with the Smad3/4-specific construct (CAGA)₉-luc. 24h after transfection, cells were treated for 4 hours with halofuginone as indicated and then for 6 hours in presence or absence of TGF-β (5 ng/ml). Bars indicate mean ± S.D. of at least two independent experiments carried out in triplicate (*p<0.05).

III. Conclusion partielle

Dans cet article, nous avons évalué le potentiel anti-tumoral de l'halofuginone dans l'ostéosarcome. Nous démontrons que l'halofuginone inhibe significativement la croissance tumorale *in vivo*. Cette inhibition de la croissance de la tumeur primitive s'explique en partie par l'induction de l'apoptose. L'halofuginone induit effectivement l'apoptose caspase-3 dépendante dans les cellules d'ostéosarcome de manière dose et temps-dépendant. De plus, nous démontrons que l'halofuginone affecte le remodelage osseux associé à la tumeur notamment en inhibant l'ostéolyse tumorale. Cette inhibition de l'ostéolyse s'accompagne d'une inhibition de l'expression de RANKL par les cellules tumorales, facteur hautement impliqué dans le cercle vicieux qui s'établit entre prolifération tumorale et résorption osseuse dans l'ostéosarcome.

Dans cet article, nous démontrons également que l'halofuginone inhibe significativement le développement métastatique en diminuant l'incidence des métastases ainsi que leur nombre *in vivo*. L'halofuginone s'avère inhiber la voie de signalisation du TGF- β dans l'ostéosarcome en inhibant la phosphorylation de Smad3, la réponse transcriptionnelle médiée par Smad3 et en induisant l'expression de Smad7. Cette molécule semble également inhiber l'expression des récepteurs au TGF- β . De plus, cette étude démontre que l'halofuginone inhibe la capacité du TGF- β à induire l'expression et l'activité de MMP2, hautement impliquée dans le développement métastatique. Enfin, nos travaux démontrent que l'halofuginone inhibe significativement l'angiogenèse en réduisant le nombre et la taille des vaisseaux sanguins au sein de la tumeur.

En conclusion, cet article démontre l'effet anti-tumoral et anti-métastatique de l'halofuginone dans l'ostéosarcome, en ciblant à la fois les cellules tumorales et leur environnement, bloquant ainsi le cercle vicieux établi. L'utilisation de cette molécule pourrait conduire vers des perspectives thérapeutiques intéressantes pour les patients atteints de cette pathologie.

Discussion Générale

I. Le TGF- β , facteur pronostic dans l'ostéosarcome ?

Les cellules tumorales sont capables de sécréter de grandes quantités de TGF- β ⁵⁰⁸. En effet, des concentrations élevées en TGF- β 1 ont été détectées dans les sérums de patients atteints de cancer du poumon, cancer du sein, glioblastome multiforme, cancer colorectal, carcinome hépatocellulaire, carcinome de la vessie, carcinome rénal ou encore cancer de l'estomac et sont associées au grade et au stade de la tumeur ainsi qu'au pronostic du patient⁵⁰⁹. Dans certains cas, cette augmentation est corrélée à la présence de métastases. De la même manière, une augmentation du TGF- β 1 au niveau protéique ou transcriptionnel semble corrélée à la progression, au grade et au développement métastatique de nombreux cancers^{304,307,510,511}. Avec des niveaux d'expression de TGF- β 1 plus élevés dans les ostéosarcomes de haut grade que de bas grade, le TGF- β semble également être un marqueur de mauvais pronostic dans cette pathologie³⁸⁶. Dans ces travaux de thèse, nous avons démontré une augmentation significative des TGF- β 1 et - β 2 dans les sérums de patients atteints d'ostéosarcome par rapport à ceux de personnes saines. Un tel marqueur sérique semble d'un grand intérêt en tant que facteur pronostic dans cette pathologie. Malheureusement dans nos travaux, aucune corrélation n'a pu être établie entre l'état métastatique des patients et les niveaux de TGF- β s mesurés dans les sérums. Au vu des données existantes en cancérologie quant à l'augmentation sérique de TGF- β corrélée au caractère métastatique de la tumeur, ce travail demande à être approfondi sur un plus grand nombre d'échantillons. Un tel biomarqueur semblerait utile de manière à adapter le traitement, évaluer le pronostic et dépister plus précocement les récidives. Si de telles études étaient entreprises, le TGF- β étant impliqué dans de nombreuses autres pathologies, un intérêt particulier devrait être porté sur la spécificité de ce marqueur.

Dans ce travail de thèse, nous démontrons également l'activation de la voie du TGF- β par les Smads dans des biopsies de patients, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de Smad3 dans les biopsies de patients métastatiques par rapport aux patients non métastatiques. Ces expériences demandent à être confirmées sur un nombre plus important d'échantillons mais suggèrent d'ores et déjà un rôle pro-métastatique potentiel de la voie de signalisation du TGF- β par les Smads dans l'ostéosarcome. Ces résultats soulignent également l'intérêt éventuel de l'utilisation du marquage de la forme phosphorylée de Smad3 en tant que biomarqueur pronostic dans l'ostéosarcome.

D'autre part, ces résultats soulèvent une question importante, à savoir si l'augmentation de TGF- β dans les sérums de patients atteints d'ostéosarcome est une cause ou une conséquence de la pathologie. En effet, l'augmentation sérique de TGF- β s observée peut être une conséquence du développement de l'ostéosarcome puisqu'elle peut être due à une augmentation de la libération de TGF- β par différents acteurs impliqués dans cette pathologie (Figure 40). Comme nous l'avons mentionné, on connaît effectivement aujourd'hui la capacité des cellules tumorales à sécréter du TGF- β . Les cellules de mélanome par exemple, sécrétant du TGF- β de manière accrue, activent la voie des Smads de manière autocrine⁵¹² et cette sécrétion semble corrélée à leur agressivité. L'augmentation des concentrations en TGF- β s dans les sérums de patients atteints d'ostéosarcome par rapport aux individus sains pourrait alors s'expliquer par la capacité des cellules tumorales à sécréter ce facteur de croissance. De plus, cette augmentation pourrait également être liée aux effets directs et/ou indirects des cellules d'ostéosarcome sur les cellules présentes dans le microenvironnement tumoral osseux. En effet, dans le cadre du cercle vicieux qui s'établit dans l'ostéosarcome, les cellules tumorales peuvent sécréter différents facteurs capables de stimuler la libération de TGF- β par les cellules osseuses. Enfin, l'ostéolyse associée à la tumeur contribue également à la libération de TGF- β contenu dans la matrice osseuse. Ces phénomènes peuvent peut-être expliquer l'augmentation de TGF- β dans les sérums de patients et seraient donc en faveur d'une conséquence de la pathologie.

D'autre part, étant donnés les effets importants du TGF- β en cancérologie ainsi que sur la différenciation et la prolifération des cellules osseuses, l'augmentation du TGF- β chez les patients pourrait peut-être être envisagée comme une des causes de la pathologie en participant par exemple à l'initiation et au développement tumoral. Cause ou conséquence, le TGF- β semble exercer un rôle pro-tumoral dans l'ostéosarcome et nous nous sommes donc intéressés aux effets de l'inhibition de cette voie de signalisation en développant trois stratégies : la surexpression du Smad-inhibiteur Smad7, l'utilisation du SD-208 ou de l'halofuginone (Figure 41). Les effets principaux observés dans ces travaux de thèse sont résumés dans le tableau 7.

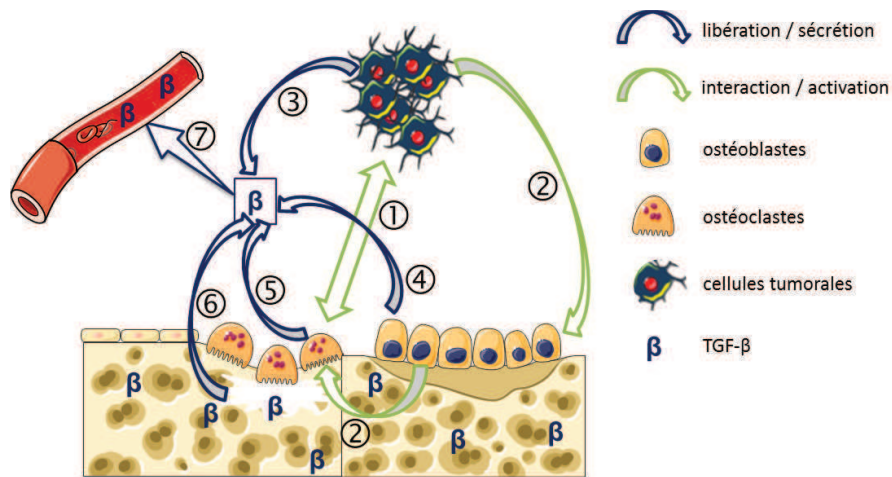


Figure 40 : Hypothèses expliquant l'augmentation de TGF- β dans les sérums de patients atteints d'ostéosarcome

Les cellules tumorales peuvent activer les ostéoclastes de manière directe ① ou indirecte via les ostéoblastes ②, stimulant ainsi l'ostéolyse. L'augmentation de TGF- β dans les sérums de patients atteints d'ostéosarcome pourrait provenir de la libération de ce facteur par les cellules tumorales ③, les ostéoblastes ④, les ostéoclastes ⑤ ou de l'ostéolyse associée à la croissance tumorale qui libère le TGF- β contenu dans la matrice osseuse ⑥. Le TGF- β ainsi libéré de manière accrue rejoindrait la circulation sanguine ⑦.

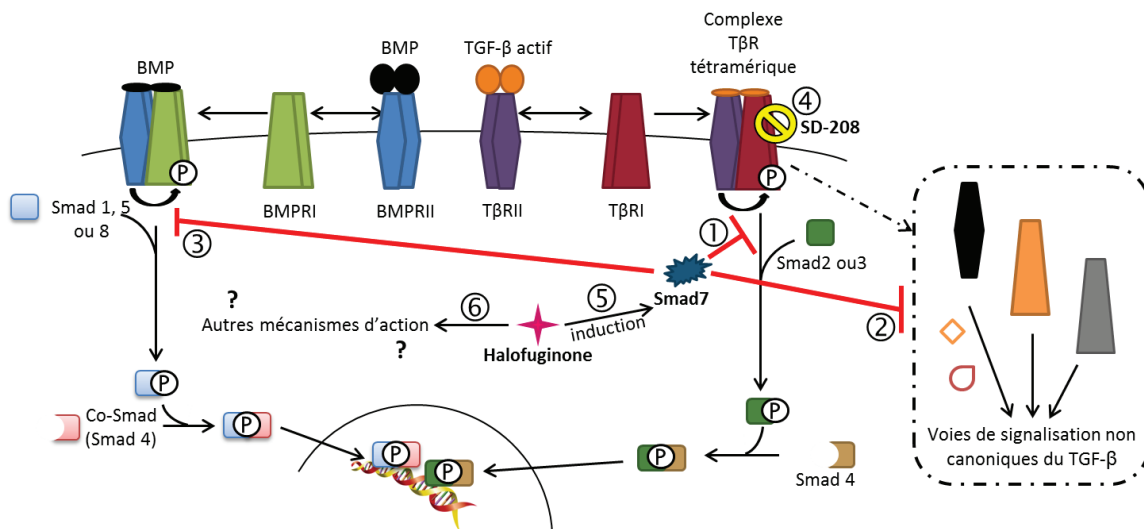


Figure 41 : Action de Smad7, du SD-208 et de l'halofuginone sur les voies de signalisation du TGF- β

Smad7 inhibe la voie de signalisation du TGF- β par les Smads ① et certaines de ses voies non canoniques ② ainsi que la voie de signalisation des BMPs ③. Le SD-208 inhibe spécifiquement la voie de signalisation du TGF- β par les Smads en agissant sur T β RI ④. L'halofuginone inhibe la voie de signalisation du TGF- β en induisant Smad7 ⑤ et par des mécanismes d'action encore inconnus ⑥.

	Cellules d'ostéosarcome surexprimant Smad7	Traitement au SD-208	Traitement à l'halofuginone	
Croissance de la tumeur primitive	Inhibition	Pas d'effet	Inhibition	Prolifération et apoptose
Prolifération <i>in vitro</i>	Pas d'effet	Pas d'effet	Inhibition	
Prolifération <i>in vivo</i>	Inhibition	Pas d'effet	Inhibition	
Apoptose <i>in vitro</i>	Pas d'effet	Pas d'effet	Induction	
Apoptose <i>in vivo</i>	Pas d'effet	Pas d'effet	Induction	
Ostéolyse associée à la tumeur	Inhibition	Pas d'effet	Inhibition	Microenvironnement et remodelage osseux
Ostéoformation associée à la tumeur	Induction	Pas d'effet	Induction	
Expression des gènes de l'ostéolyse	Inhibition	Inhibition	Inhibition	
Libération de facteurs ostéolytiques	Inhibition	Inhibition	Inhibition	
Volume osseux de l'os sain		Augmentation	Pas d'effet	
Différenciation ostéoclastique <i>in vitro</i>		Inhibition		
Différenciation ostéoblastique <i>in vitro</i>		Induction		
Minéralisation <i>in vitro</i>		Induction		
Incidence des métastases	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Dissemination métastatique
Nombre de métastases	Inhibition	Inhibition	Inhibition	
Migration / invasion	Inhibition	Inhibition		
Expression et activité de MMP2	Inhibition	Inhibition	Inhibition	
Angiogenèse	Inhibition	Inhibition	Inhibition	
Expression des gènes de l'angiogenèse	Inhibition	Inhibition	Inhibition	

Tableau 7 : Récapitulatif des effets des 3 stratégies inhibant la voie de signalisation du TGF- β

II. Effets directs et/ou indirects de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β sur la croissance tumorale des ostéosarcomes

1. Prolifération et apoptose

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons démontré que la surexpression de Smad7 dans les cellules d'ostéosarcome et le traitement par l'halofuginone inhibent significativement la croissance de la tumeur primitive dans nos modèles *in vivo*. De manière intéressante, des résultats similaires ont été rapportés dans différents modèles précliniques de cancer. En effet, la surexpression de Smad7 dans des cellules de mélanome inhibe la croissance tumorale⁴³⁶ et l'halofuginone inhibe la croissance de tumeurs du pancréas et de myélome multiple en traitement intrapéritonéal^{469,484} ainsi que la croissance de carcinome hépatocellulaire et de cancer de la prostate par voie orale^{478,513}. Malgré ces données de la littérature, les résultats obtenus *in vivo* dans nos modèles d'ostéosarcome semblent surprenants au vu de l'absence d'effet du TGF- β sur la prolifération de ces cellules *in vitro*. Effectivement, nous avons démontré que le TGF- β n'affecte ni la prolifération, ni le cycle cellulaire, ni la viabilité des cellules d'ostéosarcome *in vitro* contrairement aux effets inhibiteurs observés notamment dans le cas de cellules tumorales d'origine épithéliale. Nous avons également montré que la surexpression de Smad7 ainsi que l'utilisation du SD-208 n'ont pas d'effets sur ces paramètres sur des cellules en culture, en absence ou en présence de TGF- β . En tant que stratégie inhibitrice de la voie de signalisation du TGF- β n'affectant pas la prolifération cellulaire, nous pouvons donc nous attendre à une absence d'effet de la surexpression de Smad7 sur la croissance de la tumeur primitive *in vivo*. Nos résultats prouvent cependant que la surexpression de Smad7 inhibe significativement la croissance de l'ostéosarcome dans des expérimentations précliniques et nous pouvons formuler différentes hypothèses pour l'expliquer.

Tout d'abord, nous ne pouvons pas exclure un effet propre de Smad7 sur la prolifération et la viabilité cellulaire (Figure 42). La stratégie utilisant l'halofuginone, connu entre autre comme un inducteur de Smad7, a d'ailleurs permis d'observer des effets comparables à la surexpression de Smad7 sur la croissance de la tumeur primitive *in vivo* mais en affectant quant à elle la prolifération cellulaire.

De manière intéressante, une diminution de la prolifération des cellules tumorales chez les souris injectées avec des cellules surexprimant Smad7 a été mise en évidence par rapport à des souris injectées avec des cellules contrôles. Ces effets anti-prolifératifs observés *in vivo* et l'absence d'effets de cette stratégie observée *in vitro* peuvent suggérer des effets indirects de Smad7 sur la prolifération via le microenvironnement tumoral. Nous pouvons formuler l'hypothèse que la surexpression de Smad7 dans les cellules tumorales, en inhibant l'ostéolyse associée à la tumeur, diminuerait la libération de facteurs pro-prolifératifs contenus dans le tissu osseux. La surexpression de Smad7 pourrait également permettre de diminuer la libération de facteurs pro-prolifératifs ou au contraire de stimuler la libération de facteurs anti-prolifératifs par les ostéoblastes (Figure 42). Smad7 pourrait également être capable de réguler l'expression de gènes cibles conférant aux cellules tumorales une résistance aux stimuli pro-prolifératifs émanant de l'environnement tumoral.

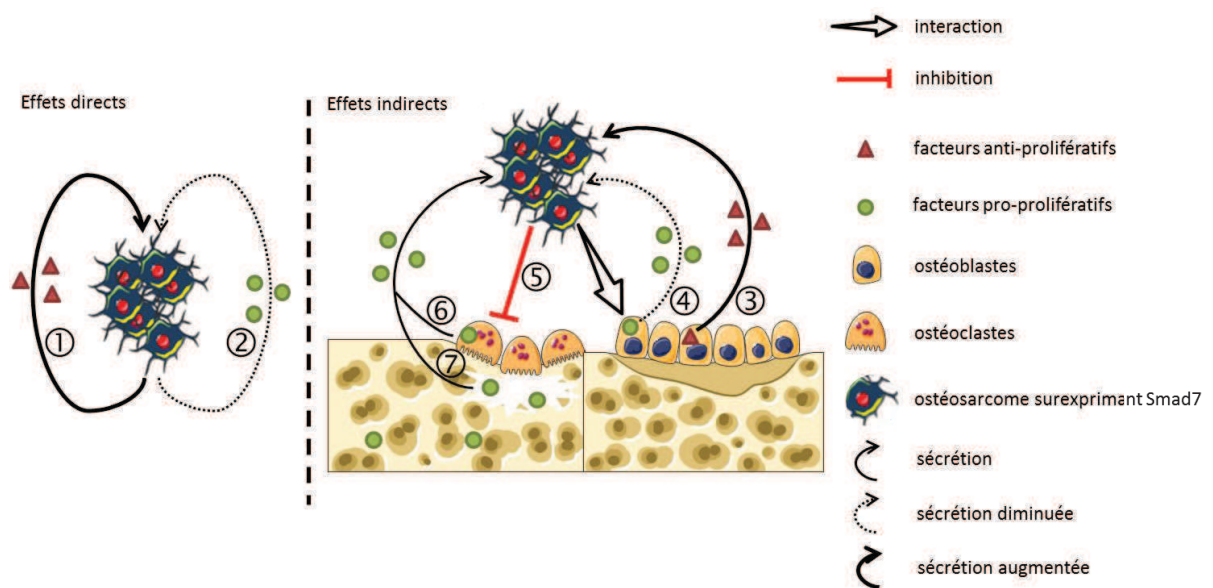


Figure 42 : Effets hypothétiques de la surexpression de Smad7 sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome

Des effets directs de la surexpression de Smad7 sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome ne peuvent pas être exclus. La surexpression de Smad7 aurait pour effet d'augmenter la sécrétion de facteurs anti-prolifératifs ① et de diminuer la sécrétion de facteurs pro-prolifératifs ② agissant de manière autocrine. Au vu de l'absence d'effet de la surexpression de Smad7 sur la prolifération *in vitro* et de ses effets anti-prolifératifs *in vivo*, des effets indirects via le microenvironnement tumoral osseux semblent plus probables. Les cellules surexprimant Smad7 pourraient stimuler la libération de facteurs anti-prolifératifs ③ et réduire la libération de facteur pro-prolifératifs ④ par les ostéoblastes. Les cellules surexprimant Smad7 inhibent l'activité ostéoclastique ⑤ et permettent ainsi de réduire la libération de facteurs pro-prolifératifs par les ostéoclastes ⑥ ou contenus dans la matrice osseuse ⑦.

De manière intéressante, d'autres travaux rapportent des résultats similaires aux nôtres, à savoir que la surexpression de Smad7 dans des cellules de mélanome n'affecte pas leur prolifération *in vitro* mais inhibe la croissance tumorale *in vivo*⁴³⁶. Une des hypothèses soulevées pour justifier ces observations semble résider dans les effets des facteurs libérés par les cellules tumorales sur le microenvironnement. Un des arguments majeurs avancé serait la capacité des cellules tumorales à sécréter des protéines matricielles, des facteurs de croissance ou des molécules d'adhésion responsables d'un environnement optimal pour la croissance et la progression tumorale⁵¹⁴. Smad7 serait alors potentiellement capable d'affecter cet environnement favorable. Cette étude démontre que les effets autocrines du TGF- β 1 sécrété par les cellules tumorales ne sont pas directement impliqués dans la croissance tumorale mais que ses effets paracrines sur le microenvironnement tumoral le sont. Cet environnement tumoral apparaît comme une niche nécessaire au développement

de la tumeur. La stimulation paracrine des cellules du microenvironnement induirait à son tour la libération d'autres facteurs régulant positivement la survie et la croissance tumorale⁵¹⁴. Dans le contexte de notre étude, la surexpression de Smad7 pourrait affecter la capacité des cellules tumorales à maintenir ce microenvironnement propice à la croissance tumorale et cet argument serait en faveur de notre hypothèse sur une action indirecte de Smad7 sur la prolifération cellulaire (Figure 42). En ce qui concerne l'apoptose, l'immunomarquage de la caspase-3 semble confirmer les résultats *in vitro* indiquant que la surexpression de Smad7 n'affecte pas la mort cellulaire.

Dans ces travaux, nous démontrons que l'utilisation du SD-208, en tant qu'inhibiteur spécifique de la voie de signalisation du TGF- β , n'affecte pas la croissance de la tumeur primitive. Ces résultats semblent également en faveur d'effets indirects de la surexpression de Smad7 et indépendants du TGF- β sur la prolifération. Cependant, d'autres travaux démontrent de manière intéressante que l'utilisation du SD-208 inhibe la croissance de la tumeur primitive dans certains modèles de cancers induits chez la souris immunocompétente sans affecter la croissance tumorale de ce même cancer induit chez la souris *nude*⁴⁴². Ces résultats soulignent donc également le rôle majeur du microenvironnement tumoral, en particulier dans son contexte immunologique, sur la croissance tumorale. Il serait intéressant de vérifier ces observations en comparant nos résultats obtenus chez la souris *nude* à d'autres modèles d'ostéosarcomes murins induits chez la souris immunocompétente disponibles au laboratoire.

Les différences observées sur la croissance de la tumeur primitive entre la stratégie surexprimant Smad7 et celle utilisant le SD-208 (Tableau 7) peuvent s'expliquer par différentes hypothèses. Il est en effet admis que Smad7 exerce des effets sur d'autres voies de signalisation, indépendamment de son rôle inhibiteur de la voie du TGF- β par les Smads (Figure 41). A la différence du SD-208 qui inhibe spécifiquement la voie de signalisation du TGF- β au niveau de T β RI, Smad7 est capable d'inhiber d'autres voies telle celle des BMPs. Il serait donc possible que l'inhibition d'une de ces voies de signalisation soit responsable de l'inhibition de la prolifération. D'autre part, Smad7 est également connu pour ses fonctions propres en matière de signalisation cellulaire. Il est par exemple capable de potentialiser des effets pro-apoptotiques sur le cancer de la prostate ou encore d'activer différentes voies de signalisation telle JNK^{429,430}. Bien que nous n'ayons observé aucun effet du TGF- β sur la prolifération et l'apoptose des cellules d'ostéosarcome et de Smad7 sur sa capacité à

stimuler la voie des MAPK, nous ne pouvons exclure cette hypothèse. Enfin, les différences observées sur la croissance tumorale suite à l'utilisation de ces deux stratégies peuvent s'expliquer par leurs effets différents sur le microenvironnement tumoral et plus particulièrement sur le remodelage osseux et seront traitées ultérieurement.

Les effets anti-tumoraux induits par la surexpression de Smad7 nous ont conduits à évaluer le potentiel anti-tumoral de l'halofuginone, un alcaloïde connu comme inhibiteur de la voie de signalisation du TGF- β notamment par sa capacité à induire l'expression de Smad7. Dans ces travaux de thèse, nous démontrons que l'halofuginone inhibe la croissance tumorale des ostéosarcomes *in vivo*. Contrairement à la stratégie surexprimant Smad7, nous démontrons que l'halofuginone exerce des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques sur les cellules d'ostéosarcome en culture. En effet, l'halofuginone induit l'apoptose des cellules d'ostéosarcome de manière dose-dépendante en induisant notamment le clivage et l'activation de la caspase-3 impliquée à la fois dans les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. Ces effets pro-apoptotiques de l'halofuginone sont confirmés sur les échantillons biologiques de souris grâce à des analyses histologiques. Bien que l'halofuginone soit connu comme un inhibiteur de la voie de signalisation du TGF- β capable entre autre d'induire l'expression de Smad7, les effets majeurs de cette molécule semblent différents de ceux obtenus par la simple surexpression de Smad7, soulignant donc une part de son activité anti-tumorale indépendante de la voie de signalisation du TGF- β par les Smads.

L'halofuginone est connu pour ses effets pro-apoptotiques dans de nombreux types de cancers comme le mélanome, le cancer du sein ou encore le myélome multiple^{480,484,499}. Les mécanismes d'action de cette molécule demeurent encore mal compris mais les études menées suggèrent l'implication à la fois des voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose, initiées respectivement par les récepteurs de mort et la mitochondrie⁵⁰⁴. Certaines études suggèrent que l'halofuginone induit la phosphorylation de c-Jun par JNK. La phosphorylation de c-Jun dans les fibroblastes a d'ailleurs été décrite comme étant le mécanisme impliqué dans l'inhibition de la synthèse de collagène de type I par l'halofuginone⁵¹⁵ et une association directe entre cette inhibition et la croissance tumorale a été observée dans le cancer de la vessie, le gliome et le cancer de la prostate^{473,478,516,517}. De plus, certaines études rapportent que c-Jun inhibe l'expression des gènes du collagène contrôlés par Smad3 ainsi que l'activité de liaison à l'ADN de ce dernier⁵¹⁸ l'impliquant ainsi via la voie des Smads dans les activités anti-tumorales et pro-apoptotiques de l'halofuginone.

Des travaux démontrent également que l'halofuginone est capable d'induire la phosphorylation de p38 et JNKs impliquant ainsi les voies des MAPK dans la régulation de l'apoptose^{484,519}. L'halofuginone semble donc capable d'induire l'apoptose aussi bien par la voie extrinsèque qu'intrinsèque et implique de nombreuses voies de signalisation en induisant par exemple c-Jun, JNK, p38-MAPK et p53 ou en inactivant ERK1/2 et MEK1⁴⁸⁴.

De manière intéressante, l'article de Leiba et al. montre que l'halofuginone affecte la viabilité des cellules de myélome multiple sans avoir d'effet sur les cellules saines⁴⁸⁴. Ces résultats vont dans le même sens que certains de nos résultats préliminaires non publiés soulignant le fait que l'halofuginone n'affecte pas la viabilité des CSM humaines et des monocytes CD14 positifs en culture à des doses similaires à celles utilisées sur les cellules d'ostéosarcome. Ces données semblent importantes dans le contexte d'une éventuelle utilisation de l'halofuginone en oncologie en permettant par exemple de limiter les effets secondaires liés à ce traitement.

2. Microenvironnement tumoral et remodelage osseux

Comme énoncé ci-dessus, après avoir observé les effets de nos trois stratégies sur la croissance tumorale, nous nous sommes ensuite intéressés à leurs effets sur la prolifération cellulaire et l'apoptose *in vitro* pour tenter d'expliquer nos résultats *in vivo*. Dans le cadre de l'importance du cercle vicieux dans l'ostéosarcome mais aussi pour tenter d'expliquer les effets indirects de certaines de nos stratégies sur la progression tumorale *in vivo*, nous nous sommes intéressés dans un second temps à leurs effets sur le microenvironnement tumoral et plus spécifiquement sur le remodelage osseux lié à la progression tumorale. Dans ces travaux, nous démontrons que la surexpression de Smad7 et l'halofuginone exercent des effets comparables sur le remodelage osseux (Tableau 7). En effet, ces deux stratégies induisent l'inhibition de l'ostéolyse associée à la tumeur et augmentent le volume d'os ectopique, venant ainsi bloquer le cercle vicieux qui s'établit entre les cellules tumorales et les cellules osseuses. De plus, si l'on considère les paramètres « physiques et mécaniques » de l'os, on peut imaginer que cette diminution de l'ostéolyse associée à une augmentation de l'ostéoformation permet d'accorder moins de place à la tumeur pour croître, participant ainsi à l'inhibition de la progression tumorale.

2.1. Effets sur l'ostéolyse

Dans ces travaux de thèse, nous observons que les cellules surexprimant Smad7 inhibent l'expression et la libération de différents facteurs pro-ostéolytiques par les cellules tumorales (Figure 43). Dans notre premier article, nous démontrons d'ailleurs que certains de ces facteurs impliqués dans l'ostéolyse sont induits en présence de TGF- β . La surexpression de Smad7 permet en effet d'inhiber la capacité du TGF- β à stimuler l'expression de RANKL. Ce résultat *in vitro* s'accompagne d'une inhibition de l'expression de RANKL dans les biopsies de tumeurs de nos souris surexprimant Smad7. L'immunohistochimie nous a également permis de mettre en évidence une inhibition de la libération de RANKL par les cellules tumorales surexprimant Smad7. De manière intéressante, nous avons également montré que la surexpression de Smad7 inhibe la capacité du TGF- β à induire l'expression de l'IL-11 et de l'OPN et diminue l'expression de ces facteurs ostéolytiques dans les biopsies de tumeurs de nos souris. Ces résultats s'accompagnent d'une réduction du nombre de cellules positives pour la coloration TRAP à l'interface tumeur-os et au niveau de la plaque de croissance. La modification de la capacité des cellules tumorales à libérer ces facteurs stimulant l'activité ostéoclastique permet donc de diminuer la dégradation osseuse et ainsi de maintenir des volumes osseux proches de ceux d'un os sain. En effet, nous démontrons que la surexpression de Smad7 diminue l'ostéolyse de l'os trabéculaire dont le volume osseux reste proche de celui d'une patte saine contrairement à celui des souris injectées avec des cellules contrôles. L'inhibition de l'ostéolyse et plus particulièrement de RANKL semble primordiale dans le contexte de l'ostéosarcome pour lequel certaines stratégies thérapeutiques actuelles s'attachent à bloquer l'activité ostéoclastique, comme les bisphosphonates par exemple⁵²⁰.

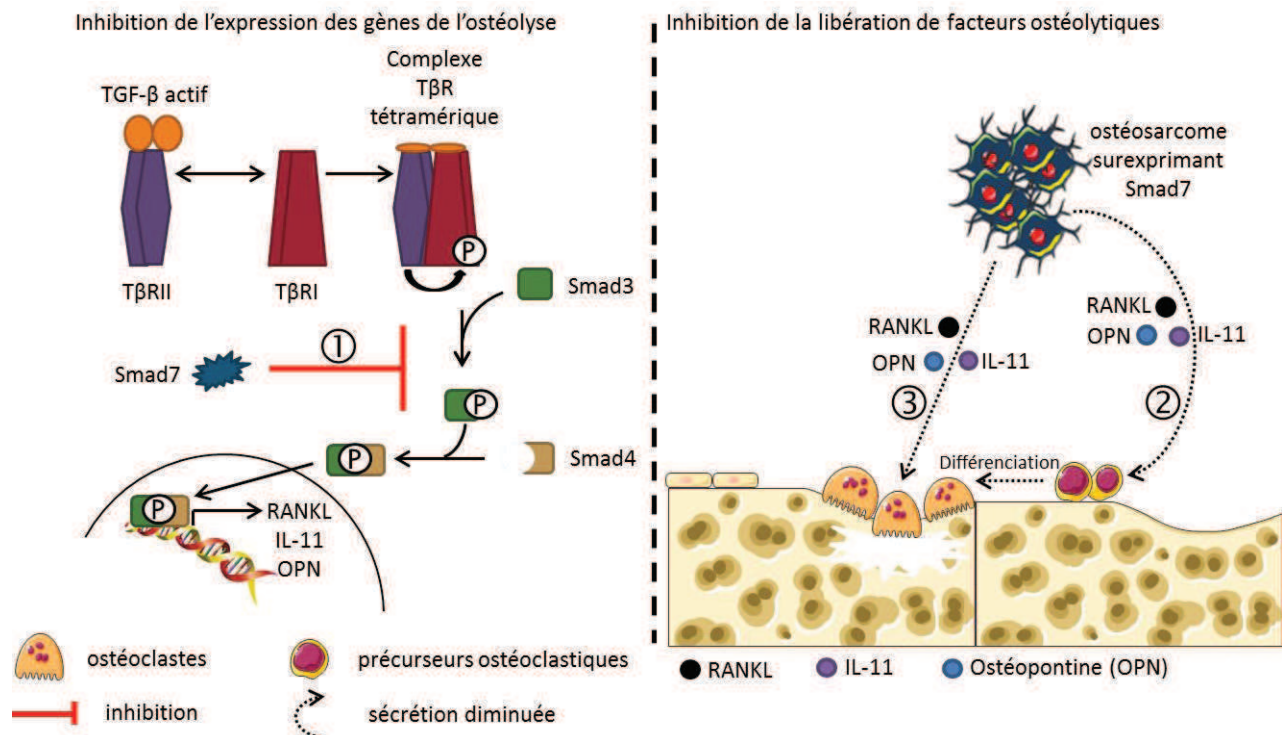


Figure 43 : Inhibition de l'expression et de la libération de facteurs ostéolytiques par les cellules d'ostéosarcome surexprimant Smad7

Les cellules surexprimant Smad7 inhibent la capacité du TGF- β à induire l'expression des gènes de l'ostéolyse ①. Elles libèrent également moins de facteurs stimulant la différenciation ② et l'activité ostéoclastique ③.

L'halofuginone (et le SD-208 malgré son absence d'effet sur le volume osseux de la patte portant la tumeur) permet également d'inhiber l'expression de RANKL dans les biopsies de tumeurs, renforçant l'idée d'une implication du TGF- β via les Smads dans ce processus. L'action de nos stratégies sur le cercle vicieux permet d'inhiber l'ostéolyse et ainsi l'augmentation de la libération de facteurs pro-prolifératifs contenus dans la MEC qui participent à la croissance tumorale. Ces résultats semblent très encourageants et ouvrent des perspectives thérapeutiques intéressantes quant à l'inhibition de la croissance tumorale via une action sur le microenvironnement osseux. De nombreux travaux soulignent également les effets du TGF- β dans le cercle vicieux qui s'établit entre les cellules tumorales et les cellules osseuses, plus connus dans le contexte des métastases osseuses⁵⁰⁵. Ces données soulignent le rôle important joué par l'ostéolyse dans la croissance tumorale et présentent le TGF- β comme une cible de choix pour interrompre ce cercle vicieux en grande partie responsable de la progression de la pathologie.

En dehors des effets TGF- β -dépendant sur l'ostéolyse, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'halofuginone, de par ses effets pro-apoptotiques, diminue le nombre de cellules viables et donc proportionnellement la quantité de facteurs ostéolytiques libérés.

Dans notre étude, l'halofuginone ne semble pas affecter le remodelage osseux en absence de tumeur. Ces résultats sont en faveur d'effets indirects de l'halofuginone via la tumeur sur son environnement tumoral osseux même si des effets directs ne peuvent pas être totalement exclus. Etant donnée l'implication de la voie TGF- β /Smads dans l'ostéolyse médiée par RANKL⁵²¹, nous pouvons penser que l'utilisation systémique de l'halofuginone en tant qu'inhibiteur de cette voie de signalisation pourrait affecter directement les cellules osseuses et l'ostéolyse malgré l'absence d'effets directs sur un os sain. Une étude utilisant des souris ayant une perte de fonction partielle pour Smad7 a d'ailleurs montré une diminution des paramètres de volume osseux spécifique ainsi qu'une augmentation du nombre et de la taille des ostéoclastes *in vitro* et *in vivo*⁵²². Cependant, des travaux s'intéressant aux effets de l'halofuginone sur le tissu osseux démontrent que cette molécule n'affecte pas le volume osseux après administration pendant 4 semaines à des souris saines mais protège le tissu osseux de l'ostéoporose dans un modèle de souris ovariectomisées en inhibant l'ostéolyse. Cette équipe prouve plus précisément que l'halofuginone inhibe la résorption médiée par l'IL-17 en affectant sa libération par les lymphocytes TH17. L'halofuginone n'affectant pas la morphologie ni le nombre d'ostéoclastes en culture, ces travaux suggèrent un mécanisme d'action indirect lié à l'action de l'IL-17 elle-même capable d'induire la libération de RANKL par les ostéoblastes⁵²³. Ces résultats semblent aller dans le même sens que ceux de ces travaux de thèse à savoir que i) l'halofuginone n'affecterait pas le remodelage osseux physiologiques, mais ii) affecterait le remodelage osseux pathologique et plus particulièrement l'ostéolyse via des mécanismes d'action indirects sur les cellules osseuses. Cependant dans cette étude menée chez la souris immunocompétente, les effets observés sont en partie liés aux effets de l'IL-17 libérée par les lymphocytes TH17 ; or dans nos modèles de souris nudes et donc athymiques, ces effets ne peuvent être observés. Il serait donc intéressant de tester les effets de l'halofuginone sur le remodelage osseux dans des modèles murins d'ostéosarcome induit chez la souris immunocompétente.

A l'inverse, le SD-208 affecte le remodelage osseux en absence de tumeur en augmentant le volume osseux global mais ses effets semblent inefficaces face à l'ostéolyse tumorale très agressive observée dans nos modèles. Cette absence d'effets sur l'ostéolyse

associée à la tumeur s'accompagne d'une absence d'effets sur la croissance tumorale, soulignant l'implication importante du microenvironnement tumoral dans ce contexte. L'absence d'effets du SD-208 sur le volume osseux global peut s'expliquer par l'agressivité trop importante de nos modèles. Une administration intra-tumorale pourrait être envisagée de manière à augmenter la portée du traitement. L'absence d'effet du SD-208 sur la croissance de la tumeur primitive semble indiquer que les effets observés suite à l'utilisation des stratégies surexprimant Smad7 ou utilisant l'halofuginone ne sont pas uniquement le résultat de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β .

2.2. Effets sur l'ostéof ormation

En plus des effets sur l'inhibition de l'ostéolyse associée à la croissance tumorale, nous nous sommes intéressés aux effets de nos stratégies sur la formation osseuse. L'augmentation du volume d'os ectopique observée dans le cas de la surexpression de Smad7 dans les cellules tumorales semble pouvoir s'expliquer de différentes manières.

Tout d'abord, la surexpression de Smad7 peut être impliquée dans la régulation de la libération de facteurs impliqués dans la différenciation ostéoblastique et/ou dans l'ostéof ormation. A l'inverse, comme nous l'avons démontré précédemment, la surexpression de Smad7 permet de diminuer la libération de facteurs ostéolytiques entraînant une diminution de la différenciation et de l'activité ostéoclastique. Il en résulte donc une protection face à l'ostéolyse, observée largement au niveau de l'os trabéculaire comme mentionnée précédemment, qui peut également se manifester au niveau de l'os ectopique. La formation d'os ectopique caractéristique de l'ostéosarcome serait donc moins dégradée quand on surexprime Smad7 dans les cellules tumorales que dans la condition contrôle, cause du volume d'os ectopique plus important chez les souris surexprimant Smad7 (Figure 44).

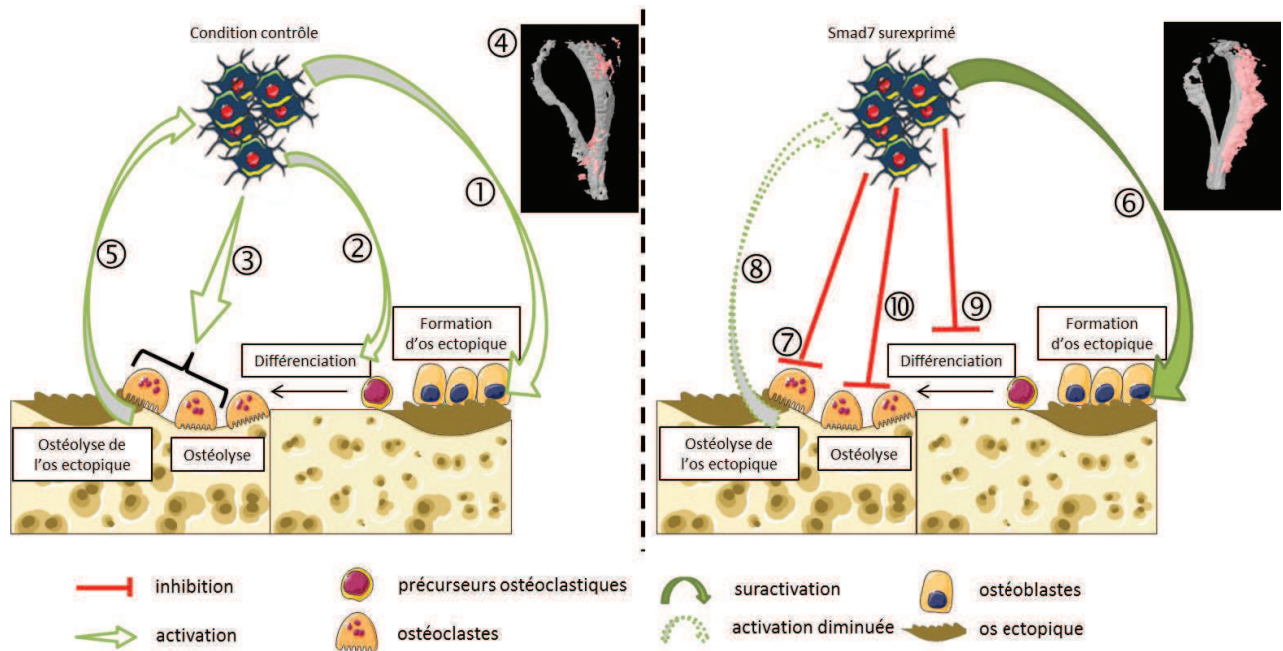


Figure 44 : Effets hypothétiques de la surexpression de Smad7 sur l'augmentation de l'ostéof ormation

En condition contrôlée, les cellules d'ostéosarcome activent la formation d'os ectopique par les ostéoblastes ①, mais aussi la différenciation ② et l'activité ostéoclastique ③. Il en résulte une formation d'os ectopique accompagnée d'ostéolyse ④ participant à l'entretien du cercle vicieux ⑤. Les cellules surexprimant Smad7 augmenteraient la formation d'os ectopique en sur-activant les ostéoblastes ⑥ mais également en inhibant l'ostéolyse de ce tissu osseux néoformé ⑦. Il en résulterait une diminution de la libération de facteurs contenus dans le microenvironnement tumoral osseux et donc de l'emballement du cercle vicieux ⑧. Les cellules surexprimant Smad7 inhibent également la différenciation ⑨ et l'ostéolyse associée à la tumeur ⑩.

D'autre part, les cellules d'ostéosarcome possédant des caractéristiques proches de celles des ostéoblastes et étant capables de synthétiser une matrice ostéoïde, on peut suggérer que la surexpression de Smad7 serait responsable de cette synthèse accrue de matrice par les cellules tumorales elles-mêmes (Figure 45). En effet, certains résultats préliminaires obtenus au cours de cette thèse indiquent que la surexpression de Smad7 dans les cellules d'ostéosarcome serait responsable d'une augmentation de leur degré de différenciation comme le montre la diminution de l'expression des marqueurs de « souchitude » Sox2, Oct4 et NANOG. Cette augmentation du degré de différenciation des tumeurs est souvent corrélée à une agressivité moindre de ces dernières et un meilleur pronostic pour les patients en cancérologie. Nos cellules d'ostéosarcome surexprimant Smad7 se rapprochant alors plus des ostéoblastes que les cellules contrôles, nous avons

testé leur capacité à minéraliser *in vitro*. Grâce à ces expériences préliminaires par coloration au rouge alizarin, nous avons pu observer que les cellules surexprimant Smad7 minéralisent plus que les cellules parentales ou transfectées avec un vecteur vide. Ces résultats demandent bien entendu à être confirmés et il serait intéressant de déterminer grâce à l'histologie si l'os ectopique néoformé *in vivo* résulte de l'activité des ostéoblastes de l'environnement tumoral ou des cellules tumorales elles-mêmes. Ces informations quant à la différenciation des cellules cancéreuses semblent primordiales au regard du pronostic des patients puisqu'en étant moins agressives elles s'avèrent également moins aptes à disséminer vers des sites secondaires.

Il semble également important de rapprocher les effets de Smad7 sur la différenciation des ostéosarcomes à ses effets en tant qu'inhibiteur de la voie du TGF- β . En effet, les effets observés peuvent être dus à des effets propres de Smad7 mais également à ses effets sur la voie des Smads. Le TGF- β est connu pour ses capacités à inhiber les stades tardifs de la différenciation ostéoblastique et la minéralisation. Etant donnée l'origine commune entre les ostéosarcomes et les ostéoblastes, nous pourrions formuler l'hypothèse que l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β dans les ostéosarcomes permettrait la levée d'inhibition sur leur entrée dans des stades de différenciation tardifs. Les cellules d'ostéosarcomes surexprimant Smad7 seraient alors dans un état de différenciation plus avancé et capables de minéraliser.

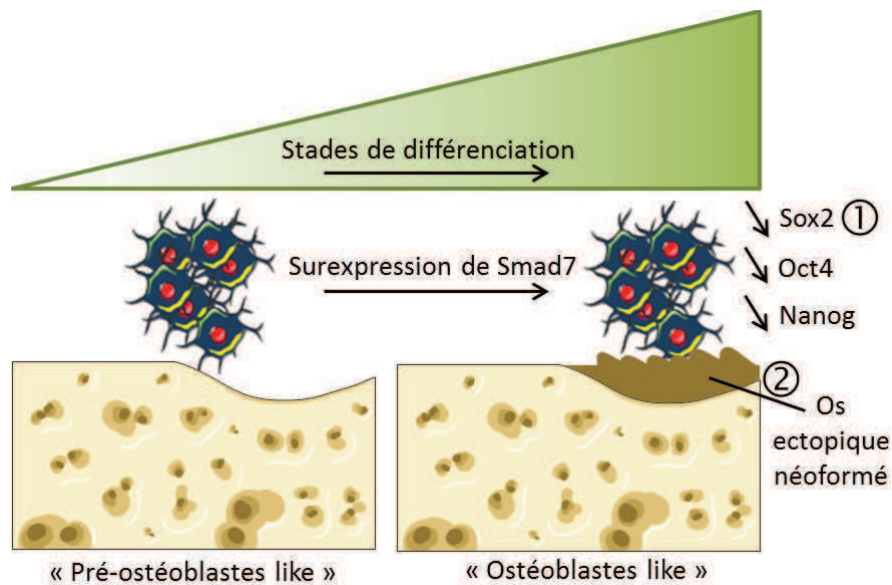


Figure 45 : Effets hypothétiques de la surexpression de Smad7 sur l'état de différenciation des cellules d'ostéosarcome et leur capacité à synthétiser une matrice ostéoïde

La surexpression de Smad7 diminuerait l'expression de marqueurs de « souche » ①. Les cellules d'ostéosarcome seraient alors plus différenciées (facteur de bon pronostic) et synthétiseraient elles-mêmes encore plus de matrice ostéoïde ② (s'approchant alors encore plus des ostéoblastes que les cellules contrôles). Ces effets pourraient être des effets propres de Smad7 ou liés à sa capacité à inhiber la voie de signalisation du TGF- β (qui bloque les stades tardifs de la différenciation ostéoblastique et la minéralisation).

De manière intéressante, une augmentation du volume d'os ectopique est également observée dans le cas d'un traitement à l'halofuginone. Il serait intéressant de savoir si ces effets observés sont dus à l'induction de l'expression de Smad7 dans les cellules tumorales, à l'inhibition de la voie du TGF- β et/ou à des effets propres de la molécule. Outre les effets observés sur les cellules tumorales et dans leurs interactions avec leur microenvironnement, il est primordial de garder à l'esprit que cette stratégie agit potentiellement sur l'ensemble des cellules et composants de l'organisme de par son administration systémique. Les effets observés sont donc non seulement liés aux effets sur la tumeur mais également sur les cellules osseuses. Malgré le fait que l'halofuginone ne semble pas affecter le volume osseux global du tibia sain dans nos conditions, nous ne pouvons exclure des effets directs de cette molécule sur le remodelage osseux.

En tant que stratégie inhibitrice spécifique de la voie de signalisation du TGF- β , l'augmentation du volume osseux observée après traitement systémique au SD-208 est certainement due à son action sur les cellules osseuses. Une fois de plus, il serait intéressant

d'établir si ces effets sont des effets propres de la molécule ou dus à l'inhibition de la voie du TGF- β . En effet comme nous l'avons mentionné, le TGF- β est connu pour inhiber les phases terminales de la différenciation ostéoblastique et la minéralisation. Nous pouvons donc penser que l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β au niveau des ostéoblastes permettrait la différenciation en ostéoblastes matures et la minéralisation de la matrice et expliquerait ainsi en partie l'augmentation du volume osseux. Des résultats préliminaires obtenus au cours de cette thèse nous ont permis d'observer que le SD-208 stimule la différenciation ostéoblastique et la minéralisation *in vitro* en présence ou absence de TGF- β . Ces résultats vont dans le sens des hypothèses précitées et demandent à être confirmés. Une seconde explication à l'augmentation du volume osseux suite à l'inhibition de la voie du TGF- β serait liée à une action de la molécule au niveau des ostéoclastes. Certaines études démontrent en effet que le SB431542, un analogue appartenant à la même famille que le SD-208, est capable d'inhiber la capacité du TGF- β à induire l'ostéoclastogenèse⁵²¹. D'autres travaux s'intéressent également aux effets de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β sur l'architecture osseuse grâce à l'utilisation du SD-208⁵²⁴. Cette étude démontre que le SD-208 en traitement systémique stimule la formation osseuse en augmentant la qualité osseuse et les paramètres de volume osseux et inhibe l'ostéolyse. En effet, cette inhibition spécifique de T β RI au niveau des cellules osseuses par le SD-208 inhibe à la fois le nombre et la différenciation des ostéoclastes tout en augmentant le nombre et la différenciation des ostéoblastes. Ces observations sont en accord avec d'autres travaux sur les effets de l'inhibition partielle de la voie du TGF- β par les Smads chez des souris Smad3 \pm dont les ostéoblastes expriment un dominant négatif de T β RII^{525,526}. Il est intéressant de noter que les effets de l'inhibition de la voie du TGF- β dans les cellules osseuses peuvent également affecter de manière indirecte leurs activités dans le remodelage osseux en modifiant le dialogue entre ces types cellulaires notamment via la régulation des facteurs RANKL et OPG. L'ensemble de ces travaux démontre les effets du SD-208, en tant qu'inhibiteur de la voie de signalisation du TGF- β mais également ses effets propres, à la fois sur les ostéoclastes et sur les ostéoblastes, essentiels dans le contrôle de la quantité et la qualité osseuse.

III. Effets de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β sur le processus métastatique dans l'ostéosarcome

Le rôle pro-métastatique du TGF- β est aujourd'hui bien connu. Certains travaux démontrent d'ailleurs l'efficacité de son inhibition dans des modèles de cancer du sein, adénocarcinome pancréatique, myélome, gliome ou encore mélanome et soulignent ainsi le bénéfice à l'inhiber. Si l'on s'intéresse plus spécifiquement au tissu osseux, la contribution du TGF- β au développement de métastases osseuses est bien documentée. En effet, le TGF- β constitue l'un des acteurs principaux du cercle vicieux s'établissant entre les cellules tumorales et les cellules osseuses. Certains gènes cibles du TGF- β , impliqués dans l'ostéolyse, les phénomènes de migration et d'invasion ou dans l'adressage de métastases à un tissu particulier, ont été identifiés. De plus, il a été montré que la surexpression de ces gènes cibles dans des cellules non métastatiques induisait leur potentiel métastatique à l'os^{352,527}. Ces gènes cibles, tels que l'IL-11 ou PTHrP, stimulent la dégradation osseuse et permettent ainsi la libération de facteurs depuis l'environnement osseux, dont le TGF- β , capables d'exacerber en retour le potentiel tumoral et métastatique des cellules cancéreuses et l'activation de l'ostéolyse. Etant données i) l'existence d'un cercle vicieux faisant intervenir des facteurs similaires dans l'ostéosarcome et ii) l'implication importante du TGF- β dans ce cercle vicieux en tant que facteur sécrété par les cellules tumorales et libéré du microenvironnement osseux, nous nous sommes intéressés au potentiel anti-métastatique de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β dans l'ostéosarcome.

De manière intéressante, nous avons tout d'abord démontré une augmentation de la phosphorylation de Smad3, donc de l'activation de la voie de signalisation du TGF- β par les Smads, dans les biopsies de tumeurs de patients atteints d'ostéosarcome métastatique par rapport aux patients non métastatiques. Comme nous l'avons énoncé dans la première partie de cette discussion, ces résultats semblent souligner les effets pro-métastatiques du TGF- β dans l'ostéosarcome mais également son éventuel intérêt en tant que marqueur pronostic. En nous intéressant aux effets de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β , nous avons démontré que la surexpression de Smad7 dans les cellules d'ostéosarcome, le traitement par le SD-208 ainsi que le traitement à l'halofuginone inhibent la dissémination métastatique. En effet, ces trois stratégies réduisent l'incidence de souris métastatiques ainsi que le nombre de métastases lorsque ces dernières sont présentes. Ces résultats sont en

accord avec d'autres données de la littérature utilisant les mêmes stratégies mais dans d'autres modèles cancéreux. En effet, la surexpression de Smad7 et l'utilisation du SD-208 et de l'halofuginone dans un modèle de métastases osseuses de mélanome réduisent le développement métastatique ainsi que les lésions ostéolytiques engendrées^{417,434,480}. Ces trois stratégies montrent également leur aptitude à inhiber la capacité du TGF- β à induire les gènes pro-métastatiques tels CTGF, CXCR4 et IL-11 comme le démontrent nos travaux dans le cadre de l'ostéosarcome. Ces résultats semblent très importants dans le contexte de l'ostéosarcome puisqu'ils permettraient, en plus d'inhiber le développement métastatique, de réduire l'ostéolyse associée à la tumeur et ainsi l'emballement du cercle vicieux. L'ostéosarcome pouvant également métastaser au niveau osseux, il serait intéressant de tester ces stratégies dans des modèles d'ostéosarcome métastatique à l'os. Enfin, les effets similaires de ces trois stratégies sur le développement métastatique semblent indiquer le rôle primordial de la voie de signalisation du TGF- β par les Smads dans ce processus. Le TGF- β est en effet hautement impliqué dans toutes les étapes du processus métastatique à savoir l'EMT, l'angiogenèse, la migration, l'invasion et la colonisation des niches métastatiques.

Le rôle du TGF- β , et notamment de sa voie de signalisation par les Smads, en tant qu'inducteur de l'EMT est désormais bien connu. Ce dernier intervient à l'aide de différents facteurs dans la perte d'expression de marqueurs épithéliaux, la perte d'adhésion cellule-cellule et l'augmentation de marqueurs mésenchymateux. L'inhibition de Smad3/4 et la surexpression de Smad7 abolissent l'induction de l'EMT. L'ostéosarcome étant une tumeur d'origine mésenchymateuse, il semble intéressant de mentionner que ces cellules tumorales ont déjà une étape de moins à franchir dans la progression métastatique par rapport aux tumeurs d'origine épithéliale. Cependant, certaines études suggèrent l'existence d'un processus affectant les cellules mésenchymateuses ressemblant à l'EMT dit « EMT-like ». Ce processus se caractériserait par un changement de morphologie des cellules mésenchymateuses avec une diminution du contact cellule-cellule et l'acquisition d'une forme plus allongée, une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'EMT à savoir ZO-1 et une augmentation de l'expression de la fibronectine et la vimentine. De manière intéressante, des travaux démontrent l'implication du TGF- β , notamment par la voie des Smads, dans ce processus³⁹¹. En effet, cette étude montre que l'ICSBP (« Interferon Consensus Sequence-Binding Protein ») stimule l'expression de T β RI et T β RII et augmente l'activation des voies du TGF- β , particulièrement la voie des Smads, au cours de l'induction de « l'EMT-like » dans des cellules d'ostéosarcome. Cette induction de « l'EMT-like » via la voie

du TGF- β s'accompagne de la stimulation de l'expression de facteurs impliqués dans l'EMT, en particulier Snail, responsables de l'inhibition de ZO-1 et de l'induction de la fibronectine et la vimentine. Ces changements cellulaires augmentent les capacités de migration et d'invasion des cellules d'ostéosarcome au cours de ce processus « d'EMT-like » et sont en partie réversibles par l'utilisation du SB431542, inhibiteur chimique de T β RI analogue du SD-208. L'ensemble de ces résultats soulignent l'importance de la voie de signalisation du TGF- β dans « l'EMT-like » et le bénéfice à l'inhiber dans l'ostéosarcome.

Nos trois stratégies sont également capables d'inhiber l'angiogenèse, processus important dans le développement métastatique mais également dans la croissance tumorale. De manière intéressante, il existe une corrélation positive entre la densité de la microvascularisation tumorale et la probabilité de développer des métastases⁵²⁸. Le TGF- β est connu pour stimuler ce processus notamment via l'induction de VEGF et l'ANGPTL4. Nos trois stratégies inhibent l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse ainsi que le nombre et la taille des vaisseaux sanguins mis en évidence par immunohistochimie sur nos échantillons murins. D'autres études en accord avec ces résultats soulignent également les effets anti-angiogéniques de l'halofuginone et du SD-208.

De plus nous nous sommes intéressés aux effets de l'inhibition de la voie du TGF- β par nos trois stratégies sur l'expression et l'activation des MMPs. En effet, les MMPs jouent un rôle primordial en cancérologie et particulièrement dans le développement métastatique. En tant que protéinases impliquées dans le remodelage de la MEC, elles représentent les médiateurs principaux des altérations du microenvironnement observées au cours de la progression tumorale⁵²⁹. Les MMPs sont également capables de promouvoir les phénomènes de migration et d'invasion. Leur activité protéolytique est en effet requise par les cellules cancéreuses de manière à dégrader les barrières physiques durant leur expansion, l'intravasation au niveau des vaisseaux sanguins puis l'extravasation et l'invasion d'un tissu distant⁵³⁰. De manière intéressante, les MMPs sont capables d'activer le TGF- β , lui-même capable d'induire leur expression. Ces mécanismes sont particulièrement importants dans l'EMT et le processus métastatique. Nos travaux démontrent que la surexpression de Smad7, l'utilisation du SD-208 ou de l'halofuginone inhibent la capacité du TGF- β à induire l'expression et l'activation de MMP2. De même, la surexpression de Smad7 et le SD-208 inhibent l'expression de MMP2 dans les biopsies de tumeurs. Cette inhibition s'accompagne d'une diminution de la capacité du TGF- β à stimuler la migration et l'invasion cellulaires. Des

résultats similaires démontrent que la surexpression de Smad7 dans des cellules de mélanome inhibe la production des MMP-2 et -9 par les cellules tumorales, s'accompagnant également d'une réduction de l'invasion⁴³⁶. De même, l'halofuginone inhibe les capacités de migration des cellules de cancer du sein en réduisant l'expression de MMP9 ou encore de métastases de carcinome de la vessie^{499,516}. Malgré le fait que nos stratégies diminuent la capacité du TGF- β à stimuler l'expression et l'activité de MMP2, nous ne pouvons exclure que ces effets soient des effets propres des molécules utilisées ou encore des effets liés à l'inhibition d'autres voies de signalisation.

Le développement métastatique est bien souvent considéré comme un événement survenant à un stade tardif de la progression tumorale. Une des explications possible semble résider dans les méthodes de détection actuelles qui nous permettent certes de déceler les métastases mais malheureusement à un stade déjà avancé. Ces méthodes ne permettent entre autre pas de détecter les micro-métastases ou les cellules tumorales circulantes. Un intérêt particulier est aujourd'hui porté sur d'éventuels marqueurs prédictifs du potentiel métastatique des tumeurs. Certaines études apportent aujourd'hui des modèles illustrant un développement métastatique précoce en insistant notamment sur l'existence de facteurs sécrétés par la tumeur primitive et permettant la création de niches pré-métastatiques au sein d'organes cibles. Ces niches pré-métastatiques seraient élaborées très précocement et constitueraient un environnement attractif et favorable pour le développement des métastases³³⁵. Ce concept de niche pré-métastatique, faisant intervenir de nombreux facteurs dont le TGF- β ainsi que le recrutement, entre autre, de cellules souches mésenchymateuses, semblerait intéressant dans le contexte de l'ostéosarcome (Figure 46). Certaines données pourraient s'inscrire en faveur de cette théorie qui reste cependant encore trop peu documentée. Le TGF- β sécrété par la tumeur primitive joue un rôle très important dans l'établissement des niches pré-métastatiques notamment en participant au recrutement de progéniteurs hématopoïétiques dérivés de la moelle osseuse ou encore de CSM et en créant ainsi un environnement à l'abri du système immunitaire. Dans le contexte de l'ostéosarcome, ce processus pourrait certainement être favorisé par la grande quantité de TGF- β sécrété par les cellules tumorales et contenue dans l'environnement osseux ainsi que par la proximité des cellules dérivées de la moelle osseuse. Dans certains modèles de poumons pré-métastatiques, cette sécrétion de TGF- β par les cellules tumorales induit l'expression de protéines notamment de la famille S100 (intervenant dans de nombreux processus tels l'invasion et la réponse immune), spécifiquement dans le parenchyme

pulmonaire. De manière intéressante, des travaux démontrent l'implication de S100A4 dans le développement métastatique de l'ostéosarcome via la régulation de l'OPN et des MMPs. S100A4 est connu comme un facteur dont l'expression est corrélée aux capacités invasives et métastatiques des cellules cancéreuses et semble impliqué dans la naissance des niches pré-métastatiques⁵³¹. L'augmentation de son expression est cliniquement corrélée à un mauvais pronostic pour les patients dans certains cancers et a été proposé comme un marqueur prédictif de métastases et de survie^{532,533}. Ces travaux démontrent l'induction de l'OPN par S100A4 et son implication dans la régulation de l'activation des MMPs notamment des MMP-2 et -13, stimulant ainsi le potentiel métastatique des ostéosarcomes via le remodelage de la MEC⁵³⁴. L'OPN est également aujourd'hui décrite comme étant sécrétée par la tumeur primitive pour stimuler la croissance de métastases à distance⁵³⁵. De manière intéressante, nous démontrons dans nos travaux que la surexpression de Smad7 inhibe la capacité du TGF- β à stimuler l'expression d'OPN et inhibe son expression dans les biopsies de tumeurs de souris. De même, nous avons observé que la surexpression de Smad7, le SD-208 et l'halofuginone inhibent l'expression et l'activation de la MMP-2. Les MMPs sont hautement impliquées dans le processus métastatique, aussi bien au stade de niche pré-métastatique qu'à des stades plus tardifs. Certains travaux s'intéressent d'ailleurs à l'association entre les expressions de S100A4 et des membres de la famille des MMPs et une étude rapporte plus particulièrement l'interaction entre la voie TGF- β /Smad3 et S100A4 au cours du processus invasif²⁴². En effet, ces travaux montrent que l'interaction entre S100A4 et Smad3 potentialise les effets pro-invasifs de la voie du TGF- β notamment en augmentant sa capacité à induire l'expression et l'activation de MMP9. L'ensemble de ces travaux fournit des arguments intéressants en faveur de l'existence d'un processus métastatique régulé très précocement dans l'ostéosarcome notamment via la formation de niches pré-métastatiques. Ce phénomène semble particulièrement favorisé dans le cas de l'ostéosarcome grâce notamment à son environnement mettant à proximité tous les facteurs et types cellulaires nécessaires. Ces études suggèrent entre autre l'implication du TGF- β dans ce processus ainsi que des MMPs, de l'OPN et S100A4. Il serait donc intéressant de mieux comprendre ce processus métastatique dans l'ostéosarcome et d'en déterminer les acteurs précoces de manière à agir au moment de la genèse et avant même la colonisation des niches pré-métastatiques.

L'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β dans l'ostéosarcome semble donc ouvrir des perspectives thérapeutiques très intéressantes, notamment pour les patients métastatiques grâce à l'inhibition des différentes étapes impliquées dans ce processus.

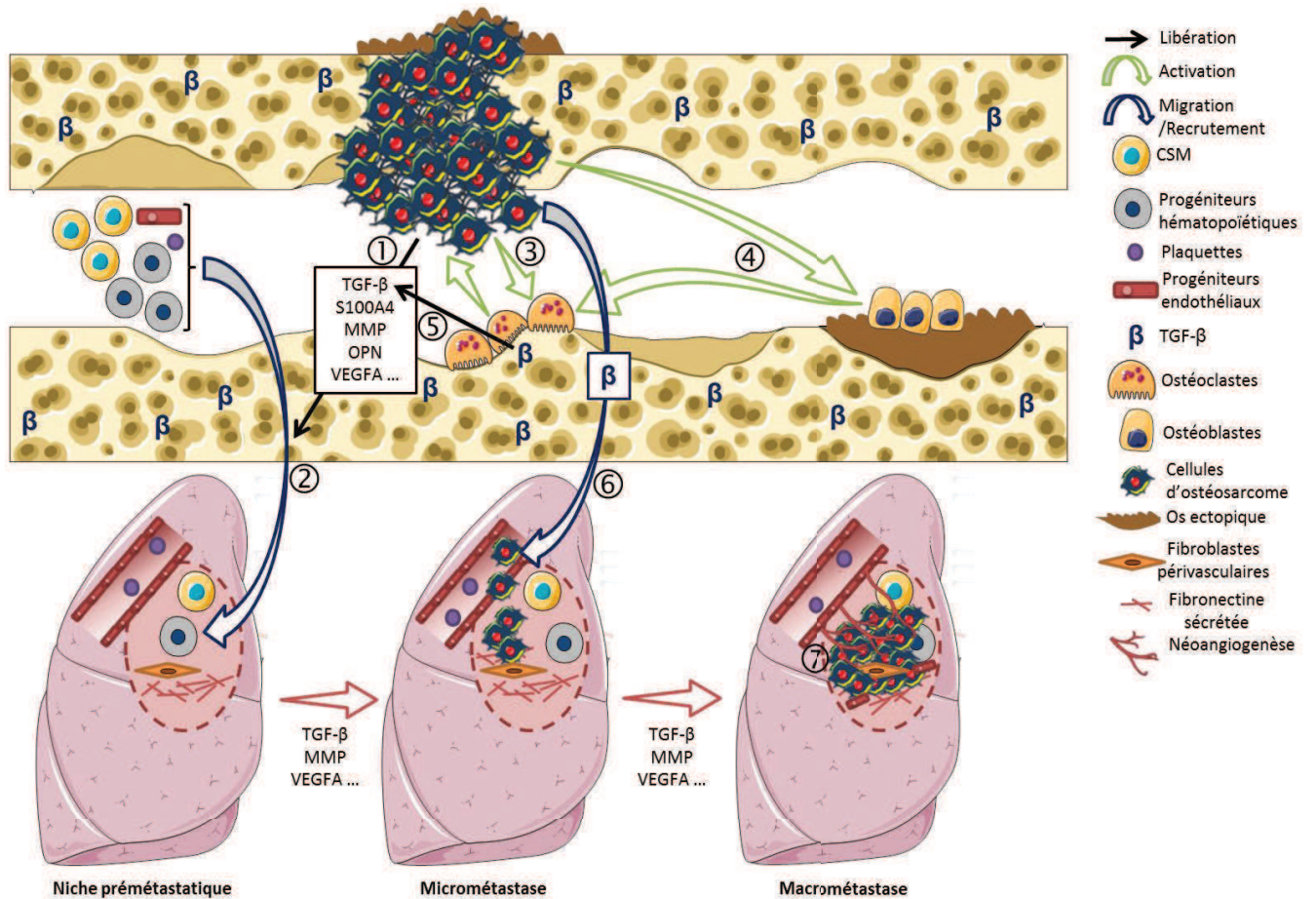


Figure 46 : Modèle hypothétique de l'implication du TGF- β dans la genèse de niches pré-métastatiques dans l'ostéosarcome

Les cellules tumorales sécrèteraient différents facteurs (TGF- β , S100A4, MMP, OPN, VEGFA...) ① permettant la création de niches pré-métastatiques en stimulant notamment le recrutement de CSM et de progéniteurs hématopoïétiques et endothéliaux présents dans la moelle osseuse ②. La proximité de ces différents facteurs et types cellulaires serait favorable à la genèse des niches pré-métastatiques. En effet, les cellules d'ostéosarcome stimulent directement ③ ou indirectement via les ostéoblastes ④, l'ostéolyse responsable d'une libération accrue de TGF- β ⑤ participant ainsi à l'emballage de ce processus. Le TGF- β joue également un rôle essentiel dans la migration des cellules tumorales vers ces niches pré-métastatiques ⑥ et la néo-angiogenèse ⑦.

IV. Perspectives

Au vu des effets bénéfiques de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β dans l'ostéosarcome, les perspectives de ces travaux de thèse sont de tester de nouvelles approches inhibitrices, de manière à mieux comprendre et préciser le rôle de ce facteur dans cette pathologie. De plus, étant données l'augmentation des TGF- β s dans les sérums de patients et l'augmentation de l'activation de Smad3 dans les biopsies de patients métastatiques par rapport aux patients non métastatiques, nous souhaiterions confirmer le rôle joué par le TGF- β et ses voies de signalisation en tant que marqueur pronostic du développement métastatique. En effet, le TGF- β semble jouer un rôle primordial dès les phases précoces du développement métastatique notamment dans l'élaboration de niches pré-métastatiques, soulevant la possibilité de trouver des marqueurs précoces à ce processus. Pour ce projet, notre intérêt se portera entre autre sur USP15, une déubiquitine capable de stabiliser le récepteur T β RI à la membrane en empêchant sa dégradation par le protéasome. De manière intéressante, des travaux montrent l'implication d'USP15 en tant que régulateur clé de la voie du TGF- β ainsi que son implication dans l'oncogenèse du glioblastome⁵³⁶. En effet, ces travaux rapportent qu'une surexpression aberrante d'USP15 est responsable d'une hyperactivation de la voie du TGF- β . Des données cliniques indiquent que cette surexpression aberrante d'USP15 chez les patients atteints de glioblastome et de cancer du sein leur confère un mauvais pronostic. Ces travaux établissent une corrélation significative entre la forme phosphorylée de Smad2, T β RI et USP15. L'ensemble de ces données nous conforte dans l'idée de tester USP15 en tant que marqueur pronostic dans l'ostéosarcome ainsi qu'en tant que cible thérapeutique puisque l'inhibition d'USP15 inhibe la voie de signalisation du TGF- β et donc potentiellement ses effets pro-cancéreux. De plus, les déubiquitines sont considérées comme des cibles faciles grâce au ciblage de leur activité enzymatique par des molécules inhibitrices. Des inhibiteurs des déubiquitines sont d'ailleurs disponibles comme PR-619, cependant non spécifique d'USP15. Nos travaux s'intéresseront donc à l'expression d'USP15, de T β RI et de la forme phosphorylée de Smad3 chez les patients atteints d'ostéosarcome métastatique ou non. Puis nous testerons le potentiel anti-tumoral de l'inhibition d'USP15 dans nos modèles d'ostéosarcome, de la même manière que nous l'avons fait pour les trois stratégies présentées dans cette thèse.

Etant donné les effets du TGF- β observés dans l'ostéosarcome, nous nous interrogeons également sur son implication dans la pathogenèse d'autres tumeurs osseuses

primitives. Ainsi, un autre projet aura pour objectif de mieux comprendre les effets du TGF- β dans le sarcome d'Ewing. En effet, des résultats préliminaires que nous avons obtenus indiquent une absence de réponse au TGF- β des cellules de sarcome d'Ewing due à une inhibition majeure de l'expression de T β RII. Cette inhibition de T β RII est due à sa régulation par EWS-Fli1. EWS-Fli1 est un facteur de transcription aberrant résultant d'une translocation chromosomique observée dans plus de 80% des sarcomes d'Ewing. EWS-Fli1 apparaît comme étant capable de réguler l'expression de différents gènes cibles impliqués dans la tumorigenèse. De manière surprenante, EWS-Fli1 inhibe l'expression de T β RII, empêchant ainsi la réponse des cellules au TGF- β qui semble pourtant pro-cancéreux et pro-métastatique dans l'ostéosarcome. Nous souhaiterions donc mieux comprendre et comparer les effets du TGF- β dans le sarcome d'Ewing et l'ostéosarcome. Une des hypothèses envisagées pour expliquer cette différence entre ces deux types de tumeurs osseuses provient de travaux récents portant sur EWS-Fli1 qui suggèrent une expression variable et séquentielle d'EWS-Fli1 en fonction du stade dans lequel se trouve la tumeur (résultats non publiés). En effet, EWS-Fli1 semble exprimé au cours de la croissance tumorale primaire et serait réprimé au cours de la dissémination métastatique. Une des hypothèses envisagées serait donc que l'inhibition d'EWS-Fli1 au cours du développement métastatique permettrait de lever l'inhibition et donc d'augmenter l'expression de T β RII qui pourrait alors restaurer la réponse des cellules tumorales au TGF- β et stimuler ainsi le processus métastatique. Pour répondre à ces questions, nous souhaitons analyser les effets de la ré-expression de T β RII dans des cellules de sarcome d'Ewing. Nous souhaitons également utiliser une lignée cellulaire de sarcome d'Ewing exprimant un shRNA (« small hairpin RNA ») inductible ciblant EWS-Fli1. Nous nous intéresserons aux effets de la ré-expression de T β RII et à sa régulation par EWS-Fli1 *in vitro* et *in vivo* sur la réponse au TGF- β , sur les phénomènes de migration et d'invasion, sur la croissance tumorale, sur le développement métastatique et l'angiogenèse.

Conclusion Générale

En conclusion, ces travaux de thèse montrent une augmentation des taux sériques de TGF- β 1 et - β 2 dans les sérums de patients atteints d'ostéosarcome par rapport à des individus sains, s'accompagnant d'une augmentation de l'activation de Smad3 dans les biopsies de tumeurs des patients métastatiques par rapport aux patients non métastatiques. Ces résultats suggèrent l'intérêt d'utiliser le TGF- β et/ou des acteurs de sa voie de signalisation pour le développement de biomarqueurs pronostic. Ces travaux soulignent également le rôle pro-tumoral du TGF- β , notamment par la voie des Smads, dans l'ostéosarcome.

Ces travaux de thèse ont également permis de démontrer l'intérêt de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β dans l'ostéosarcome. En effet, la surexpression du Smad-inhibiteur naturel Smad7 a permis d'inhiber significativement la croissance de la tumeur primitive en jouant essentiellement sur le remodelage osseux associé à la croissance tumorale. La surexpression de Smad7 inhibe effectivement l'ostéolyse associée à la tumeur en inhibant l'expression de facteurs ostéolytiques tels RANKL, bloquant ainsi le cercle vicieux qui s'établit entre les cellules tumorales et les cellules osseuses. Les effets de cette stratégie sur la croissance tumorale semblent donc être principalement indirects et liés aux effets sur le microenvironnement tumoral osseux. De plus, l'utilisation de l'halofuginone, un alcaloïde connu entre autre pour ses propriétés inhibitrices de la voie de signalisation du TGF- β , réduit également la croissance de la tumeur primitive. Les effets de cette molécule semblent être principalement dus à ses propriétés pro-apoptotiques sur l'ostéosarcome. L'halofuginone a également démontré sa capacité à affecter l'ostéolyse associée à la tumeur, bloquant ainsi le cercle vicieux établi dans cette pathologie. De manière très intéressante, cette molécule, déjà testée dans certains essais cliniques dans d'autres pathologies, semble agir à la fois sur les cellules tumorales et leur microenvironnement. L'action de l'halofuginone à différents endroits du cercle vicieux est primordiale et soulève l'intérêt de son utilisation dans l'ostéosarcome. Enfin le SD-208, un inhibiteur chimique de T β RI, n'affecte pas la croissance tumorale malgré sa capacité à affecter le remodelage osseux physiologique.

Ces trois stratégies ont également permis d'inhiber le processus métastatique et suggèrent que ces effets sont principalement dus à leur capacité à inhiber la voie de signalisation du TGF- β . L'ensemble de ces résultats souligne le rôle pro-tumoral du TGF- β dans l'ostéosarcome en tant que pivot de par son implication centrale dans tous les stades de la pathologie (Figure 47) et souligne donc l'intérêt d'inhiber cette voie de signalisation.

Les stratégies inhibitrices de la voie du TGF- β pourraient donc conduire vers des perspectives thérapeutiques intéressantes pour les patients atteints d'ostéosarcome, pour qui le pronostic demeure encore mauvais notamment dans les cas métastatiques. L'halofuginone en particulier, pourrait constituer une nouvelle stratégie au vu de ses effets anti-tumoraux et anti-métastatiques, ainsi que ses effets connus en tant que potentialisateur des agents de chimiothérapie. Déjà utilisée dans certains essais cliniques dans d'autres pathologies, cette molécule semble donc être le meilleur candidat pour ouvrir des perspectives thérapeutiques intéressantes dans l'ostéosarcome.

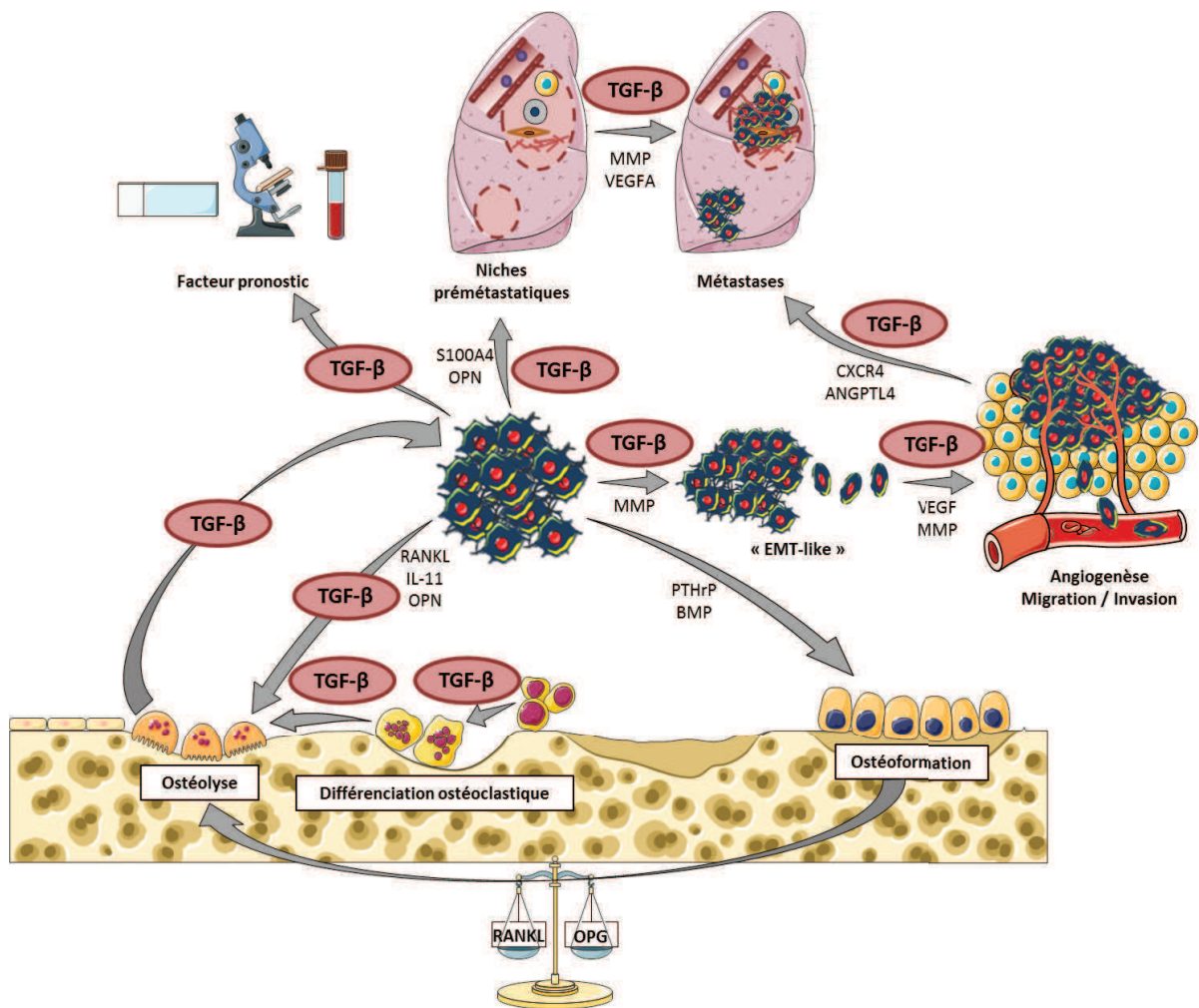


Figure 47 : Rôle central du TGF- β dans le développement tumoral et métastatique de l'ostéosarcome

Présentation du TGF- β comme acteur principal dans le cercle vicieux établi entre l'ostéosarcome et le microenvironnement tumoral osseux, participant ainsi aux phases précoces et tardives du développement tumoral et métastatique.

Bibliographie

1. Taichman, R. S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* **105**, 2631–2639 (2005).
2. Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, S131–S139 (2008).
3. Mosekilde, L., Ebbesen, E. N., Tornvig, L. & Thomsen, J. S. Trabecular bone structure and strength - remodelling and repair. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **1**, 25–30 (2000).
4. Roach, H. I. Why Does Bone Matrix Contain Non-Collagenous Proteins? The Possible Roles of Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin and Bone Sialoprotein in Bone Mineralisation and Resorption. *Cell Biol. Int.* **18**, 617–628 (1994).
5. Glimcher, M. J. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instr. Course Lect.* **36**, 49–69 (1987).
6. Strauer, B. E. & Kornowski, R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation* **107**, 929–934 (2003).
7. Owen, M. & Friedenstein, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* **136**, 42–60 (1988).
8. Williams, J. T., Southerland, S. S., Souza, J., Calcutt, A. F. & Cartledge, R. G. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am. Surg.* **65**, 22–26 (1999).
9. Zuk, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**, 211–228 (2001).
10. De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P. & Luyten, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* **44**, 1928–1942 (2001).
11. Erices, A., Conget, P. & Minguell, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* **109**, 235–242 (2000).
12. Kuznetsov, S. A. *et al.* Circulating skeletal stem cells. *J. Cell Biol.* **153**, 1133–1140 (2001).
13. Caplan, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* **213**, 341–347 (2007).
14. Manolagas, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* **21**, 115–137 (2000).
15. Marie, P. J. The molecular genetics of bone formation: implications for therapeutic interventions in bone disorders. *Am. J. Pharmacogenomics Genomics-Relat. Res. Drug Dev. Clin. Pract.* **1**, 175–187 (2001).
16. Katagiri, T. & Takahashi, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* **8**, 147–159 (2002).
17. Marie, P. J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 98–105 (2008).
18. Baron, R. & Kneissel, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat. Med.* **19**, 179–192 (2013).
19. Brunner, M. *et al.* Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *J. Cell Biol.* **194**, 307–322 (2011).

20. Brunner, M., Jurdic, P., Tuckerman, J. P., Block, M. R. & Bouvard, D. New insights into adhesion signaling in bone formation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **305**, 1–68 (2013).
21. Robling, A. G., Castillo, A. B. & Turner, C. H. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **8**, 455–498 (2006).
22. Mackie, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 1301–1305 (2003).
23. Rodan, G. A. Introduction to bone biology. *Bone* **13 Suppl 1**, S3–6 (1992).
24. Chow, J. W., Wilson, A. J., Chambers, T. J. & Fox, S. W. Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **13**, 1760–1767 (1998).
25. Chambers, T. J. & Fuller, K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J. Cell Sci.* **76**, 155–165 (1985).
26. Noble, B. S. The osteocyte lineage. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 106–111 (2008).
27. Rochefort, G. Y., Pallu, S. & Benhamou, C. L. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* **21**, 1457–1469 (2010).
28. Franz-Odenaal, T. A., Hall, B. K. & Witten, P. E. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **235**, 176–190 (2006).
29. Palumbo, C. A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res.* **246**, 125–131 (1986).
30. Tanaka-Kamioka, K., Kamioka, H., Ris, H. & Lim, S. S. Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **13**, 1555–1568 (1998).
31. Civitelli, R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 188–192 (2008).
32. Bonewald, L. F. & Johnson, M. L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* **42**, 606–615 (2008).
33. Van Bezooijen, R. L., ten Dijke, P., Papapoulos, S. E. & Löwik, C. W. G. M. SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 319–327 (2005).
34. Gu, G., Mulari, M., Peng, Z., Hentunen, T. A. & Väänänen, H. K. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 1095–1101 (2005).
35. Massey, H. M. & Flanagan, A. M. Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. *Br. J. Haematol.* **106**, 167–170 (1999).
36. Nicholson, G. C. *et al.* Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 **99**, 133–140 (2000).
37. Theoleyre, S. *et al.* The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 457–475 (2004).

38. Wittrant, Y. et al. Regulation of osteoclast protease expression by RANKL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 774–778 (2003).
39. Rousselle, A.-V. & Heymann, D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* **30**, 533–540 (2002).
40. Freyria, A.-M., Courtes, S. & Mallein-Gerin, F. [Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2]. *Pathol. Biol. (Paris)* **56**, 326–333 (2008).
41. Sims, N. A. & Vrahnas, C. Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **561**, 22–28 (2014).
42. Lacey, D. L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165–176 (1998).
43. Yasuda, H. et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3597–3602 (1998).
44. Kogawa, M. et al. Sclerostin regulates release of bone mineral by osteocytes by induction of carbonic anhydrase 2. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **28**, 2436–2448 (2013).
45. Capulli, M., Paone, R. & Rucci, N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.* **561**, 3–12 (2014).
46. Hofbauer, L. C. & Heufelder, A. E. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 2355–2363 (2000).
47. Horwood, N. J., Elliott, J., Martin, T. J. & Gillespie, M. T. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* **139**, 4743–4746 (1998).
48. Sims, N. A. & Gooi, J. H. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 444–451 (2008).
49. Lerner, U. H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J. Dent. Res.* **85**, 584–595 (2006).
50. Wu, X., McKenna, M. A., Feng, X., Nagy, T. R. & McDonald, J. M. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology* **144**, 5545–5555 (2003).
51. Mohseny, A. B. & Hogendoorn, P. C. W. Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem Cells Dayt. Ohio* **29**, 397–403 (2011).
52. Wagner, E. R. et al. Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma. *Sarcoma* **2011**, 325238 (2011).
53. Ozaki, T. et al. Osteosarcoma of the spine: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group. *Cancer* **94**, 1069–1077 (2002).
54. Clark, J. C. M., Dass, C. R. & Choong, P. F. M. A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **134**, 281–297 (2008).
55. Jawad, M. U., Cheung, M. C., Clarke, J., Koniaris, L. G. & Scully, S. P. Osteosarcoma: improvement in survival limited to high-grade patients only. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **137**, 597–607 (2011).

56. Guinebretière, J.-M. et al. Ostéosarcome de forme commune. *Encycl. Méd.-Chir. Appareil Locomoteur*, (2001).
57. Murphey, M. D. et al. Telangiectatic osteosarcoma: radiologic-pathologic comparison. *Radiology* **229**, 545–553 (2003).
58. Desandes, E. et al. Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr. Blood Cancer* **43**, 749–757 (2004).
59. Linet, M. S., Ries, L. A., Smith, M. A., Tarone, R. E. & Devesa, S. S. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 1051–1058 (1999).
60. Ottaviani, G. & Jaffe, N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **152**, 3–13 (2009).
61. Dass, C. R., Ek, E. T., Contreras, K. G. & Choong, P. F. A novel orthotopic murine model provides insights into cellular and molecular characteristics contributing to human osteosarcoma. *Clin. Exp. Metastasis* **23**, 367–380 (2006).
62. Mirabello, L., Troisi, R. J. & Savage, S. A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **125**, 229–234 (2009).
63. Bielack, S. S. et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **20**, 776–790 (2002).
64. Chou, A. J., Geller, D. S. & Gorlick, R. Therapy for osteosarcoma: where do we go from here? *Paediatr. Drugs* **10**, 315–327 (2008).
65. Bacci, G. et al. Bone metastases in osteosarcoma patients treated with neoadjuvant or adjuvant chemotherapy: the Rizzoli experience in 52 patients. *Acta Orthop.* **77**, 938–943 (2006).
66. Kager, L. et al. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 2011–2018 (2003).
67. Geller, D. S. & Gorlick, R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO* **8**, 705–718 (2010).
68. Guillon, M. A. M. et al. Clinical characteristics and prognosis of osteosarcoma in young children: a retrospective series of 15 cases. *BMC Cancer* **11**, 407 (2011).
69. Ottaviani, G. & Jaffe, N. The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **152**, 15–32 (2009).
70. Varley, J. M., Evans, D. G. & Birch, J. M. Li-Fraumeni syndrome—a molecular and clinical review. *Br. J. Cancer* **76**, 1–14 (1997).
71. Carnevale, A., Lieberman, E. & Cárdenas, R. Li-Fraumeni syndrome in pediatric patients with soft tissue sarcoma or osteosarcoma. *Arch. Med. Res.* **28**, 383–386 (1997).
72. Chauveinc, L. et al. Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet.* **22**, 77–88 (2001).
73. Leonard, A., Craft, A. W., Moss, C. & Malcolm, A. J. Osteogenic sarcoma in the Rothmund-Thomson syndrome. *Med. Pediatr. Oncol.* **26**, 249–253 (1996).

74. Hansen, M. F., Seton, M. & Merchant, A. Osteosarcoma in Paget's disease of bone. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **21 Suppl 2**, P58–63 (2006).
75. Janeway, K. A. & Walkley, C. R. Modeling human osteosarcoma in the mouse: From bedside to bench. *Bone* **47**, 859–865 (2010).
76. López-Guerrero, J. A., López-Ginés, C., Pellín, A., Carda, C. & Llombart-Bosch, A. Deregulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B* **13**, 81–91 (2004).
77. Sandberg, A. A. & Bridge, J. A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* **145**, 1–30 (2003).
78. Fuchs, B. & Pritchard, D. J. Etiology of osteosarcoma. *Clin. Orthop.* 40–52 (2002).
79. Wu, X., Cai, Z., Lou, L. & Zhu, Y. Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients. *Cancer Epidemiol.* **36**, 212–216 (2012).
80. Leaner, V. D. *et al.* Inhibition of AP-1 transcriptional activity blocks the migration, invasion, and experimental metastasis of murine osteosarcoma. *Am. J. Pathol.* **174**, 265–275 (2009).
81. Entz-Werlé, N. *et al.* Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **117**, 349–355 (2005).
82. Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A. & Sherr, C. J. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**, 993–1000 (1995).
83. Walkley, C. R. *et al.* Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease. *Genes Dev.* **22**, 1662–1676 (2008).
84. Mazabraud, A., Perdereau, B. & Contesso, G. [Reflections on the classification validation of the most common forms of osteosarcomas by functional isotopic methods]. *Bull. Cancer (Paris)* **79**, 759–765 (1992).
85. Schima, W. *et al.* Preoperative staging of osteosarcoma: efficacy of MR imaging in detecting joint involvement. *AJR Am. J. Roentgenol.* **163**, 1171–1175 (1994).
86. Bacci, G. *et al.* 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. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **14**, 1126–1134 (2003).
87. Entz-Werle, N. *et al.* Involvement of MET/TWIST/APC combination or the potential role of ossification factors in pediatric high-grade osteosarcoma oncogenesis. *Neoplasia N. Y. N* **9**, 678–688 (2007).
88. Kansara, M., Teng, M. W., Smyth, M. J. & Thomas, D. M. Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 722–735 (2014).
89. Lee, J. A. *et al.* RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* **56**, 738–743 (2011).
90. Ory, B. *et al.* Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* **104**, 2522–2529 (2005).

91. Heymann, D. *et al.* Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* **37**, 74–86 (2005).
92. Ohba, T. *et al.* Pleiotropic effects of bisphosphonates on osteosarcoma. *Bone* **63**, 110–120 (2014).
93. Meyers, P. A. *et al.* Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Cancer* **117**, 1736–1744 (2011).
94. Kelleher, F. C., Cain, J. E., Healy, J. M., Watkins, D. N. & Thomas, D. M. Prevailing importance of the hedgehog signaling pathway and the potential for treatment advancement in sarcoma. *Pharmacol. Ther.* **136**, 153–168 (2012).
95. Yang, W. *et al.* Targeting hedgehog-Gli-2 pathway in osteosarcoma. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **31**, 502–509 (2013).
96. Mu, X., Isaac, C., Greco, N., Huard, J. & Weiss, K. Notch Signaling is Associated with ALDH Activity and an Aggressive Metastatic Phenotype in Murine Osteosarcoma Cells. *Front. Oncol.* **3**, 143 (2013).
97. Cai, Y., Cai, T. & Chen, Y. Wnt pathway in osteosarcoma, from oncogenic to therapeutic. *J. Cell. Biochem.* **115**, 625–631 (2014).
98. Kansara, M. *et al.* Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 837–851 (2009).
99. Rubin, E. M. *et al.* Wnt inhibitory factor 1 decreases tumorigenesis and metastasis in osteosarcoma. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 731–741 (2010).
100. Yu, X.-W. *et al.* Prognostic significance of VEGF expression in osteosarcoma: a meta-analysis. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **35**, 155–160 (2014).
101. Grignani, G. *et al.* A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard multimodal therapy: an Italian Sarcoma Group study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **23**, 508–516 (2012).
102. Sulzbacher, I. *et al.* Expression of platelet-derived growth factor-AA is associated with tumor progression in osteosarcoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **16**, 66–71 (2003).
103. Weigel, B. *et al.* Phase 2 trial of cixutumumab in children, adolescents, and young adults with refractory solid tumors: a report from the Children’s Oncology Group. *Pediatr. Blood Cancer* **61**, 452–456 (2014).
104. Schroit, A. J. & Fidler, I. J. Effects of liposome structure and lipid composition on the activation of the tumoricidal properties of macrophages by liposomes containing muramyl dipeptide. *Cancer Res.* **42**, 161–167 (1982).
105. Kleinerman, E. S. *et al.* Phase II study of liposomal muramyl tripeptide in osteosarcoma: the cytokine cascade and monocyte activation following administration. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **10**, 1310–1316 (1992).
106. Sone, S., Mutsuura, S., Ogawara, M. & Tsubura, E. Potentiating effect of muramyl dipeptide and its lipophilic analog encapsulated in liposomes on tumor cell killing by human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **132**, 2105–2110 (1984).

107. Meyers, P. A. *et al.* Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival—a report from the Children’s Oncology Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26**, 633–638 (2008).
108. Beresford, J. N., Taylor, G. T. & Triffitt, J. T. Interferons and bone. A comparison of the effects of interferon-alpha and interferon-gamma in cultures of human bone-derived cells and an osteosarcoma cell line. *Eur. J. Biochem. FEBS* **193**, 589–597 (1990).
109. Yuan, X. *et al.* Interferon-alpha enhances sensitivity of human osteosarcoma U2OS cells to doxorubicin by p53-dependent apoptosis. *Acta Pharmacol. Sin.* **28**, 1835–1841 (2007).
110. Masuda, S., Fukuma, H. & Beppu, Y. Antitumor effect of human leukocyte interferon on human osteosarcoma transplanted into nude mice. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **19**, 1521–1528 (1983).
111. Strander, H. *et al.* Adjuvant interferon treatment in human osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **62**, 29–32 (1993).
112. Ishida, H. *et al.* Expression of the SART1 tumor-rejection antigen in human osteosarcomas. *Int. J. Oncol.* **17**, 29–32 (2000).
113. Tsuda, N. *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. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **19**, 346–351 (2001).
114. Tsukahara, T. *et al.* Prognostic impact and immunogenicity of a novel osteosarcoma antigen, papillomavirus binding factor, in patients with osteosarcoma. *Cancer Sci.* **99**, 368–375 (2008).
115. Jacobs, J. F. M. *et al.* Cancer-germline gene expression in pediatric solid tumors using quantitative real-time PCR. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **120**, 67–74 (2007).
116. Kantoff, P. W. *et al.* Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 411–422 (2010).
117. Brahmer, J. R. *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2455–2465 (2012).
118. ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **25 Suppl 3**, iii113–123 (2014).
119. Hattinger, C. M., Pasello, M., Ferrari, S., Picci, P. & Serra, M. Emerging drugs for high-grade osteosarcoma. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **15**, 615–634 (2010).
120. Janeway, K. A. & Grier, H. E. Sequelae of osteosarcoma medical therapy: a review of rare acute toxicities and late effects. *Lancet Oncol.* **11**, 670–678 (2010).
121. Whelan, J., Seddon, B. & Perisoglou, M. Management of osteosarcoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* **7**, 444–455 (2006).
122. Widemann, B. C. *et al.* High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer* **100**, 2222–2232 (2004).
123. Meyers, P. A. *et al.* Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 2004–2011 (2005).
124. Ferrari, S. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy with high-dose ifosfamide, high-dose methotrexate, cisplatin, and doxorubicin for patients with localized osteosarcoma of the

- extremity: a joint study by the Italian and Scandinavian Sarcoma Groups. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 8845–8852 (2005).
125. Goorin, A. M. et al. Presurgical chemotherapy compared with immediate surgery and adjuvant chemotherapy for nonmetastatic osteosarcoma: Pediatric Oncology Group Study POG-8651. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 1574–1580 (2003).
 126. Kempf-Bielack, B. et al. Osteosarcoma relapse after combined modality therapy: an analysis of unselected patients in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 559–568 (2005).
 127. Ta, H. T., Dass, C. R., Choong, P. F. M. & Dunstan, D. E. Osteosarcoma treatment: state of the art. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 247–263 (2009).
 128. Errani, C. et al. Palliative therapy for osteosarcoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **11**, 217–227 (2011).
 129. Bacci, G. et al. High grade osteosarcoma of the extremities with lung metastases at presentation: treatment with neoadjuvant chemotherapy and simultaneous resection of primary and metastatic lesions. *J. Surg. Oncol.* **98**, 415–420 (2008).
 130. Ferrari, S. et al. Postrelapse survival in osteosarcoma of the extremities: prognostic factors for long-term survival. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 710–715 (2003).
 131. Hauben, E. I. et al. Clinico-histologic parameters of osteosarcoma patients with late relapse. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **42**, 460–466 (2006).
 132. Carrle, D. & Bielack, S. Osteosarcoma lung metastases detection and principles of multimodal therapy. *Cancer Treat. Res.* **152**, 165–184 (2009).
 133. Franke, M. et al. Solitary skeletal osteosarcoma recurrence. Findings from the Cooperative Osteosarcoma Study Group. *Pediatr. Blood Cancer* **56**, 771–776 (2011).
 134. Chou, A. J. & Gorlick, R. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **6**, 1075–1085 (2006).
 135. Zhang, J. et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836–841 (2003).
 136. Zeng, W., Wan, R., Zheng, Y., Singh, S. R. & Wei, Y. Hypoxia, stem cells and bone tumor. *Cancer Lett.* **313**, 129–136 (2011).
 137. Jung, Y. et al. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat. Commun.* **4**, 1795 (2013).
 138. Karnoub, A. E. et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557–563 (2007).
 139. Malanchi, I. et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* **481**, 85–89 (2012).
 140. Franco, O. E., Shaw, A. K., Strand, D. W. & Hayward, S. W. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 33–39 (2010).
 141. Yang, L., Edwards, C. M. & Mundy, G. R. Gr-1+CD11b+ myeloid-derived suppressor cells: formidable partners in tumor metastasis. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **25**, 1701–1706 (2010).

142. Bingle, L., Brown, N. J. & Lewis, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* **196**, 254–265 (2002).
143. Dirkx, A. E. M., Oude Egbrink, M. G. A., Wagstaff, J. & Griffioen, A. W. Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 1183–1196 (2006).
144. Bronte, V., Serafini, P., Apolloni, E. & Zanovello, P. Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 **24**, 431–446 (2001).
145. Sawant, A. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells function as novel osteoclast progenitors enhancing bone loss in breast cancer. *Cancer Res.* **73**, 672–682 (2013).
146. Zhuang, J. *et al.* Osteoclasts in multiple myeloma are derived from Gr-1+CD11b+myeloid-derived suppressor cells. *PLoS One* **7**, e48871 (2012).
147. Danilin, S. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells expand during breast cancer progression and promote tumor-induced bone destruction. *Oncoimmunology* **1**, 1484–1494 (2012).
148. Takayanagi, H. Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nat. Rev. Rheumatol.* **5**, 667–676 (2009).
149. Sato, K. *et al.* Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.* **203**, 2673–2682 (2006).
150. Jung, Y. *et al.* Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells Dayt. Ohio* **26**, 2042–2051 (2008).
151. Dallas, S. L., Rosser, J. L., Mundy, G. R. & Bonewald, L. F. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J. Biol. Chem.* **277**, 21352–21360 (2002).
152. David, E. *et al.* The Bone Niche of Chondrosarcoma: A Sanctuary for Drug Resistance, Tumour Growth and also a Source of New Therapeutic Targets. *Sarcoma* **2011**, 932451 (2011).
153. Meads, M. B., Hazlehurst, L. A. & Dalton, W. S. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 2519–2526 (2008).
154. Clarke, M. F. *et al.* Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* **66**, 9339–9344 (2006).
155. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–760 (2006).
156. Todaro, M. *et al.* Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* **1**, 389–402 (2007).
157. Calabrese, C. *et al.* A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* **11**, 69–82 (2007).
158. Borovski, T., De Sousa E Melo, F., Vermeulen, L. & Medema, J. P. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.* **71**, 634–639 (2011).
159. Hovinga, K. E. *et al.* Inhibition of notch signaling in glioblastoma targets cancer stem cells via an endothelial cell intermediate. *Stem Cells Dayt. Ohio* **28**, 1019–1029 (2010).

160. Folkins, C. *et al.* Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer Res.* **67**, 3560–3564 (2007).
161. Siclari, V. A. & Qin, L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. *J. Orthop. Surg.* **5**, 78 (2010).
162. Di Fiore, R. *et al.* Identification and expansion of human osteosarcoma-cancer-stem cells by long-term 3-aminobenzamide treatment. *J. Cell. Physiol.* **219**, 301–313 (2009).
163. Wang, L., Park, P. & Lin, C.-Y. Characterization of stem cell attributes in human osteosarcoma cell lines. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 543–552 (2009).
164. Gillette, J. & Nielsen-Preiss, S. Cancer stem cells: seeds of growth in osteosarcoma. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 553–554 (2009).
165. Levings, P. P. *et al.* Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma. *Cancer Res.* **69**, 5648–5655 (2009).
166. Jögi, A. *et al.* Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7021–7026 (2002).
167. Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B. & Rich, J. N. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle Georget. Tex* **8**, 3274–3284 (2009).
168. McCord, A. M. *et al.* Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol. Cancer Res. MCR* **7**, 489–497 (2009).
169. Mazumdar, J., Dondeti, V. & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors in stem cells and cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 4319–4328 (2009).
170. Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **5**, 237–241 (2009).
171. Heddleston, J. M. *et al.* Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br. J. Cancer* **102**, 789–795 (2010).
172. Wang, Y., Liu, Y., Malek, S. N., Zheng, P. & Liu, Y. Targeting HIF1 α eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell* **8**, 399–411 (2011).
173. Keith, B. & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* **129**, 465–472 (2007).
174. Li, Z. *et al.* Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* **15**, 501–513 (2009).
175. Ando, K., Mori, K., Rédini, F. & Heymann, D. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. *Curr. Drug Discov. Technol.* **5**, 263–268 (2008).
176. Kwan Tat, S., Padrines, M., Théoleyre, S., Heymann, D. & Fortun, Y. IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 49–60 (2004).
177. Santibañez, J. F., Quintanilla, M. & Bernabeu, C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **121**, 233–251 (2011).
178. Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S. & Van Hul, W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr. Rev.* **26**, 743–774 (2005).

179. Annes, J. P., Munger, J. S. & Rifkin, D. B. Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell Sci.* **116**, 217–224 (2003).
180. Werb, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* **91**, 439–442 (1997).
181. Ignatz, R. A. & Massagué, J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **261**, 4337–4345 (1986).
182. Verrecchia, F., Chu, M. L. & Mauviel, A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J. Biol. Chem.* **276**, 17058–17062 (2001).
183. Schultz-Cherry, S. & Murphy-Ullrich, J. E. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J. Cell Biol.* **122**, 923–932 (1993).
184. Murphy-Ullrich, J. E. & Poczatek, M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**, 59–69 (2000).
185. Breuss, J. M. *et al.* Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J. Cell Sci.* **108 (Pt 6)**, 2241–2251 (1995).
186. Miller, L. A., Barnett, N. L., Sheppard, D. & Hyde, D. M. Expression of the beta6 integrin subunit is associated with sites of neutrophil influx in lung epithelium. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **49**, 41–48 (2001).
187. Munger, J. S. *et al.* The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* **96**, 319–328 (1999).
188. Teitelbaum, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289**, 1504–1508 (2000).
189. Oreffo, R. O., Mundy, G. R., Seyedin, S. M. & Bonewald, L. F. Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**, 817–823 (1989).
190. Oursler, M. J. Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor beta. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **9**, 443–452 (1994).
191. Dijke, P. ten & Hill, C. S. New insights into TGF-β–Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 265–273 (2004).
192. Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700 (2003).
193. Brown, C. B., Boyer, A. S., Runyan, R. B. & Barnett, J. V. Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* **283**, 2080–2082 (1999).
194. Massagué, J. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753–791 (1998).
195. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912–1934 (2002).
196. Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L. & Wrana, J. L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* **95**, 779–791 (1998).
197. Xu, L., Chen, Y. G. & Massagué, J. The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **2**, 559–562 (2000).

198. Xiao, Z., Liu, X., Henis, Y. I. & Lodish, H. F. A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7853–7858 (2000).
199. Xiao, Z., Watson, N., Rodriguez, C. & Lodish, H. F. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. *J. Biol. Chem.* **276**, 39404–39410 (2001).
200. Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C. H. & Moustakas, A. Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1079–1091 (2001).
201. Xiao, Z., Liu, X. & Lodish, H. F. Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J. Biol. Chem.* **275**, 23425–23428 (2000).
202. Xu, L., Kang, Y., Cöl, S. & Massagué, J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol. Cell* **10**, 271–282 (2002).
203. Hoodless, P. A. *et al.* Dominant-negative Smad2 mutants inhibit activin/Vg1 signaling and disrupt axis formation in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **207**, 364–379 (1999).
204. Liu, F., Pouponnot, C. & Massagué, J. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev.* **11**, 3157–3167 (1997).
205. Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M. & Nishida, E. Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep.* **1**, 176–182 (2000).
206. Dennler, S. *et al.* Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* **17**, 3091–3100 (1998).
207. Yingling, J. M. *et al.* Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 7019–7028 (1997).
208. Zawel, L. *et al.* Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol. Cell* **1**, 611–617 (1998).
209. Vindevoghel, L. *et al.* SMAD3/4-dependent transcriptional activation of the human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14769–14774 (1998).
210. Kang, Y., Chen, C.-R. & Massagué, J. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol. Cell* **11**, 915–926 (2003).
211. Massagué, J. How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 169–178 (2000).
212. Attisano, L. & Wrana, J. L. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 235–243 (2000).
213. Massagué, J. & Wotton, D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* **19**, 1745–1754 (2000).
214. Ten Dijke, P., Miyazono, K. & Heldin, C. H. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 64–70 (2000).
215. Bai, R.-Y. *et al.* SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGFbeta signalling. *Nat. Cell Biol.* **4**, 181–190 (2002).

216. Derynck, R., Zhang, Y. & Feng, X. H. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* **95**, 737–740 (1998).
217. Kato, Y., Habas, R., Katsuyama, Y., Näär, A. M. & He, X. A component of the ARC/Mediator complex required for TGF beta/Nodal signalling. *Nature* **418**, 641–646 (2002).
218. Liu, X., Sun, Y., Weinberg, R. A. & Lodish, H. F. Ski/Sno and TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**, 1–8 (2001).
219. Wang, W., Mariani, F. V., Harland, R. M. & Luo, K. Ski represses bone morphogenic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14394–14399 (2000).
220. Luo, K. et al. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev.* **13**, 2196–2206 (1999).
221. Stroschein, S. L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q. & Luo, K. Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* **286**, 771–774 (1999).
222. Wu, J. W. et al. Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling. *Cell* **111**, 357–367 (2002).
223. Xu, P., Liu, J. & Derynck, R. Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling. *FEBS Lett.* **586**, 1871–1884 (2012).
224. Atfi, A. et al. The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF- β signaling through interaction with the type II receptor. *J. Cell Biol.* **178**, 201–208 (2007).
225. Lin, X., Liang, M. & Feng, X. H. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 36818–36822 (2000).
226. Fukuchi, M. et al. Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1431–1443 (2001).
227. Ebisawa, T. et al. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem.* **276**, 12477–12480 (2001).
228. Tajima, Y. et al. Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor-beta signaling by Smad7. *J. Biol. Chem.* **278**, 10716–10721 (2003).
229. Aggarwal, K. & Massagué, J. Ubiquitin removal in the TGF- β pathway. *Nat. Cell Biol.* **14**, 656–657 (2012).
230. Shi, W. et al. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J. Cell Biol.* **164**, 291–300 (2004).
231. Kavsak, P. et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol. Cell* **6**, 1365–1375 (2000).
232. Suzuki, C. et al. Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **277**, 39919–39925 (2002).
233. Mu, Y., Gudey, S. K. & Landström, M. Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res.* **347**, 11–20 (2012).
234. Ozdamar, B. et al. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* **307**, 1603–1609 (2005).

235. Vilorio-Petit, A. M. *et al.* A role for the TGFbeta-Par6 polarity pathway in breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14028–14033 (2009).
236. Lawler, S. *et al.* The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J. Biol. Chem.* **272**, 14850–14859 (1997).
237. Galliher, A. J. & Schiemann, W. P. Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Res.* **67**, 3752–3758 (2007).
238. Lee, M. K. *et al.* TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J.* **26**, 3957–3967 (2007).
239. Kretzschmar, M., Doody, J. & Massagué, J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* **389**, 618–622 (1997).
240. Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. & Massagué, J. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* **13**, 804–816 (1999).
241. Funaba, M., Zimmerman, C. M. & Mathews, L. S. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* **277**, 41361–41368 (2002).
242. Matsuura, I., Wang, G., He, D. & Liu, F. Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3. *Biochemistry (Mosc.)* **44**, 12546–12553 (2005).
243. Zhang, Y. E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* **19**, 128–139 (2009).
244. Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L. & Arteaga, C. L. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J. Biol. Chem.* **275**, 36803–36810 (2000).
245. Wilkes, M. C. *et al.* Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res.* **65**, 10431–10440 (2005).
246. Lamouille, S. & Derynck, R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J. Cell Biol.* **178**, 437–451 (2007).
247. Lamouille, S. & Derynck, R. Emergence of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin axis in transforming growth factor-β-induced epithelial-mesenchymal transition. *Cells Tissues Organs* **193**, 8–22 (2011).
248. Shin, I., Bakin, A. V., Rodeck, U., Brunet, A. & Arteaga, C. L. Transforming growth factor beta enhances epithelial cell survival via Akt-dependent regulation of FKHL1. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3328–3339 (2001).
249. Chen, R. H., Su, Y. H., Chuang, R. L. & Chang, T. Y. Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene* **17**, 1959–1968 (1998).
250. Song, K., Wang, H., Krebs, T. L. & Danielpour, D. Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF-beta/ALK5-mediated Smad3 activation. *EMBO J.* **25**, 58–69 (2006).
251. Conery, A. R. *et al.* Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **6**, 366–372 (2004).

252. Remy, I., Montmarquette, A. & Michnick, S. W. PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat. Cell Biol.* **6**, 358–365 (2004).
253. Jaffe, A. B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 247–269 (2005).
254. Bhowmick, N. A. et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* **12**, 27–36 (2001).
255. Edlund, S., Landström, M., Heldin, C.-H. & Aspenström, P. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol. Biol. Cell* **13**, 902–914 (2002).
256. Wilkes, M. C., Murphy, S. J., Garamszegi, N. & Leof, E. B. Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8878–8889 (2003).
257. Margadant, C. & Sonnenberg, A. Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep.* **11**, 97–105 (2010).
258. Davis, B. N., Hilyard, A. C., Nguyen, P. H., Lagna, G. & Hata, A. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol. Cell* **39**, 373–384 (2010).
259. Davis, B. N., Hilyard, A. C., Lagna, G. & Hata, A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* **454**, 56–61 (2008).
260. De Caestecker, M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 1–11 (2004).
261. Siegel, P. M. & Massagué, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 807–821 (2003).
262. Massagué, J. & Gomis, R. R. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* **580**, 2811–2820 (2006).
263. Bategay, E. J., Raines, E. W., Seifert, R. A., Bowen-Pope, D. F. & Ross, R. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* **63**, 515–524 (1990).
264. Massagué, J., Blain, S. W. & Lo, R. S. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**, 295–309 (2000).
265. Blobel, G. C., Schiemann, W. P. & Lodish, H. F. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1350–1358 (2000).
266. Pardali, E., Goumans, M.-J. & ten Dijke, P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol.* **20**, 556–567 (2010).
267. Gordon, K. J. & Blobel, G. C. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**, 197–228 (2008).
268. Kulkarni, A. B. & Karlsson, S. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am. J. Pathol.* **143**, 3–9 (1993).
269. Sanford, L. P. et al. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Dev. Camb. Engl.* **124**, 2659–2670 (1997).

270. Stenvers, K. L. *et al.* Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4371–4385 (2003).
271. Compton, L. A., Potash, D. A., Brown, C. B. & Barnett, J. V. Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor. *Circ. Res.* **101**, 784–791 (2007).
272. Verrecchia, F. & Mauviel, A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J. Gastroenterol. WJG* **13**, 3056–3062 (2007).
273. Sporn, M. B. *et al.* Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science* **219**, 1329–1331 (1983).
274. Wynn, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.* **117**, 524–529 (2007).
275. Fox, S. W. & Lovibond, A. C. Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption. *Mol. Cell. Endocrinol.* **243**, 19–26 (2005).
276. Seyedin, S. M., Thomas, T. C., Thompson, A. Y., Rosen, D. M. & Piez, K. A. Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 2267–2271 (1985).
277. Hering, S. *et al.* TGFbeta1 and TGFbeta2 mRNA and protein expression in human bone samples. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* **109**, 217–226 (2001).
278. Erlebacher, A., Filvaroff, E. H., Ye, J. Q. & Derynck, R. Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1903–1918 (1998).
279. Martin, T. J. & Sims, N. A. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol. Med.* **11**, 76–81 (2005).
280. Lucas, P. A. Chemotactic response of osteoblast-like cells to transforming growth factor beta. *Bone* **10**, 459–463 (1989).
281. Pfeilschifter, J. *et al.* Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **5**, 825–830 (1990).
282. Hughes, F. J., Aubin, J. E. & Heersche, J. N. Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Bone Miner.* **19**, 63–74 (1992).
283. Alliston, T., Choy, L., Ducey, P., Karsenty, G. & Derynck, R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J.* **20**, 2254–2272 (2001).
284. Maeda, S., Hayashi, M., Komiya, S., Imamura, T. & Miyazono, K. Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J.* **23**, 552–563 (2004).
285. Karsdal, M. A. *et al.* Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 44061–44067 (2002).

286. Karsdal, M. A., Andersen, T. A., Bonewald, L. & Christiansen, C. Matrix metalloproteinases (MMPs) safeguard osteoblasts from apoptosis during transdifferentiation into osteocytes: MT1-MMP maintains osteocyte viability. *DNA Cell Biol.* **23**, 155–165 (2004).
287. Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Parfitt, A. M. & Manolagas, S. C. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **13**, 793–802 (1998).
288. Katagiri, T. et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* **127**, 1755–1766 (1994).
289. Chung, K. Y., Agarwal, A., Uitto, J. & Mauviel, A. An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **271**, 3272–3278 (1996).
290. Banerjee, C. et al. Transforming growth factor-beta 1 responsiveness of the rat osteocalcin gene is mediated by an activator protein-1 binding site. *Endocrinology* **137**, 1991–2000 (1996).
291. Spinella-Jaegle, S. et al. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. *Bone* **29**, 323–330 (2001).
292. Walsh, S., Jefferiss, C., Stewart, K. & Beresford, J. N. TGFbeta1 limits the expansion of the osteoprogenitor fraction in cultures of human bone marrow stromal cells. *Cell Tissue Res.* **311**, 187–198 (2003).
293. Kaneda, T. et al. Endogenous production of TGF-beta is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of receptor activator of NF-kappa B ligand and macrophage-colony-stimulating factor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **165**, 4254–4263 (2000).
294. Fuller, K., Lean, J. M., Bayley, K. E., Wani, M. R. & Chambers, T. J. A role for TGFbeta(1) in osteoclast differentiation and survival. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 13)**, 2445–2453 (2000).
295. Sells Galvin, R. J., Gatlin, C. L., Horn, J. W. & Fuson, T. R. TGF-beta enhances osteoclast differentiation in hematopoietic cell cultures stimulated with RANKL and M-CSF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 233–239 (1999).
296. Quinn, J. M. et al. Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **16**, 1787–1794 (2001).
297. Koseki, T. et al. Role of TGF-beta family in osteoclastogenesis induced by RANKL. *Cell. Signal.* **14**, 31–36 (2002).
298. Yan, T., Riggs, B. L., Boyle, W. J. & Khosla, S. Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF-beta1. *J. Cell. Biochem.* **83**, 320–325 (2001).
299. Hattersley, G. & Chambers, T. J. Effects of transforming growth factor beta 1 on the regulation of osteoclastic development and function. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **6**, 165–172 (1991).
300. Dieudonné, S. C., Foo, P., van Zoelen, E. J. & Burger, E. H. Inhibiting and stimulating effects of TGF-beta 1 on osteoclastic bone resorption in fetal mouse bone organ cultures. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **6**, 479–487 (1991).
301. Tashjian, A. H. et al. Alpha and beta human transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4535–4538 (1985).

302. Pfeilschifter, J., Seyedin, S. M. & Mundy, G. R. Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J. Clin. Invest.* **82**, 680–685 (1988).
303. Lerner, U. H. Transforming growth factor-beta stimulates bone resorption in neonatal mouse calvariae by a prostaglandin-unrelated but cell proliferation-dependent pathway. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **11**, 1628–1639 (1996).
304. Levy, L. & Hill, C. S. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 41–58 (2006).
305. Walker, R. A. & Dearing, S. J. Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **28**, 641–644 (1992).
306. Friedman, E. et al. High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **4**, 549–554 (1995).
307. Wikström, P., Stattin, P., Franck-Lissbrant, I., Damber, J. E. & Bergh, A. Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *The Prostate* **37**, 19–29 (1998).
308. Roberts, A. B. & Wakefield, L. M. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8621–8623 (2003).
309. Grady, W. M. et al. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* **59**, 320–324 (1999).
310. Izumoto, S. et al. Microsatellite instability and mutated type II transforming growth factor-beta receptor gene in gliomas. *Cancer Lett.* **112**, 251–256 (1997).
311. Chen, T., Carter, D., Garrigue-Antar, L. & Reiss, M. Transforming growth factor beta type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Res.* **58**, 4805–4810 (1998).
312. Wang, D. et al. Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor-beta signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res.* **60**, 4507–4512 (2000).
313. Goggins, M. et al. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res.* **58**, 5329–5332 (1998).
314. Gomis, R. R. et al. A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12747–12752 (2006).
315. Seoane, J., Le, H.-V., Shen, L., Anderson, S. A. & Massagué, J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **117**, 211–223 (2004).
316. Pardali, K. et al. Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **275**, 29244–29256 (2000).
317. Datto, M. B. et al. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5545–5549 (1995).
318. Hannon, G. J. & Beach, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**, 257–261 (1994).
319. Meulmeester, E. & Ten Dijke, P. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J. Pathol.* **223**, 205–218 (2011).

320. Sikder, H. A., Devlin, M. K., Dunlap, S., Ryu, B. & Alani, R. M. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* **3**, 525–530 (2003).
321. Akhurst, R. J. & Hata, A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 790–811 (2012).
322. Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R. & Derynck, R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.* **127**, 2021–2036 (1994).
323. Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* **19**, 156–172 (2009).
324. Moustakas, A. & Heldin, C.-H. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 3699–3714 (2009).
325. Heldin, C.-H., Landström, M. & Moustakas, A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 166–176 (2009).
326. Moustakas, A. & Heldin, C.-H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci.* **98**, 1512–1520 (2007).
327. Berx, G., Raspé, E., Christofori, G., Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **24**, 587–597 (2007).
328. Huber, M. A., Kraut, N. & Beug, H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 548–558 (2005).
329. Deckers, M. *et al.* The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 2202–2209 (2006).
330. Valcourt, U., Kowantetz, M., Niimi, H., Heldin, C.-H. & Moustakas, A. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1987–2002 (2005).
331. Roberts, A. B. *et al.* Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 19–27 (2006).
332. Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C. H. & ten Dijke, P. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 24)**, 4557–4568 (1999).
333. Dzwonek, J. *et al.* Smad3 is a key nonredundant mediator of transforming growth factor beta signaling in Nme mouse mammary epithelial cells. *Mol. Cancer Res. MCR* **7**, 1342–1353 (2009).
334. Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 563–572 (2002).
335. Psaila, B. & Lyden, D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 285–293 (2009).
336. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* **8**, 98–101 (1989).

337. Sneddon, J. B. & Werb, Z. Location, location, location: the cancer stem cell niche. *Cell Stem Cell* **1**, 607–611 (2007).
338. Psaila, B., Kaplan, R. N., Port, E. R. & Lyden, D. Priming the ‘soil’ for breast cancer metastasis: the pre-metastatic niche. *Breast Dis.* **26**, 65–74 (2006).
339. Kaplan, R. N. *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**, 820–827 (2005).
340. Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H. & Maru, Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1369–1375 (2006).
341. Hiratsuka, S. *et al.* The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1349–1355 (2008).
342. Kaplan, R. N., Psaila, B. & Lyden, D. Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. *Trends Mol. Med.* **13**, 72–81 (2007).
343. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–444 (2008).
344. Mantovani, A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* **457**, 36–37 (2009).
345. Giavazzi, R. *et al.* Interleukin 1-induced augmentation of experimental metastases from a human melanoma in nude mice. *Cancer Res.* **50**, 4771–4775 (1990).
346. Hiratsuka, S. *et al.* MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* **2**, 289–300 (2002).
347. Yang, L. & Moses, H. L. Transforming growth factor beta: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer? *Cancer Res.* **68**, 9107–9111 (2008).
348. Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 392–401 (2006).
349. Liang, Z. *et al.* Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res.* **64**, 4302–4308 (2004).
350. Padua, D. *et al.* TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* **133**, 66–77 (2008).
351. Guise, T. A. *et al.* Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J. Clin. Invest.* **98**, 1544–1549 (1996).
352. Kang, Y. *et al.* A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* **3**, 537–549 (2003).
353. Roberts, A. B. *et al.* Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4167–4171 (1986).
354. Madri, J. A., Pratt, B. M. & Tucker, A. M. Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **106**, 1375–1384 (1988).
355. Yang, E. Y. & Moses, H. L. Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J. Cell Biol.* **111**, 731–741 (1990).

356. Gajdusek, C. M., Luo, Z. & Mayberg, M. R. Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta-1: synergistic mediators of angiogenesis in vitro. *J. Cell. Physiol.* **157**, 133–144 (1993).
357. Choi, M. E. & Ballermann, B. J. Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor-beta receptors. *J. Biol. Chem.* **270**, 21144–21150 (1995).
358. Sánchez-Elsner, T. et al. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 38527–38535 (2001).
359. Ueki, N. et al. Excessive production of transforming growth-factor beta 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth. *Biochim. Biophys. Acta* **1137**, 189–196 (1992).
360. De Jong, J. S., van Diest, P. J., van der Valk, P. & Baak, J. P. Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis. *J. Pathol.* **184**, 53–57 (1998).
361. Ito, N. et al. Positive correlation of plasma transforming growth factor-beta 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **89**, 45–48 (1995).
362. Ivanovic, V., Melman, A., Davis-Joseph, B., Valcic, M. & Geliebter, J. Elevated plasma levels of TGF-beta 1 in patients with invasive prostate cancer. *Nat. Med.* **1**, 282–284 (1995).
363. Junker, U. et al. Transforming growth factor beta 1 is significantly elevated in plasma of patients suffering from renal cell carcinoma. *Cytokine* **8**, 794–798 (1996).
364. Saito, H. et al. The expression of transforming growth factor-beta1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* **86**, 1455–1462 (1999).
365. Pertovaara, L. et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 6271–6274 (1994).
366. Sunderkötter, C., Goebeler, M., Schulze-Osthoff, K., Bhardwaj, R. & Sorg, C. Macrophage-derived angiogenesis factors. *Pharmacol. Ther.* **51**, 195–216 (1991).
367. Ashcroft, G. S. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* **1**, 1275–1282 (1999).
368. Edwards, D. R. et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J.* **6**, 1899–1904 (1987).
369. Kordula, T. et al. Synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in human hepatoma cells (HepG2). Up-regulation by interleukin-6 and transforming growth factor beta 1. *FEBS Lett.* **313**, 143–147 (1992).
370. Shimizu, S. et al. Involvement of transforming growth factor beta1 in autocrine enhancement of gelatinase B secretion by murine metastatic colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **56**, 3366–3370 (1996).

371. Sehgal, I. & Thompson, T. C. Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines. *Mol. Biol. Cell* **10**, 407–416 (1999).
372. Duivenvoorden, W. C., Hirte, H. W. & Singh, G. Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* **17**, 27–34 (1999).
373. Hagedorn, H. G., Bachmeier, B. E. & Nerlich, A. G. Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review). *Int. J. Oncol.* **18**, 669–681 (2001).
374. Vu, T. H. et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* **93**, 411–422 (1998).
375. Hiraoka, N., Allen, E., Apel, I. J., Gyetko, M. R. & Weiss, S. J. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* **95**, 365–377 (1998).
376. Botti, C., Seregini, E., Ferrari, L., Martinetti, A. & Bombardieri, E. Immunosuppressive factors: role in cancer development and progression. *Int. J. Biol. Markers* **13**, 51–69 (1998).
377. Letterio, J. J. & Roberts, A. B. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 137–161 (1998).
378. Fortunel, N. O., Hatzfeld, A. & Hatzfeld, J. A. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* **96**, 2022–2036 (2000).
379. Czarnecki, C. W., Chiu, H. H., Wong, G. H., McCabe, S. M. & Palladino, M. A. Transforming growth factor-beta 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **140**, 4217–4223 (1988).
380. Geiser, A. G. et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) controls expression of major histocompatibility genes in the postnatal mouse: aberrant histocompatibility antigen expression in the pathogenesis of the TGF-beta 1 null mouse phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9944–9948 (1993).
381. Letterio, J. J. et al. Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J. Clin. Invest.* **98**, 2109–2119 (1996).
382. Geissmann, F. et al. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 4567–4575 (1999).
383. Padua, D. & Massagué, J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res.* **19**, 89–102 (2009).
384. Xu, S., Yang, S., Sun, G., Huang, W. & Zhang, Y. Transforming growth factor-beta polymorphisms and serum level in the development of osteosarcoma. *DNA Cell Biol.* **33**, 802–806 (2014).
385. Yang, R. S. et al. Relation between histological intensity of transforming growth factor-beta isoforms in human osteosarcoma and the rate of lung metastasis. *Tohoku J. Exp. Med.* **184**, 133–142 (1998).
386. Franchi, A. et al. Expression of transforming growth factor beta isoforms in osteosarcoma variants: association of TGF beta 1 with high-grade osteosarcomas. *J. Pathol.* **185**, 284–289 (1998).
387. Mintz, M. B. et al. An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma. *Cancer Res.* **65**, 1748–1754 (2005).

388. Huang, Y. *et al.* RLIM interacts with Smurf2 and promotes TGF- β induced U2OS cell migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **414**, 181–185 (2011).
389. Kunita, A., Kashima, T. G., Ohazama, A., Grigoriadis, A. E. & Fukayama, M. Podoplanin is regulated by AP-1 and promotes platelet aggregation and cell migration in osteosarcoma. *Am. J. Pathol.* **179**, 1041–1049 (2011).
390. Chen, J. *et al.* The up-regulation of cysteine-rich protein 61 induced by transforming growth factor beta enhances osteosarcoma cell migration. *Mol. Cell. Biochem.* **384**, 269–277 (2013).
391. Sung, J. Y. *et al.* Interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP) promotes epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-like phenomena, cell-motility, and invasion via TGF- β signaling in U2OS cells. *Cell Death Dis.* **5**, e1224 (2014).
392. Quan, G. M. Y. & Choong, P. F. M. Anti-angiogenic therapy for osteosarcoma. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 707–713 (2006).
393. Tsubaki, M. *et al.* Blockade of the Ras/MEK/ERK and Ras/PI3K/Akt pathways by statins reduces the expression of bFGF, HGF, and TGF- β as angiogenic factors in mouse osteosarcoma. *Cytokine* **54**, 100–107 (2011).
394. Kawano, M., Itonaga, I., Iwasaki, T., Tsuchiya, H. & Tsumura, H. Anti-TGF- β antibody combined with dendritic cells produce antitumor effects in osteosarcoma. *Clin. Orthop.* **470**, 2288–2294 (2012).
395. Tu, B. *et al.* Osteosarcoma cells promote the production of pro-tumor cytokines in mesenchymal stem cells by inhibiting their osteogenic differentiation through the TGF- β /Smad2/3 pathway. *Exp. Cell Res.* **320**, 164–173 (2014).
396. Zhang, H. *et al.* Transforming growth factor β 1 signal is crucial for dedifferentiation of cancer cells to cancer stem cells in osteosarcoma. *Stem Cells Dayt. Ohio* **31**, 433–446 (2013).
397. Matsuyama, S. *et al.* SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* **63**, 7791–7798 (2003).
398. Nagaraj, N. S. & Datta, P. K. Targeting the Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Human Cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **19**, 77–91 (2010).
399. Hau, P. *et al.* Inhibition of TGF-beta2 with AP 12009 in recurrent malignant gliomas: from preclinical to phase I/II studies. *Oligonucleotides* **17**, 201–212 (2007).
400. Schlingensiepen, K.-H. *et al.* Transforming growth factor-beta 2 gene silencing with trabedersen (AP 12009) in pancreatic cancer. *Cancer Sci.* **102**, 1193–1200 (2011).
401. Bogdahn, U. *et al.* Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF- β 2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study. *Neuro-Oncol.* **13**, 132–142 (2011).
402. Nemunaitis, J. *et al.* Phase II trial of Belagenpumatucel-L, a TGF-beta2 antisense gene modified allogeneic tumor vaccine in advanced non small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Cancer Gene Ther.* **16**, 620–624 (2009).
403. Nam, J.-S. *et al.* An anti-transforming growth factor beta antibody suppresses metastasis via cooperative effects on multiple cell compartments. *Cancer Res.* **68**, 3835–3843 (2008).
404. Connolly, E. C., Freimuth, J. & Akhurst, R. J. Complexities of TGF- β targeted cancer therapy. *Int. J. Biol. Sci.* **8**, 964–978 (2012).

405. Arteaga, C. L. *et al.* Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* **92**, 2569–2576 (1993).
406. Morris, J. C. *et al.* Phase I study of GC1008 (fresolimumab): a human anti-transforming growth factor-beta (TGF β) monoclonal antibody in patients with advanced malignant melanoma or renal cell carcinoma. *PLoS One* **9**, e90353 (2014).
407. Yang, Y.-A. *et al.* Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J. Clin. Invest.* **109**, 1607–1615 (2002).
408. Muraoka, R. S. *et al.* Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J. Clin. Invest.* **109**, 1551–1559 (2002).
409. Rowland-Goldsmith, M. A. *et al.* Soluble type II transforming growth factor-beta receptor attenuates expression of metastasis-associated genes and suppresses pancreatic cancer cell metastasis. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 161–167 (2002).
410. Bandyopadhyay, A. *et al.* Extracellular domain of TGFbeta type III receptor inhibits angiogenesis and tumor growth in human cancer cells. *Oncogene* **21**, 3541–3551 (2002).
411. Hjelmeland, M. D. *et al.* SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 737–745 (2004).
412. Tanaka, H. *et al.* Transforming growth factor β signaling inhibitor, SB-431542, induces maturation of dendritic cells and enhances anti-tumor activity. *Oncol. Rep.* **24**, 1637–1643 (2010).
413. Takeuchi, K. *et al.* Tgf-Beta inhibition restores terminal osteoblast differentiation to suppress myeloma growth. *PLoS One* **5**, e9870 (2010).
414. Ehata, S. *et al.* Ki26894, a novel transforming growth factor-beta type I receptor kinase inhibitor, inhibits in vitro invasion and in vivo bone metastasis of a human breast cancer cell line. *Cancer Sci.* **98**, 127–133 (2007).
415. Shinto, O. *et al.* Inhibitory effect of a TGFbeta receptor type-I inhibitor, Ki26894, on invasiveness of scirrhous gastric cancer cells. *Br. J. Cancer* **102**, 844–851 (2010).
416. Uhl, M. *et al.* SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **64**, 7954–7961 (2004).
417. Mohammad, K. S. *et al.* TGF-beta-RI kinase inhibitor SD-208 reduces the development and progression of melanoma bone metastases. *Cancer Res.* **71**, 175–184 (2011).
418. Korpál, M. *et al.* Imaging transforming growth factor-beta signaling dynamics and therapeutic response in breast cancer bone metastasis. *Nat. Med.* **15**, 960–966 (2009).
419. Melisi, D. *et al.* LY2109761, a novel transforming growth factor beta receptor type I and type II dual inhibitor, as a therapeutic approach to suppressing pancreatic cancer metastasis. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 829–840 (2008).
420. Zhang, B., Halder, S. K., Zhang, S. & Datta, P. K. Targeting transforming growth factor-beta signaling in liver metastasis of colon cancer. *Cancer Lett.* **277**, 114–120 (2009).

421. Yakymovych, I., Engström, U., Grimsby, S., Heldin, C.-H. & Souchelnytskyi, S. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling by low molecular weight compounds interfering with ATP- or substrate-binding sites of the TGF beta type I receptor kinase. *Biochemistry (Mosc.)* **41**, 11000–11007 (2002).
422. Zhao, B. M. & Hoffmann, F. M. Inhibition of transforming growth factor-beta1-induced signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by the Smad-binding peptide aptamer Trx-SARA. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3819–3831 (2006).
423. Hanyu, A. et al. The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor- β signaling. *J. Cell Biol.* **155**, 1017–1028 (2001).
424. Mochizuki, T. et al. Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor-beta superfamily signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 31568–31574 (2004).
425. Hayashi, H. et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* **89**, 1165–1173 (1997).
426. Zhang, S. et al. Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4488–4499 (2007).
427. Shi, X. et al. Study of interaction between Smad7 and DNA by single-molecule force spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 1284–1287 (2008).
428. Brodin, G., Ahgren, A., ten Dijke, P., Heldin, C. H. & Heuchel, R. Efficient TGF-beta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter. *J. Biol. Chem.* **275**, 29023–29030 (2000).
429. Park, S. H. Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 9–16 (2005).
430. Mazars, A. et al. Evidence for a role of the JNK cascade in Smad7-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 36797–36803 (2001).
431. Edlund, S. et al. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Mol. Biol. Cell* **14**, 529–544 (2003).
432. Iwai, T., Murai, J., Yoshikawa, H. & Tsumaki, N. Smad7 Inhibits chondrocyte differentiation at multiple steps during endochondral bone formation and down-regulates p38 MAPK pathways. *J. Biol. Chem.* **283**, 27154–27164 (2008).
433. Yan, X., Liu, Z. & Chen, Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **41**, 263–272 (2009).
434. Javelaud, D. et al. Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis. *Cancer Res.* **67**, 2317–2324 (2007).
435. Javelaud, D. et al. Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells inhibits their tumorigenicity in vitro and in vivo. *Oncogene* **24**, 7624–7629 (2005).
436. Javelaud, D. et al. Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells inhibits their tumorigenicity in vitro and in vivo. *Oncogene* **24**, 7624–7629 (2005).

437. DiVito, K. A. *et al.* Smad7 restricts melanoma invasion by restoring N-cadherin expression and establishing heterotypic cell-cell interactions in vivo. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 795–808 (2010).
438. Zhou, F. *et al.* Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF- β signalling. *Nat. Commun.* **5**, 3388 (2014).
439. Kan, H., Guo, W., Huang, Y. & Liu, D. MicroRNA-520g induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting SMAD7. *FEBS Lett.* **589**, 102–109 (2015).
440. Li, Y. *et al.* Metastatic heterogeneity of breast cancer cells is associated with expression of a heterogeneous TGF β -activating miR424-503 gene cluster. *Cancer Res.* **74**, 6107–6118 (2014).
441. Gaspar, N. J. *et al.* Inhibition of Transforming Growth Factor β Signaling Reduces Pancreatic Adenocarcinoma Growth and Invasiveness. *Mol. Pharmacol.* **72**, 152–161 (2007).
442. Ge, R. *et al.* Inhibition of growth and metastasis of mouse mammary carcinoma by selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptor kinase in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 4315–4330 (2006).
443. Medicherla, S. *et al.* Antitumor Activity of TGF- β , Inhibitor is Dependent on the Microenvironment. *Anticancer Res.* **27**, 4149–4157 (2007).
444. Hayashi, T. *et al.* Transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor down-regulates cytokine secretion and multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 7540–7546 (2004).
445. Xu, Q. *et al.* Peripheral TGF- β 1 Signaling Is a Critical Event in Bone Cancer-Induced Hyperalgesia in Rodents. *J. Neurosci.* **33**, 19099–19111 (2013).
446. Lamora, A. *et al.* Overexpression of smad7 blocks primary tumor growth and lung metastasis development in osteosarcoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 5097–5112 (2014).
447. Jiang, S. *et al.* Antimalarial activities and therapeutic properties of febrifugine analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1169–1176 (2005).
448. Sen, D., Banerjee, A., Ghosh, A. K. & Chatterjee, T. K. Synthesis and antimalarial evaluation of some 4-quinazolinone derivatives based on febrifugine. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **1**, 401–405 (2010).
449. Pinion, J. L., Bilgili, S. F., Eckman, M. K. & Hess, J. B. The effects of halofuginone and salinomycin, alone and in combination, on live performance and skin characteristics of broilers. *Poult. Sci.* **74**, 391–397 (1995).
450. Zhang, D.-F. *et al.* Anticoccidial effect of halofuginone hydrobromide against *Eimeria tenella* with associated histology. *Parasitol. Res.* **111**, 695–701 (2012).
451. Dauschies, A., Gässlein, U. & Rommel, M. Comparative efficacy of anticoccidials under the conditions of commercial broiler production and in battery trials. *Vet. Parasitol.* **76**, 163–171 (1998).
452. Peeters, J. E., Villacorta, I., Naciri, M. & Vanopdenbosch, E. Specific serum and local antibody responses against *Cryptosporidium parvum* during medication of calves with halofuginone lactate. *Infect. Immun.* **61**, 4440–4445 (1993).

453. Takaya, Y. *et al.* New type of febrifugine analogues, bearing a quinolizidine moiety, show potent antimalarial activity against *Plasmodium malaria* parasite. *J. Med. Chem.* **42**, 3163–3166 (1999).
454. Kobayashi, S. *et al.* Catalytic Asymmetric Synthesis of Antimalarial Alkaloids Febrifugine and Isofebrifugine and Their Biological Activity. *J. Org. Chem.* **64**, 6833–6841 (1999).
455. Taniguchi, T. & Ogasawara, K. A diastereocontrolled synthesis of (+)-febrifugine: a potent antimalarial piperidine alkaloid. *Org. Lett.* **2**, 3193–3195 (2000).
456. Samant, B. S. & Sukhthankar, M. G. Synthesis and comparison of antimalarial activity of febrifugine derivatives including halofuginone. *Med. Chem. Shāriqah United Arab Emir.* **5**, 293–300 (2009).
457. McLaughlin, N. P. & Evans, P. Dihydroxylation of vinyl sulfones: stereoselective synthesis of (+)- and (-)-febrifugine and halofuginone. *J. Org. Chem.* **75**, 518–521 (2010).
458. McLaughlin, N. P., Evans, P. & Pines, M. The chemistry and biology of febrifugine and halofuginone. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 1993–2004 (2014).
459. Pines, M. & Spector, I. Halofuginone — The Multifaceted Molecule. *Molecules* **20**, 573–594 (2015).
460. Nelson, E. F., Huang, C. W., Ewel, J. M., Chang, A. A. & Yuan, C. Halofuginone down-regulates Smad3 expression and inhibits the TGFbeta-induced expression of fibrotic markers in human corneal fibroblasts. *Mol. Vis.* **18**, 479–487 (2012).
461. Halevy, O., Nagler, A., Levi-Schaffer, F., Genina, O. & Pines, M. Inhibition of collagen type I synthesis by skin fibroblasts of graft versus host disease and scleroderma patients: effect of halofuginone. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1057–1063 (1996).
462. Popov, Y. *et al.* Halofuginone induces matrix metalloproteinases in rat hepatic stellate cells via activation of p38 and NFkappaB. *J. Biol. Chem.* **281**, 15090–15098 (2006).
463. Zcharia, E. *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinase-2 by halofuginone is mediated by the Egr1 transcription factor. *Anticancer. Drugs* **23**, 1022–1031 (2012).
464. Bruck, R. *et al.* Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Hepatol. Baltim. Md* **33**, 379–386 (2001).
465. Pines, M. *et al.* Reduction in dermal fibrosis in the tight-skin (Tsk) mouse after local application of halofuginone. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1221–1227 (2001).
466. Zion, O. *et al.* Inhibition of transforming growth factor beta signaling by halofuginone as a modality for pancreas fibrosis prevention. *Pancreas* **38**, 427–435 (2009).
467. Gnainsky, Y. *et al.* Gene expression during chemically induced liver fibrosis: effect of halofuginone on TGF-beta signaling. *Cell Tissue Res.* **328**, 153–166 (2007).
468. Roffe, S., Hagai, Y., Pines, M. & Halevy, O. Halofuginone inhibits Smad3 phosphorylation via the PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways in muscle cells: effect on myotube fusion. *Exp. Cell Res.* **316**, 1061–1069 (2010).
469. Spector, I. *et al.* Involvement of host stroma cells and tissue fibrosis in pancreatic tumor development in transgenic mice. *PLoS One* **7**, e41833 (2012).
470. Nevo, Y. *et al.* Fibrosis inhibition and muscle histopathology improvement in laminin-alpha2-deficient mice. *Muscle Nerve* **42**, 218–229 (2010).

471. Halevy, O. et al. Inhibition of muscle fibrosis and improvement of muscle histopathology in dysferlin knock-out mice treated with halofuginone. *Histol. Histopathol.* **28**, 211–226 (2013).
472. Genin, O. et al. Myofibroblasts in pulmonary and brain metastases of alveolar soft-part sarcoma: a novel target for treatment? *Neoplasia N. Y. N* **10**, 940–948 (2008).
473. Abramovitch, R., Dafni, H., Neeman, M., Nagler, A. & Pines, M. Inhibition of neovascularization and tumor growth, and facilitation of wound repair, by halofuginone, an inhibitor of collagen type I synthesis. *Neoplasia N. Y. N* **1**, 321–329 (1999).
474. Elkin, M. et al. Inhibition of bladder carcinoma angiogenesis, stromal support, and tumor growth by halofuginone. *Cancer Res.* **59**, 4111–4118 (1999).
475. Pinthus, J. H. et al. Inhibition of Wilms tumor xenograft progression by halofuginone is accompanied by activation of WT-1 gene expression. *J. Urol.* **174**, 1527–1531 (2005).
476. Van Kempen, L. C. L. T. et al. Type I collagen expression contributes to angiogenesis and the development of deeply invasive cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **122**, 1019–1029 (2008).
477. Spector, I. et al. Inhibition of pancreatic stellate cell activation by halofuginone prevents pancreatic xenograft tumor development. *Pancreas* **39**, 1008–1015 (2010).
478. Gavish, Z. et al. Growth inhibition of prostate cancer xenografts by halofuginone. *The Prostate* **51**, 73–83 (2002).
479. Taras, D. et al. Halofuginone suppresses the lung metastasis of chemically induced hepatocellular carcinoma in rats through MMP inhibition. *Neoplasia N. Y. N* **8**, 312–318 (2006).
480. Juárez, P. et al. Halofuginone inhibits the establishment and progression of melanoma bone metastases. *Cancer Res.* **72**, 6247–6256 (2012).
481. Sheffer, Y. et al. Inhibition of fibroblast to myofibroblast transition by halofuginone contributes to the chemotherapy-mediated antitumoral effect. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 570–577 (2007).
482. Grudzien, M. M. et al. The antifibrotic drug halofuginone inhibits proliferation and collagen production by human leiomyoma and myometrial smooth muscle cells. *Fertil. Steril.* **93**, 1290–1298 (2010).
483. De Figueiredo-Pontes, L. L. et al. Halofuginone has anti-proliferative effects in acute promyelocytic leukemia by modulating the transforming growth factor beta signaling pathway. *PLoS One* **6**, e26713 (2011).
484. Leiba, M. et al. Halofuginone inhibits multiple myeloma growth in vitro and in vivo and enhances cytotoxicity of conventional and novel agents. *Br. J. Haematol.* **157**, 718–731 (2012).
485. De Jonge, M. J. A. et al. Phase I and pharmacokinetic study of halofuginone, an oral quinazolinone derivative in patients with advanced solid tumours. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **42**, 1768–1774 (2006).
486. Pines, M. Targeting TGF β signaling to inhibit fibroblast activation as a therapy for fibrosis and cancer: effect of halofuginone. *Expert Opin. Drug Discov.* **3**, 11–20 (2008).
487. Pines, M. Halofuginone for fibrosis, regeneration and cancer in the gastrointestinal tract. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 14778–14786 (2014).
488. Sundrud, M. S. et al. Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response. *Science* **324**, 1334–1338 (2009).

489. Keller, T. L. *et al.* Halofuginone and other febrifugine derivatives inhibit prolyl-tRNA synthetase. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 311–317 (2012).
490. Son, J. *et al.* Conformational changes in human prolyl-tRNA synthetase upon binding of the substrates proline and ATP and the inhibitor halofuginone. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 2136–2145 (2013).
491. Ando, K. *et al.* Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma. *Cancers* **5**, 591–616 (2013).
492. Anninga, J. K. *et al.* Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 **47**, 2431–2445 (2011).
493. Patel, S. J. *et al.* Dose-intense ifosfamide/doxorubicin/cisplatin based chemotherapy for osteosarcoma in adults. *Am. J. Clin. Oncol.* **25**, 489–495 (2002).
494. Halvorson, K. G., Sevcik, M. A., Ghilardi, J. R., Rosol, T. J. & Mantyh, P. W. Similarities and differences in tumor growth, skeletal remodeling and pain in an osteolytic and osteoblastic model of bone cancer. *Clin. J. Pain* **22**, 587–600 (2006).
495. Guise, T. A. *et al.* Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J. Clin. Invest.* **98**, 1544–1549 (1996).
496. Grano, M. *et al.* Breast cancer cell line MDA-231 stimulates osteoclastogenesis and bone resorption in human osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 1097–1100 (2000).
497. Pines, M. & Nagler, A. Halofuginone: a novel antifibrotic therapy. *Gen. Pharmacol.* **30**, 445–450 (1998).
498. Koon, H. B. *et al.* Phase II AIDS Malignancy Consortium trial of topical halofuginone in AIDS-related Kaposi sarcoma. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 **56**, 64–68 (2011).
499. Jin, M. L., Park, S. Y., Kim, Y. H., Park, G. & Lee, S. J. Halofuginone induces the apoptosis of breast cancer cells and inhibits migration via downregulation of matrix metalloproteinase-9. *Int. J. Oncol.* **44**, 309–318 (2014).
500. Nagler, A. *et al.* Suppression of hepatocellular carcinoma growth in mice by the alkaloid coccidiostat halofuginone. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 **40**, 1397–1403 (2004).
501. Elkin, M. *et al.* Halofuginone: a potent inhibitor of critical steps in angiogenesis progression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **14**, 2477–2485 (2000).
502. Xavier, S. *et al.* Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone. *J. Biol. Chem.* **279**, 15167–15176 (2004).
503. Van Oosterwijk, J. G., Anninga, J. K., Gelderblom, H., Cleton-Jansen, A.-M. & Bovée, J. V. M. G. Update on targets and novel treatment options for high-grade osteosarcoma and chondrosarcoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **27**, 1021–1048 (2013).
504. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
505. Chirgwin, J. M. & Guise, T. A. Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **10**, 159–178 (2000).
506. Chirgwin, J. M., Mohammad, K. S. & Guise, T. A. Tumor-bone cellular interactions in skeletal metastases. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **4**, 308–318 (2004).

507. Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337–342 (2003).
508. Teicher, B. A. Transforming Growth Factor- β and the Immune Response to Malignant Disease. *Clin. Cancer Res.* **13**, 6247–6251 (2007).
509. Lippitz, B. E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* **14**, e218–e228 (2013).
510. Dalal, B. I., Keown, P. A. & Greenberg, A. H. Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor-beta 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. *Am. J. Pathol.* **143**, 381–389 (1993).
511. Tsushima, H. et al. High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression. *Gastroenterology* **110**, 375–382 (1996).
512. Rodeck, U., Nishiyama, T. & Mauviel, A. Independent regulation of growth and SMAD-mediated transcription by transforming growth factor beta in human melanoma cells. *Cancer Res.* **59**, 547–550 (1999).
513. Nagler, A. et al. Suppression of hepatocellular carcinoma growth in mice by the alkaloid coccidiostat halofuginone. *Eur. J. Cancer* **40**, 1397–1403 (2004).
514. Berking, C. et al. Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res.* **61**, 8306–8316 (2001).
515. McGaha, T. L. et al. Halofuginone inhibition of COL1A2 promoter activity via a c-Jun-dependent mechanism. *Arthritis Rheum.* **46**, 2748–2761 (2002).
516. Elkin, M. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression and bladder carcinoma metastasis by halofuginone. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **5**, 1982–1988 (1999).
517. Gross, D. J. et al. Treatment with halofuginone results in marked growth inhibition of a von Hippel-Lindau pheochromocytoma in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9**, 3788–3793 (2003).
518. Wendling, J., Marchand, A., Mauviel, A. & Verrecchia, F. 5-fluorouracil blocks transforming growth factor-beta-induced alpha 2 type I collagen gene (COL1A2) expression in human fibroblasts via c-Jun NH2-terminal kinase/activator protein-1 activation. *Mol. Pharmacol.* **64**, 707–713 (2003).
519. Tacheau, C., Michel, L., Farge, D., Mauviel, A. & Verrecchia, F. Involvement of ERK signaling in halofuginone-driven inhibition of fibroblast ability to contract collagen lattices. *Eur. J. Pharmacol.* **573**, 65–69 (2007).
520. Moriceau, G. et al. Therapeutic approach of primary bone tumours by bisphosphonates. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 2981–2987 (2010).
521. Yasui, T. et al. Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF- β through molecular interaction between Smad3 and Traf6. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 1447–1456 (2011).
522. Li, N. et al. Partial loss of Smad7 function impairs bone remodeling, osteogenesis and enhances osteoclastogenesis in mice. *Bone* **67**, 46–55 (2014).
523. Deselm, C. J., Zou, W. & Teitelbaum, S. L. Halofuginone prevents estrogen-deficient osteoporosis in mice. *J. Cell. Biochem.* **113**, 3086–3092 (2012).

524. Mohammad, K. S. *et al.* Pharmacologic inhibition of the TGF-beta type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone. *PLoS One* **4**, e5275 (2009).
525. Filvaroff, E. *et al.* Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Dev. Camb. Engl.* **126**, 4267–4279 (1999).
526. Balooch, G. *et al.* TGF-beta regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18813–18818 (2005).
527. Minn, A. J. *et al.* Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J. Clin. Invest.* **115**, 44–55 (2005).
528. Kirsch, M., Schackert, G. & Black, P. M. Metastasis and angiogenesis. *Cancer Treat. Res.* **117**, 285–304 (2004).
529. Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**, 52–67 (2010).
530. Gialeli, C., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* **278**, 16–27 (2011).
531. Lukanidin, E. & Sleeman, J. P. Building the niche: the role of the S100 proteins in metastatic growth. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 216–225 (2012).
532. Rudland, P. S. *et al.* Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res.* **60**, 1595–1603 (2000).
533. Maelandsmo, G. M., Flørenes, V. A., Nguyen, M. T. P., Flatmark, K. & Davidson, B. Different expression and clinical role of S100A4 in serous ovarian carcinoma at different anatomic sites. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **30**, 15–25 (2009).
534. Berge, G. *et al.* Osteopontin—an important downstream effector of S100A4-mediated invasion and metastasis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **129**, 780–790 (2011).
535. McAllister, S. S. *et al.* Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. *Cell* **133**, 994–1005 (2008).
536. Eichhorn, P. J. A. *et al.* USP15 stabilizes TGF- β receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF- β signaling in glioblastoma. *Nat. Med.* **18**, 429–435 (2012).

EVALUATION DU POTENTIEL ANTI-TUMORAL DES INHIBITEURS DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU TGF- β DANS L'OSTEOSARCOME

RESUME

L'ostéosarcome est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente chez les enfants et les adolescents pour qui le pronostic demeure mauvais, spécifiquement lorsque des métastases pulmonaires sont détectées au diagnostic. Etant donné l'implication du TGF-beta dans le développement métastatique de nombreux cancers et après avoir démontré que les concentrations de TGF-betas sont plus élevées dans les sérums de patients atteints d'ostéosarcome que chez les individus sains, nous avons exploré les effets de l'inhibition de cette voie de signalisation dans cette pathologie. Pour cela, nous avons développé une approche moléculaire utilisant la surexpression du Smad-inhibiteur naturel Smad7 et une approche pharmacologique utilisant un inhibiteur chimique du récepteur TBRI. La surexpression de Smad7 ralentit la croissance de la tumeur primitive en affectant le « cercle vicieux » établi entre les cellules tumorales et les cellules osseuses. Ces deux approches constituent la preuve de concept de l'intérêt du ciblage de la voie de signalisation du TGF-beta dans l'ostéosarcome, notamment en inhibant le développement des métastases pulmonaires. L'utilisation d'une troisième stratégie nous a permis de démontrer que l'halofuginone inhibe la croissance de la tumeur primitive principalement grâce à ses effets pro-apoptotiques et bloque le développement des métastases pulmonaires essentiellement par sa capacité à inhiber la voie du TGF-beta. Ces résultats démontrent que l'inhibition de la voie de signalisation TGF-beta/Smad pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse contre la progression tumorale et métastatique de l'ostéosarcome.

Mots clés : ostéosarcome, métastases, TGF- β , remodelage osseux, halofuginone, Smad7, SD-208

ANTICANCER ACTIVITY OF TGF- β SIGNALING PATHWAY INHIBITORS IN OSTEOSARCOMA

ABSTRACT

Osteosarcoma is the main malignant primary bone tumor in children and adolescents for whom the prognosis remains poor, especially when metastases are present at diagnosis. Because TGF-beta has been shown to promote metastases in many solid tumors and because we demonstrated that TGF-beta levels are higher in the serum of osteosarcoma patients compared to healthy volunteers, we investigated the effects of TGF-beta/Smad cascade inhibition on osteosarcoma behavior. To this end, two independent procedures, a molecular approach using the natural Smad-inhibitor Smad7 and a pharmacological approach with TGF-beta Receptor I inhibitor SD-208, were developed. We first demonstrated that Smad7 overexpression slows the growth of the primary tumor by affecting the "vicious cycle" established between tumor cells and bone cells. Moreover, we showed that these strategies inhibit the development of lung metastasis. In this context, we demonstrated that Smad7 and SD-208 reduce the capacity of osteosarcoma cells to migrate and invade. Then, we have investigated halofuginone, known as an inhibitor of TGF-beta cascade, on osteosarcoma metastatic progression. We demonstrated that halofuginone reduces primary tumor growth by its pro-apoptotic effects and the development of lung metastases mainly by blocking TGF-beta cascade. These results suggest that the inhibition of TGF-beta/Smad signaling pathway could be a promising therapeutic strategy against the tumor progression of osteosarcoma.

Key words : osteosarcoma, metastases, TGF- β , bone remodeling, halofuginone, Smad7, SD-208

Audrey LAMORA
INSERM UMR957 LPRO

Thèse de Doctorat

Audrey LAMORA

Evaluation du potentiel anti-tumoral des inhibiteurs de la voie de signalisation du TGF- β dans l'ostéosarcome

Blocking TGF- β signaling pathway inhibits the development of osteosarcoma

Résumé

L'ostéosarcome est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente chez les enfants et les adolescents pour qui le pronostic demeure mauvais, spécifiquement lorsque des métastases pulmonaires sont détectées au diagnostic. Etant donné l'implication du TGF- β dans le développement métastatique de nombreux cancers et après avoir démontré que les concentrations de TGF- β sont plus élevées dans les sérums de patients atteints d'ostéosarcome que chez les individus sains, nous avons exploré les effets de l'inhibition de cette voie de signalisation dans cette pathologie. Pour cela, nous avons développé une approche moléculaire utilisant la surexpression du Smad-inhibiteur naturel Smad7 et une approche pharmacologique utilisant un inhibiteur chimique du récepteur TBRI. La surexpression de Smad7 ralentit la croissance de la tumeur primitive en affectant le « cercle vicieux » établi entre les cellules tumorales et les cellules osseuses. Ces deux approches constituent la preuve de concept de l'intérêt du ciblage de la voie de signalisation du TGF- β dans l'ostéosarcome, notamment en inhibant le développement des métastases pulmonaires. L'utilisation d'une troisième stratégie nous a permis de démontrer que l'halofuginone inhibe la croissance de la tumeur primitive principalement grâce à ses effets pro-apoptotiques et bloque le développement des métastases pulmonaires essentiellement par sa capacité à inhiber la voie du TGF- β . Ces résultats démontrent que l'inhibition de la voie de signalisation TGF- β /Smad pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse contre la progression tumorale et métastatique de l'ostéosarcome.

Mots clés

Ostéosarcome, métastases, TGF- β , remodelage osseux, halofuginone, Smad7, SD-208

Abstract

Osteosarcoma is the main malignant primary bone tumor in children and adolescents for whom the prognosis remains poor, especially when metastases are present at diagnosis. Because TGF- β has been shown to promote metastases in many solid tumors and because we demonstrated that TGF- β levels are higher in the serum of osteosarcoma patients compared to healthy volunteers, we investigated the effects of TGF- β /Smad cascade inhibition on osteosarcoma behavior. To this end, two independent procedures, a molecular approach using the natural Smad-inhibitor Smad7 and a pharmacological approach with TGF- β Receptor I inhibitor SD-208, were developed. We first demonstrated that Smad7 overexpression slows the growth of the primary tumor by affecting the "vicious cycle" established between tumor cells and bone cells. Moreover, we showed that these strategies inhibit the development of lung metastasis. In this context, we demonstrated that Smad7 and SD-208 reduce the capacity of osteosarcoma cells to migrate and invade. Then, we have investigated halofuginone, known as an inhibitor of TGF- β cascade, on osteosarcoma metastatic progression. We demonstrated that halofuginone reduces primary tumor growth by its pro-apoptotic effects and the development of lung metastases mainly by blocking TGF- β cascade. These results suggest that the inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway could be a promising therapeutic strategy against the tumor progression of osteosarcoma.

Key Words

Osteosarcoma, metastases, TGF- β , bone remodeling, halofuginone, Smad7, SD-208