UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE

ÉCOLE DOCTORALE DE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2011

Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le sarcome d'Ewing par ciblage de prolifér ation tumorale et de la résorption osseuse

THÈSE DE DOCTORAT

Biologie – Médecine – Santé
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée
et soutenue publiquement par

Gaëlle PICARDA

Le 14 octobre 2011, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs	
Mme BERNARD Ghislaine	Maitre de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier, Nice
Mme ENTZ-WERLE Natacha	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Strasbourg
Examinateurs	
Mme ESCRIOU Virginie	Chargée de Recherche CNRS, Paris
M. TIRODE Franck	Chargé de Recherche INSERM, Paris
M. VALLETTE François	Directeur de Recherche INSERM, Nantes
Directrice de thèse	
Mme REDINI Françoise	Directrice de Recherche INSERM, Nantes

-REMERCIEMENTS-

Ce travail a été réalisé dans le :

Laboratoire de physiopathologie de la résorprtion osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives

INSERM UMR 957 – EA3822

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Françoise Rédini. Premièrement, pour m'avoir donné ma chance en tant qu'Ingénieur d'Etude mais surtout pour m'avoir donné l'envie et l'opportunité de réaliser cette thèse. Pour sa confiance, son encadrement, sa patience, sa gentillesse et pour avoir été la directrice de thèse idéale, un énorme MERCI !

Monsieur Dominique Heymann, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir donné la possibilité de réaliser cette thèse dans de si bonnes conditions.

Mesdames Ghislaine Bernard et Natacha Entz-Werle, pour avoir accepté de juger ce travail.

Messieurs Franck Tirode et François Vallette, pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et de mon jury de thèse.

Madame Virginie Escriou, pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse et pour son enrichissante collaboration.

Valérie Trichet, pour m'avoir encadrée sur une partie de mon projet. Pour m'avoir guidée dans le labyrinthe de la biologie moléculaire, pour tout ce que j'ai appris, pour sa disponibilité et ses conseils (ainsi que pour m'avoir fait ouvrir les yeux sur une certaine chanson de Noir Désir).

Julie R, pour ces années de complicité à la paillasse et en dehors. Pour avoir toujours été là quand j'en avais besoin, pour toutes les ballades à cheval et pour son amitié qui l'a même poussée à jouer les brebis avec moi.

François, pour m'avoir guidée lors de mes premiers pas dans le labo et pour ma super C2 !!!

Jérôme, (la bête vigoureuse), pour son aide précieuse, sa disponibilité, pour toutes nos discussions et pour m'avoir fait découvrir la pêche à la carpe par -20°C.

Franck, pour ses conseils, toutes ses qualités humaines et pour s'être fait un plaisir de m'aider à embèter Julie T.

Les « stagiaires », avec qui j'ai partagé tellement de bons moments : Damien, Cassie, Romain (numéro 2), Pierre A (numéro 3)… Un merci tout particulier à Etienne pour l'année passée à travailler ensemble dans la bonne humeur, pour nos rigolades et pour son amitié !

Les « internes », Ludo et Anne-Laure, pour tous les bons moments passés au labo et : Non Ludo, tu ne recolleras pas mon oreille.

Marion, pour sa joie de vivre et tout le soutien qu'elle a su m'apporter quand j'en ai eu besoin.

Soizic, pour son aide, sa gentillesse et toutes nos discussions.

Véronique, pour nos discussions, pour m'avoir conseillé d'aller voir Vin et pour nos petits repas au « clou ».

Annie, pour être toujours dispo pour nous aider et pour toutes les fournitures de bureau que je lui ai piquée.

Luis, pour être un voisin de bureau si agréable et pour toutes les petites patisseries de la Mie Caline partagées avec moi.

Véréna, pour m'avoir aidée à perfectionner mes présentations et pour avoir enrichi mon vocabulaire anglais courant (…).

Julie T, pour son enthousiasme à aller nettoyer la salle L2 et pour son sens de l'humour.

Carmen, pour les bons moments et pour m'avoir fait découvrir Grenade et Central Forme.

Régis, pour sa disponibilité et pour ses gâteaux et sucreries en tout genre.

Pascal Bigey, pour sa collaboration et son aide dans la réalisation des constructions plasmidiques et de l'électrotransfert.

Benoit Barteau, pour son aide dans les manips de transfert de gène.

Phillipe Ulain, pour son aide à l'acquisition en microscopie confocale.

Sylvanie Surget, pour notre collaboration sur le projet DR4 court.

Tous les membres du laboratoire, actuels et passés, pour leur aide et la bonne ambiance quotidienne : Gatien, Aurélie, Guillaume, Marc, Frédéric L, Séverine, Céline, Martine, Benjamin, Laurent, Sandra, Bénédicte, Bérengère, Emmanuelle, Frédéric B, Pierre G, Pierre L, Steven, Marco, Julie C, Audrey, Pui Pui, Perrine, Gwenola, Anne-Laure, David, Thomas, Sandrine, Gilles, Julien, Laurence, Yannick, Anne, Stéphane, Sandrine, Marie-Hélène, Nathalie. Ne changez rien!

Ma famille et en particulier mes parents, pour leur confiance et leur soutien dans les bons moments comme dans les autres (et pour la correction des fautes d'orthographe).

Et enfin, tous les gens importants pour moi (Eric, Emilie, Matthieu, Seb, Fred, Violaine, Erwan…), sur qui je peux toujours compter et sans qui ces années n'auraient pas été aussi belles.

-TABLE DES MATIERES-

INTRODUCTION GENERALE 1

I. Le tissu osseux 2
1) Organisation générale du tissu osseux 2
2) Organisation macroscopique du tissu osseux 4
a) Le périoste 4
b) L'os cortical 5
c) L'os trabéculaire 6
3) Organisation microscopique du tissu osseux 6
a) La matrice extracellulaire 6
b) Les ostéoblastes 7
c) Les ostéoclastes 12
4) Le remodelage osseux 13

II. Le sarcome d'Ewing : une tumeur osseuse primitive 17
1) Les tumeurs osseuses primitives 17
2) Le sarcome d'Ewing 17
a) Épidémiologie 17
b) Etiologie 18
c) Tableau clinique 21
d) Histologie 22
e) Les traitements actuels 23
f) Limites des traitements actuels 25

III. Nouvelles approches thérapeutiques du sarcome d'Ewing par nhibition du cercle vicieux entre prolifération tumorale et résorption osseuse 28
1) Le cercle vicieux 28
2) Traitements expérimentaux 29
3) Les modèles précliniques de Sarcome d'Ewing 33
4) Le transfert de gène 37
a) La membrane plasmique 37
b) Le transfert de gène viral 38
c) Le transfert de gène non viral 38

IV. Objectifs de la thèse 43

RESULTATS **45**

PARTIE I : **46**

I. **Introduction: utilisation de TRAIL dans le traitement des cancers** **47**
1) **TRAIL : structure et fonction** **47**
2) **Les récepteurs de TRAIL** **48**
3) **Les voies de signalisation apoptotiques de TRAIL : induction des voies extrinsèque et intrinsèque** **52**
4) **Les voies de signalisation non apoptotiques** **53**
5) **Utilisation de TRAIL dans la thérapie des cancers** **55**
a) Etudes précliniques 55
b) Essais cliniques 55

II. **Article 1** **57**

III. **Complément de la discussion de l'article 1** **58**

PARTIE II : **61**

I. **Introduction : les mécanismes de la résistance à TRAIL** **62**

II. **Article 2** **66**

III. **Complément de la discussion de l'article 2** **67**

PARTIE III : **74**

I. **Introduction** **75**
1) **La triade OPG/RANK/RANKL et voies thérapeutiques associées** **75**
a) RANKL 76
b) RANK 79
c) L'ostéoprotégérine (OPG) 81
d) Intérêt de l'inhibition de RANKL dans le traitement des tumeurs osseuses 84
2) **Autres cibles thérapeutiques impliquées dans le remodelage osseux** **85**
a) M-CSF 86
b) TNF-a : une voie alternative d'ostéoclastogénèse 87

II. **Matériels et méthodes** **88**

1) Expérimentation in vitro 88
a) Culture cellulaire 88
b) Autres expérimentations in vitro 91
2) Expérimentations in vivo 92
a) Plasmides utilisés 92
b) Modèles tumoraux murins 94
c) Approches thérapeutiques par transfert de gène *in vivo* 95
d) Suivi clinique et prélèvements 96
3) Immunohistochimie 98

III. Résultats 101
1) Validation de l'intérêt du ciblage de RANKL, M-CSF et TNF-a humains dans le sarcome d'Ewing 101
2) Approches thérapeutiques 106
a) Stratégie anti-hRANKL 106
b) Stratégie anti-TNF-a 114

IV. Discussion-perspectives 118

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 126

ANNEXES 133
Annexe 1 134
Annexe 2 135
Annexe 3 136

BIBLIOGRAHIE 137

-LISTE DES ABREVIATIONS-

ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
APAF : apoptotic peptidase activating factor
ATP : adénosine triphosphate
Bcl-2 : B-cell CELL/Lymphoma 2
BCL-XL : BCL-extra large
BAX : Bcl-2-associated X
BMP : bone morphogenetic proteins
c-FLIP : cellular FLICE-like inhibitory protein
CSM : cellules souches mésenchymateuses
DD : death domain
DISC : death-inducing signaling complex
DED : death effector domains
DR : Death Receptor
euro-EWING : EUROpean Ewing tumor working initative of nationnal groups
Erk2 : extracellular signal-regulated kinase 2
FADD : Fas-associated protein with death domain
FDCR-1: follicular dendritic cell receptor 1
FGF : fibroblast growth factor
GAGs : glycosaminoglycanes
GPI : glycophosphatidylInositol
IAP : Inhibitor of apoptosis protein
IGF : insulin-like growth factor
IGF-BP : insuline growth factor-binding protein
IKKγ **:** inhibitor of KB kinase γ
IL : InterLeukine
IM : Intramusculaire
IO : Intra-osseux
IRM : imagerie par résonnance magnétique
JNK : Jun-terminal kinase
KO : knock out
MAPK : mitogen-activated protein kinase
M-CSF : marcophage colony stimulating factor
MCL1 : myeloid cell leukemia sequence 1
MMP : matrix metalloprotéinase

NFKκB : nuclear factor κB

NK : natural killer

NSE : neural-specifique endolase

OSM : oncostatine M

OPG : ostéoprotegérine

PDGF : platelet derived growth factor

PI3K : phospholnositide 3-Kinase

PNET : peripheral neuro-ectodermal tumors

PPARγ2 : peroxisome proliferator-activated receptor γ 2

PTH : paratyroid hormone

RANK : activator of nuclear factor kappa B

RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa B ligand

RIP1: receptor interacting protein 1

SCID : severe combined immunodeficiency

Smac/DIABLO : second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor ofapoptosis-binding protein with low pI

TCE : TNF alpha converting enzyme

TGF-β : transforming growth factor β

TNF : tumor necrosis factor

TR-1: TNF receptor related molecule 1

TRADD : TNF-receptor associated death domain

TRAF-2 : TNF-receptor associated protein

TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand

TRAP : tartrate resistante acide phoshatase

VEGF : vascular endothelial growth factor

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis

-LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX-

Liste des figures :

Figure 1 : Organisation macroscopique d'un fémur 3

Figure 2 : Représentation schématique d'un os de type haversien 3

Figure 3 : Structure microscopique de l'os cortical..... 5

Figure 4 : Jonction entre l'os cortical et trabéculaire..... 6

Figure 5 : Voies de différenciation des CSM..... 8

Figure 6 : Les différents stades de la différenciation ostéoblastique..... 9

Figure 7 : Ostéoblastes tapissant la trame osseuse au microscope électronique à balayage..... 10

Figure 8 : Vue d'un ostéocyte emprisonné dans l'os compact au microscope électronique à balayage 11

Figure 9 : Vue d'un ostéoclaste résorbant la matrice osseuse au microscope électronique à balayage..... 12

Figure 10 : Les différentes étapes du remodelage osseux..... 14

Figure 11 : Principales localisations du sarcome d'Ewing..... 18

Figure 12 : Translocation chromosomique entre les chromosomes 11 et 22 à l'origine du sarcome d'Ewing..... 18

Figure 13 : Radiologie d'un patient présentant des lésions ostéolytiques et une réaction périostée consécutives à un sarcome d'Ewing..... 21

Figure 14 : Aspect histologique d'un sarcome d'Ewing extra-squelettique chez une jeune fille de 13 ans..... 22

Figure 15 : Protocole euro-EWING 99..... 24

Figure 16 : Le cercle vicieux entre prolifération tumorale et résorption osseuse..... 27

Figure 17 : Induction des modèles de sarcome d'Ewing par injection de cellules tumorales humaines..... 33

Figure 18 : Cliché de métastases pulmonaires..... 34

Figure 19 : Clichés radiographiques des lésions ostéolytiques associées à des tumeurs de 3000 mm^3..... 34

Figure 20 : Caractérisation de la tumeur A673 induite par injection intramusculaire..... 36

Figure 21 : La membrane plasmique semi-perméable..... 37

Figure 22 : Structure du complexe Lutrol® (copolymère à bloc amphiphile non ionique)/ADN (A) et visualisation de l'efficacité du transfert de gène par bioluminescence *in vivo* après injection du complexe Lutrol / plasmide codant la luciférase (50 µg) (B) 40

Figure 23 : Structure d'un Phosphonolipide cationique..... 41

Figure 24 : Différence de potentiel entre les couches interne et externe de la membrane plasmique..... 41

Figure 25 : Structure cristallographique de TRAIL..... 47

Figure 26 : Les récepteurs de TRAIL..... 49

Figure 27 : Mode d'action de DcR2..... 50

Figure 28 : Voie de signalisation de DR4 et 5 induite par TRAIL..... 52

Figure 29 : Les voies de signalisation non apoptotiques de TRAIL..... 54

Figure 30 : Les mécanismes de la résistance à TRAIL..... 62

Figure 31 : Structure des différents isoformes de c-FLIP..... 63

Figure 32 : Mécanismes d'inhibition de l'apoptose par les différents isoformes de c-FLIP..... 64

Figure 33 : Les différents points de régulation de la sensibilité à TRAIL dans sa voie de signalisation..... 67

Figure 34 : Expression relative de l'ARNm des récepteurs de TRAIL DR4, DR5, DcR1 et DcR2..... 68

Figure 35 : Comparaison des structures de a et bDR4..... 69

Figure 36 : Induction de l'apoptose par les anticorps agonistes de DR4 et DR5..... 71

Figure 37 : Rôle de la triade OPG / RANK / RANKL dans la différenciation ostéoclastique..... 75

Figure 38 : Structure des isoformes de RANKL chez l'Homme..... 76

Figure 39 : Données radiographiques de souris sauvages (A), surexprimant la cytokine pro-résorptive Rankl (B) ou inactivées pour le gène *Rankl* (C)..... 78

Figure 40 : Structure de RANK..... 79

Figure 41 : Clichés radiographiques des membres inférieurs de souris sauvages (A) et invalidées pour le gène Rank..... 80

Figure 42 : Clichés radiographiques d'une cage thoracique chez un individu sain et un patient atteint d'ostéopétrose caractérisée par une mutation dans le gène codant le récepteur RANK..... 80

Figure 43 : Structure de l'OPG..... 82

Figure 44 : Clichés radiographiques de souris naïves (A) et OPG -/- (B) âgées de 5 mois……..... 84

Figure 45 : Structure des OPG humaines complète (1-401) et tronquée (1-194)…… 92

Figure 46 : Cartes des plasmides pcDNA3.3-hOPG et pcDNA3.1…… 92

Figure 47 : Carte du plasmide pVAX2-hOPG……93

Figure 48 : Carte du plasmide pVAX2-hTNFR1…… .....……..93

Figure 49 : Protocole de transfert de gène utilisant le F68 (Lutrol®)…… ..... …95

Figure 50 : Photo d'un électrotransfert réalisé sur une souris Nude……96

Figure 51 : Dosages de M-CSF (A) et TNF-a (B) humains réalisés par test ELISA……101

Figure 52 : Dosages de M-CSF humain réalisés par test ELISA ..... …102

Figure 53 : Marquage immunohistofluorescent réalisé sur une coupe flottante de tumeur A673…… . ….103

Figure 54 : Marquage Immunohistofluorescent réalisé sur une coupe flottante de tumeur A673…… ……..104

Figure 55 : Protocole d'aministration de l'OPG…… ... …….106

Figure 56 : Validation de la surexpression de l'OPG humaine dans le sérum des souris…… ……107

Figure 57 : Evolution des volumes tumoraux et de la survie en fonction du temps…… ...107

Figure 58 : Etude des paramètres de la microarchitecture osseuse par analyse micro-scanner……..……108

Figure 59 : Dosages de l'OPG humaine par test ELISA…… .. …….109

Figure 60 : Comparaison de l'efficacité du transfert de gène avec le vecteur synthétique F68 et l'électrotransfert…… ……111

Figure 61 : Dosage de l'OPG humaine dans le sérum des souris ayant reçu les plasmides pVAX2 et pVAX2-hOPG…… ..... ……111

Figure 62 : Effets du TNF-a sur la viabilité des lignées de sarcome d'Ewing A673 et TC-71…… ... ……..111

Figure 63 : Effets du TNF-a sur la différenciation ostéoclasitque des précurseurs CD14+…… ……113

Figure 64 : Mesure de la production de TNF-R1 dans le sérum des souris ayant reçues le plasmide pVAX2-hTNF-R1 par électrotransfert…… ……115

Figure 65 : Evolution des volumes tumoraux et de la survie en fonction du temps post-injection……..……116

Figure 66 : Clichés radiographiques des tibias des souris traitées par le plasmide pVAX2-hTNFR1 et par le plasmide vide (pVAX2) comparativement à des souris contrôles naïves (CT sans tumeur)…… ……117

Figure 67 : Dosages de TRAIL humain par test ELISA…….... …120

Figure 68 : Comparaison de l'affinité de l'OPG pour RANKL et TRAIL……..... …..120

Figure 69 : Les effets protumoraux et antitumoraux potentiels du TNF-a dans le contexte du sarcome d'Ewing…….. …….124

Figure 70 : Stratégie combinatoire dans le sarcome d'Ewing…… ..... …125

Figure 71 : Développement d'un modèle syngénique de sarcome d'Ewing……..……128

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Principales translocations chromosomiques responsables du sarcome d'Ewing…… ……..19

Tableau 2 : Principales cibles du facteur de transcription EWS-FLI1…… .....……19

Tableau 3 : Les différentes méthodes de transfert de gène non viral…… ..... ……..39

Tableau 4 : Caractéristiques des différentes lignées cellulaires de sarcome d'Ewing utilisées.....89

INTRODUCTION GENERALE

I. Le tissu osseux

1) Organisation générale du tissu osseux

Le squelette est un tissu conjonctif hautement spécialisé composé par une fraction minérale et une fraction organique. D'origine mésenchymateuse, il est constitué d'une matrice extracellulaire spécifique lui conférant ses caractéristiques de rigidité et d'élasticité. Malgré son apparente rigidité, que ce soit dans l'os compact ou trabéculaire, le tissu osseux est perpétuellement remanié durant un processus appelé remodelage osseux et constitué d'une succession de phases de destruction et de formation. Ce phénomène est assuré par des cellules spécialisées présentes au niveau du squelette. Ainsi, la matrice osseuse est continuellement produite par les ostéoblastes, modifiée par les ostéocytes et détruite par les ostéoclastes. Grace à cela, l'os est capable de s'autoréparer, de conserver ses propriétés biomécaniques et de s'adapter aux contraintes mécaniques auxquelles il est soumis. L'os rempli différentes fonctions au sein de l'organisme, et notamment des fonctions mécaniques, métaboliques et hématopoïétiques.

Tout d'abord, sur le plan mécanique, le tissu osseux représente une véritable « charpente » de l'organisme. Il est le support mécanique essentiel du squelette, permet la locomotion, transmet les forces issues de la contraction musculaire d'une partie du corps à une autre pendant le mouvement et assure la protection des organes internes. Ainsi, la boîte crânienne protège l'encéphale ; la cage thoracique, le cœur et les poumons et le rachis, la moelle épinière.

Sur le plan métabolique, il permet le maintien de l'homéostasie phopshocalcique, minérale et cellulaire. Renfermant 99% du calcium et 90% du phosphore de l'organisme, il est ainsi le principal réservoir des éléments minéraux et contribue à la régulation de la composition des fluides extracellulaires via le calcium ionisé.

Enfin, il possède un rôle hématopoïétique au niveau des espaces médullaires où se situe la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse.

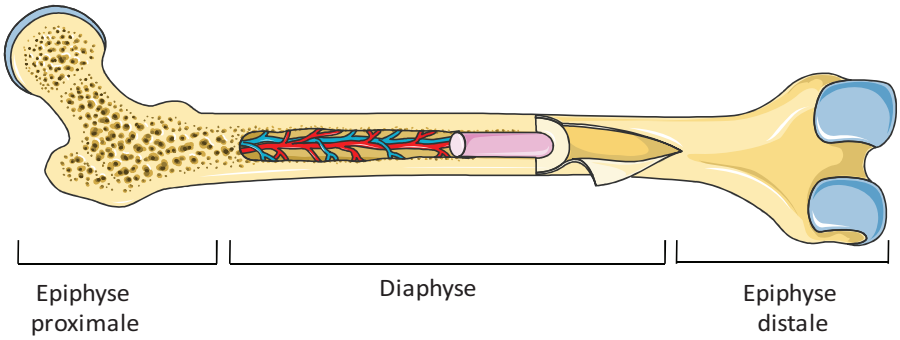


Figure 1 : Organisation macroscopique d'un fémur.

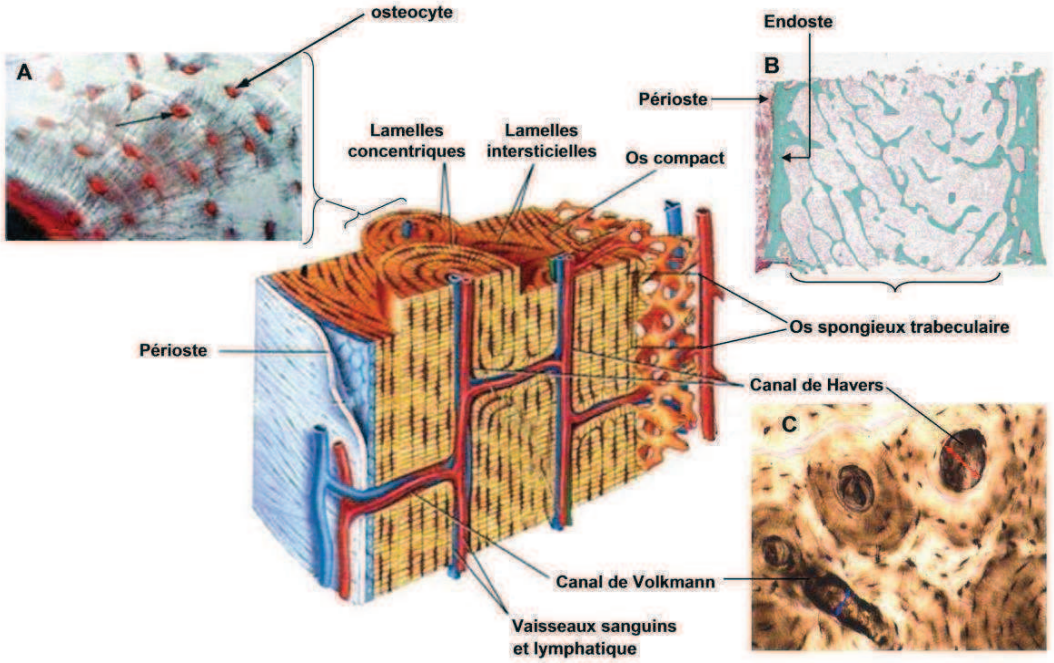


Figure 2 : Représentation schématique d'un os de type haversien [D'après Marieb,[1]]. Coloration d'ostéocytes piégés dans des lacunes appelées ostéoplastes positionées dans les différentes lamelles concentriques d'un ostéon (A). Réseau trabéculaire tendu entre de l'os cortical composé d'os compact (B). Chaque os cortical est limité sur sa face interne d'endoste et sur face externe de périoste. Coloration au trichrome de Goldner. C : canal de Havers et canal de Volkmann vus en coupe longitudinale (Laboratoire de Physiopathologie de la résorption osseuse, INSERM UMR-S 957).

2) Organisation macroscopique du tissu osseux

Le squelette humain est constitué de 206 os, le plus long est le fémur (50 cm pour un homme de 1m80) et le plus petit, l'étrier (2,6 à 3,4 mm), situé dans l'oreille interne. Anatomiquement, 3 types d'os peuvent être décrits :

- Les os longs, tels que l'humérus, le fémur ou le tibia
- Les os courts, tels que les vertèbres ou les phalanges
- Les os plats, tels que le sternum ou les os pariétaux.

Chez l'adulte, les os longs sont constitués d'une partie centrale cylindrique appelée diaphyse, et de deux extrémités élargies et arrondies appelées épiphyses, couvertes de cartilage articulaire. Des régions de développement coniques, appelées métaphyses, connectent la diaphyse à chaque épiphyse (Figure1).

Dans un os long en croissance, épiphyse et métaphyse sont séparées par une couche de cartilage appelée plaque de croissance. La nature architecturale du tissu osseux leur confère la capacité de résister aux forces de tension, de traction et de cisaillement. Macroscopiquement, on distingue ainsi l'os cortical ou compact et l'os trabéculaire ou spongieux, ceux-ci étant entourés d'une membrane fibreuse externe richement vascularisée, le périoste (sauf pour le cartilage articulaire, Figure2).

a) Le périoste

Le périoste permet l'insertion des tendons et des ligaments et grâce aux vaisseaux sanguins qu'il contient dans sa couche superficielle fibreuse, il assure l'apport des nutriments essentiels à la réparation de l'os. Il est aussi essentiel dans la croissance en longueur et circonférentielle de l'os en raison de la présence de cellules souches et préostéoblastes dans sa couche profonde.

La classification en os cortical ou spongieux dépend du degré de porosité :

- 5 à 30 % pour l'os cortical
- 30 à 90 % pour l'os trabéculaire

b) L'os cortical

L'os cortical qui se situe sous le périoste constitue la paroi compacte de la diaphyse des os long (Figure 3).

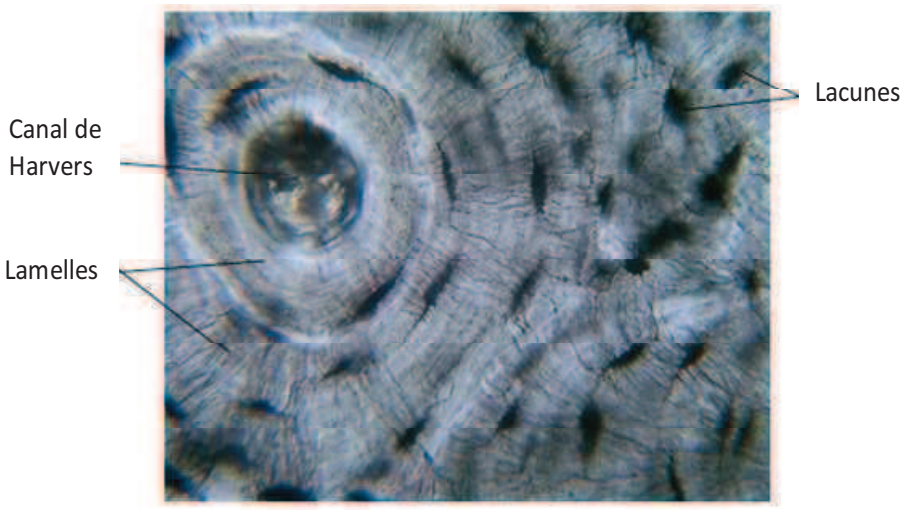


Figure 3 : Structure microscopique de l'os cortical.
(D'après le site internet : https://pages.usherbrooke.ca/htl302-pc/histo/conj/os/durb.htm)

Il représente 80-85 % du tissu osseux et est composé de la juxtaposition d'ostéons cylindriques de 200 à 300 µm de diamètre, parallèles à l'axe longitudinal de la corticale de l'os. Chaque ostéon représente l'unité structurale de l'os et est constitué de 20 à 30 lamelles concentriques de fibres de collagène disposées autour d'un canal central large de 40 à 50 µm, le canal de Harvers. Ce canal permet le passage des vaisseaux et des fibres nerveuses amyéliniques mais aussi la connexion intercellulaire. Largement ouvert dans les ostéons primaires, il est délimité par des cellules ostéoprogénitrices et des ostéoblastes. Ces cellules assurent le comblement du canal durant la maturation des ostéons, et se retrouvent emmurées dans la matrice extracellulaire lors de la maturation des ostéons dans une logette appelée ostéoplaste et deviennent alors des ostéocytes. Les canaux de Harvers sont reliés entre eux par les canaux transversaux de Volkman assurant l'homéostasie phosphocalcique mais aussi la communication entre le périoste et la moelle osseuse.

c) L'os trabéculaire

Egalement appelé os spongieux, il constitue la partie la plus interne de la paroi osseuse et ne représente que 20 % du squelette adulte (Figure 4). Il est constitué d'un réseau de travées osseuses composées de plaques de tissu minéralisé reliées entre elles par des arches. Au sein de ces travées est retrouvé du tissu adipeux ou hématopoïétique richement vascularisé. La moelle hématopoïétique représente 75% de l'os spongieux et est à l'origine des progéniteurs des différentes lignées sanguines (hématies, plaquettes, lymphocytes, macrophages, ostéoclastes…)

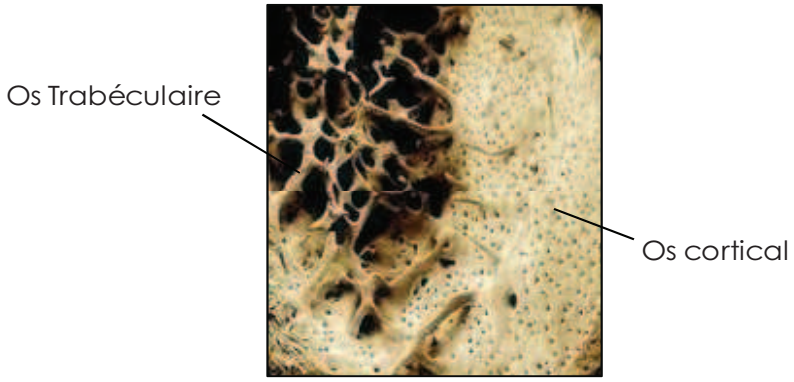


Figure 4 : Jonction entre l'os cortical et trabéculaire.
(D'après le site internet : www.visualsunlimited.com)

3) Organisation microscopique du tissu osseux

Le tissu osseux est constitué de cellules (ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes) et d'une matrice extracellulaire occupant environ 95 % du volume tissulaire qui lui confère ses propriétés de rigidité et d'élasticité.

a) La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire osseuse est constituée de deux fractions, une fraction organique et une fraction minérale. Sa teneur en eau, environ 9 % est très variable selon l'âge et le degré de minéralisation.

La fraction organique du tissu osseux représente environ 30 % de l'os sec. Elle est composée principalement de fibres de collagène de type I (90 % de la phase organique) arrangées dans le tissu osseux lamellaire de manière parallèle au sein des lamelles osseuses. Plus de deux cents protéines autres que les collagènes sont

répertoriées au sein de la matrice organique du tissu osseux et sont pour la plupart (75 %) synthétisées par les cellules osseuses elles-mêmes. Parmi ces protéines, se trouvent des protéines de structure comme la fibronectine qui forment avec le collagène de type I la substance fibrillaire. Cette dernière est entourée par la substance interfibrillaire (10 % de la phase organique), également appelée substance non-collagénique. La substance interfibrillaire est composée de constituants variés tels que des glycoprotéines (ostéopontine, sialoprotéine osseuse), des protéines contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé (ostéocalcine), des phosphoprotéines, des phospholipides, des protéoglycanes, des cytokines et des facteurs de croissance. L'ostéocalcine qui est la plus abondante des protéines non collagéniques (10 à 20 %) est spécifique de la matrice extracellulaire du tissu osseux. Elle jouerait un rôle dans l'attraction des ostéoclastes dans les foyers de résorption et dans le processus de minéralisation. Des facteurs de croissance et des cytokines [Transforming Growth Factor β (TGF-β), Insulin-like Growth Factor (IGF), tumor necrosis factor (TNF), les interleukines et les Bone Morphogenetic Proteins (BMP)] sont également présents en petite quantité dans la matrice osseuse. Ces facteurs protéiques jouent un rôle important dans l'activation et la différenciation cellulaire et interviennent dans le couplage entre formation et résorption osseuse.

La phase minérale de la matrice osseuse (70 % du tissu osseux) confère à l'os sa rigidité et sa résistance mécanique et représente une importante réserve minérale. En effet, environ 99 % du calcium de l'organisme, 85 % du phosphore et entre 40 et 60 % du sodium et du magnésium sont incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse [2]. Elle est essentiellement composée de phosphate de calcium cristallisé sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ($Ca_4(PO_4)_6(OH)_2$) qui ont une forme hexagonale, aplatie et sont disposés dans les espaces interfibrillaires. Leur nombre et leur taille s'accroissent lentement au cours du processus de minéralisation secondaire succédant à la minéralisation primaire qui elle-même suit immédiatement la synthèse de matrice par les ostéoblastes.

b) Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les principales cellules productrices de substance ostéoïde. D'origine mésodermique, les progéniteurs ostéoblastiques sont des Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) ou stromales [3]. On retrouve ces précurseurs chez l'adulte, essentiellement dans le périoste et le stroma de la moëlle osseuse mais aussi sous forme extrasquelettique et/ou circulante [4]. Sous le contrôle de différents facteurs de transcription, ces cellules souches pluripotentes sont capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, myoblastes et adipocytes [3](Figure 5).

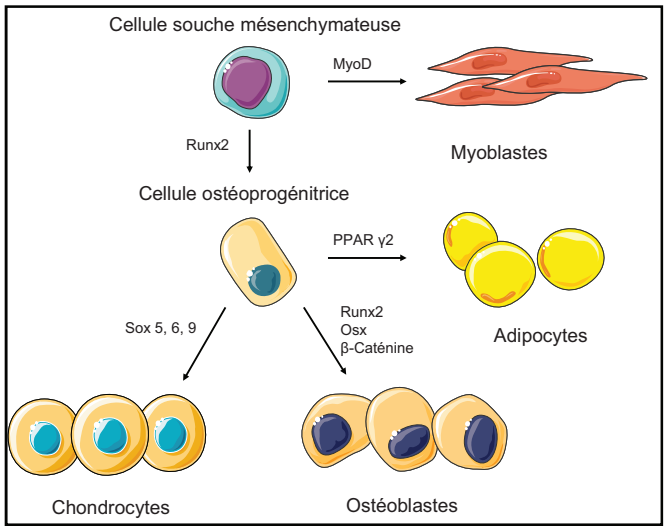


Figure 5 : Voies de différenciation des CSM. [Adapté de Marie *et al*., [5]]

Ainsi, l'expression du facteur Sox-9 induit la différenciation vers la voie chondroblastique, celle de Myo-D, vers la voie myoblastique et celle de Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ 2 (PPARγ2), vers la voie adipocytaire [6].

La différenciation des CSM en ostéoblastes matures implique quant à elle, une série complexe d'étapes de prolifération et de différenciation faisant intervenir le facteur de transcription cbfa1 / Runx2. Au niveau nucléaire, la différenciation des ostéoblastes est sous le contrôle de nombreux facteurs de transcription. Parmi ceux-ci, l'importance du complexe AP-1 (constitué d'homo- ou hétérodimères de facteurs de transcription de la famille Jun/Fos) dans le développement du tissu osseux a été mise en évidence chez des souris surexprimant c-Fos, caractérisées par l'apparition de chondrosarcomes et d'ostéosarcomes [7][8]. A l'inverse, les souris Fos -/- présentent un retard de croissance, une ostéopétrose, des défauts de remodelage osseux et une hématopoïèse altérée [9]. L'activité du complexe AP-1, très intense dans les ostéoblastes proliférants est fortement diminuée lors de la différenciation terminale en ostéocytes [10]. Ainsi, alors que toutes les protéines Fos et Jun sont très fortement exprimées dans les cellules précurseurs, seuls les facteurs de transcription Fra-2 et junD composent le complexe AP-1 dans les ostéoblastes matures [10]. De même, RunX2 (également appelé Cbfa1 ou AML3) est un facteur de transcription essentiel à la différenciation ostéoblastique. Il permet l'activation de nombreux gènes exprimés par les ostéoblastes matures. Ce facteur se lie à un site consensus présent dans le promoteur de nombreux gènes dont la chaine a1 du collagène de type I, la sialoprotéine osseuse, l'ostéocalcine et l'ostéopontine. Runx2 est nécessaire à l'ostéoformation *in vivo* et au maintien de la fonction ostéoblastique lors de la croissance. Son rôle essentiel a été démontré chez la souris par son extinction génique

entraînant une absence totale d'ostéoblastes et donc d'ostéoformation : les maquettes des os sont présentes et de forme normale mais ne sont constituées que de cartilage [11]. Un facteur de transcription appelé Ostérix a été également identifié comme étant impliqué dans la différenciation ostéoblastique et donc dans la formation osseuse [12]. Ostérix intervient en aval de runx2 et permet la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures fonctionnels. Sa surexpression dans les cellules souches embryonnaires murines est suffisante pour orienter leur différenciation vers la lignée ostéoblastique *in vitro*[13].

Plusieurs stades peuvent être définis durant la différenciation ostéoblastique (Figure 6) :

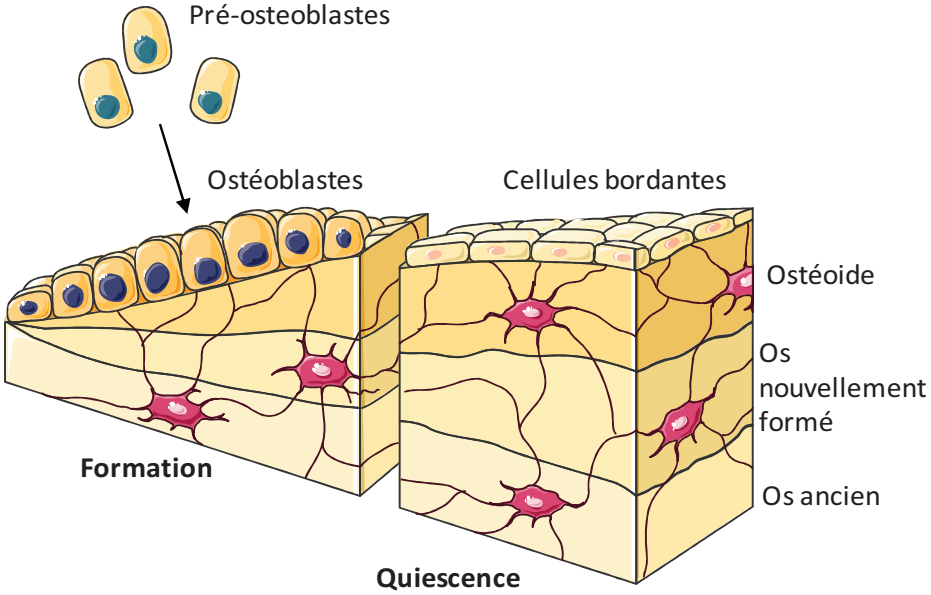


Figure 6 : Les différents stades de la différenciation ostéoblastique.

Les pré-ostéoblastes sont des précurseurs déjà engagés dans la voie ostéoblastique. Ils sont généralement situés près des surfaces de formation osseuse où les ostéoblastes actifs produisent l'os. Ces cellules allongées ont la capacité de se diviser mais ne synthétisent pas de matrice osseuse. Elles produisent néanmoins les précurseurs des molécules de collagène de type I et expriment quelques marqueurs précoces du tissu osseux tels que la phosphatase alcaline ou l'ostéonectine.

Les ostéoblastes matures sont des cellules mononucléées de forme cuboïdale de 20 µm de diamètre, disposées en couches monocellulaires sur la surface osseuse (Figure 7). Caractérisé par une activité phosphatase alcaline importante, l'ostéoblaste est limité par une membrane plasmique classique polarisée. Ainsi, la membrane plasmique adjacente à la matrice osseuse en développement est constituée de nombreux

prolongements cytoplasmiques pouvant s'étendre profondément entre les fibrilles de collagène de l'ostéoïde. La portion opposée de la membrane plasmique n'est elle composée que de peu d'expansions. Les ostéoblastes possèdent une double fonction : synthétiser la matrice osseuse et participer à l'activation des ostéoclastes. Ainsi, les ostéoblastes synthétisent les protéines constituant la matrice organique composée de collagène de type I et de protéines non collagéniques (ostéocalcine, protéoglycanes…) qui constituent la substance ostéoide.

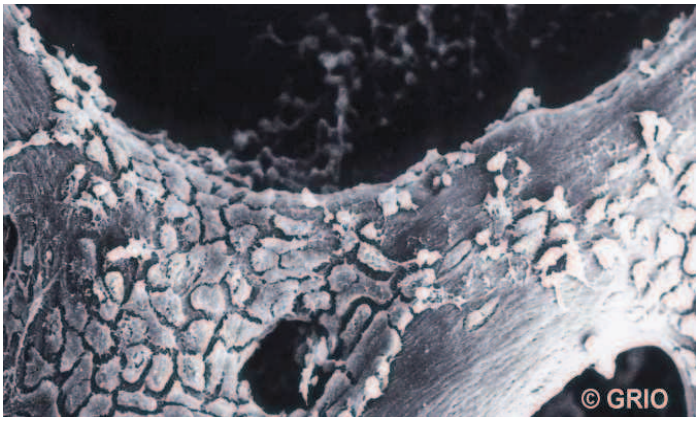


Figure 7 : Ostéoblastes tapissant la trame osseuse au microscope électronique à balayage. (D'après le site internet : www.grio.org/iconographie-os.php)

Du fait de leur activité de synthèse élevée, de nombreux organites se trouvent à la partie apicale du cytoplasme, tels que des mitochondries, l'appareil de Golgi et un ergastoplasme rugueux très développé. De plus, le cytoplasme renferme des vésicules de calcium qui vont permettre la minéralisation de la matrice préalablement synthétisée (chez l'homme, en moyenne 10-20 jours après la déposition de la matrice). La régulation de la formation osseuse fait intervenir l'hormone paratiroïdienne (Parathyroid Hormone, PTH) et les hormones sexuelles. A l'issue de la période de formation osseuse, les glucocorticoïdes en excès induisent l'apoptose de la majorité des ostéoblastes (65 %), dans le cas contraire les ostéoblastes peuvent devenir des cellules bordantes (ostéoblastes à l'état de repos) ou subir une différenciation terminale en ostéocytes, emprisonnés dans la matrice osseuse.

Les cellules bordantes sont des ostéblastes aplatis avec une activité métabolique très limitée, caractérisés par peu de mitochondries et un réticulum endoplasmique réduit. Ces cellules forment une couche cellulaire alignée le long de surfaces osseuses dites inactives qui représentent 85 % des surfaces osseuses et seul les 15 % restant sont recouvertes d'ostéoblastes actifs. Ces cellules sans activité de synthèse ont pour principale fonction d'assurer la communication entre la surface osseuse,

l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse. De plus, les cellules bordantes sont sous l'influence de stimuli et sont capables de se redifférencier en ostéoblastes actifs et/ou de jouer également un rôle durant la phase initiale du remodelage osseux. Sous l'effet de certains signaux, elles libèrent la surface osseuse permettant ainsi l'attraction et l'ancrage des ostéoclastes [14].

Les ostéocytes sont le résultat de la différenciation terminale de certains ostéoblastes emmurés dans la matrice osseuse, à l'intérieur de lacunes périostéocytaires appelées ostéoplastes (Figure 8). Dix à 20 % des ostéoblastes deviennent des ostéocytes soit 25000 par mm^3 de tissu osseux.

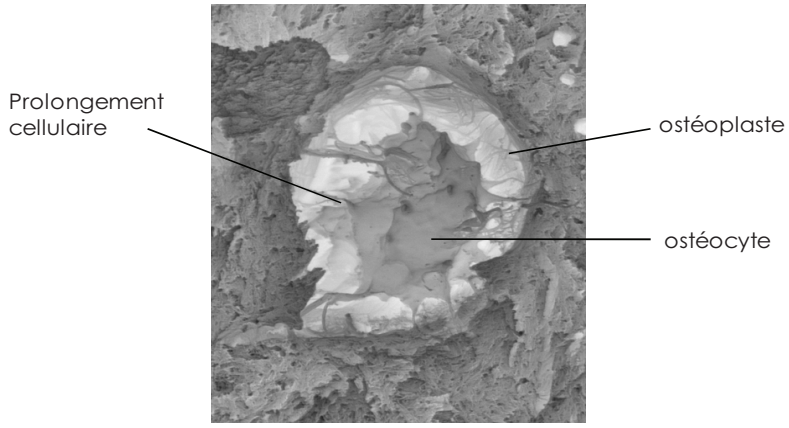


Figure 8 : Vue d'un ostéocyte emprisonné dans l'os compact au microscope électronique à balayage (x2000). (D'après le site internet : http://visualsunlimited.photoshelter.com/image/I00007hafbAEKg.U)

Au cours de leur différenciation, les ostéocytes perdent une grande partie de leurs organites et développent de longs et fins prolongements cytoplasmiques permettant l'établissement de contacts avec les autres ostéocytes et avec les cellules bordantes. Les substances nutritives du sang atteignent les ostéocytes en diffusant dans les canalicules autour des prolongements cytoplasmiques, soit dans les cellules elles-mêmes, soit en passant de l'une à l'autre par des jonctions communicantes (GAP). Les ostéocytes interviennent essentiellement dans la transmission des signaux mécano-sensoriels et dans les échanges entre les cellules et l'environnement [15]. Ils jouent ainsi un rôle dans les échanges calciques entre le tissu osseux et le sang. Ils régulent par ailleurs la formation osseuse *via* la sécrétion de sclérostine qui constitue un marqueur spécifique des ostéocytes [16].

c) Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont issus de la fusion de cellules dérivées de précurseurs de la lignée myélomonocytaire communs aussi aux cellules dendritiques et aux monocytes / macrophages. Ces précurseurs se différencient en ostéoclastes sous l'influence de facteurs synthétisés et sécrétés par les cellules stromales de la moelle osseuse ou par les ostéoblastes mais également par des contacts directs entre ces différents types cellulaires [17]. Ainsi, le marcophage colony stimulating factor (M-CSF) en se liant à son récepteur c-fms à la surface des précurseurs monocytaires stimule leur prolifération et leur survie. De même, le Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand (RANKL), exprimé à la membrane des cellules stromales ou libéré sous forme soluble, se lie à son récepteur Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B (RANK), présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques mononucléés et induit leur fusion pour former des ostéoclastes matures multinucléés.

Les ostéoclastes matures sont des cellules géantes composées de 4 à 20 noyaux regroupés au centre de la cellule et dont le diamètre varie de 10 à 100 µm (Figure 9).

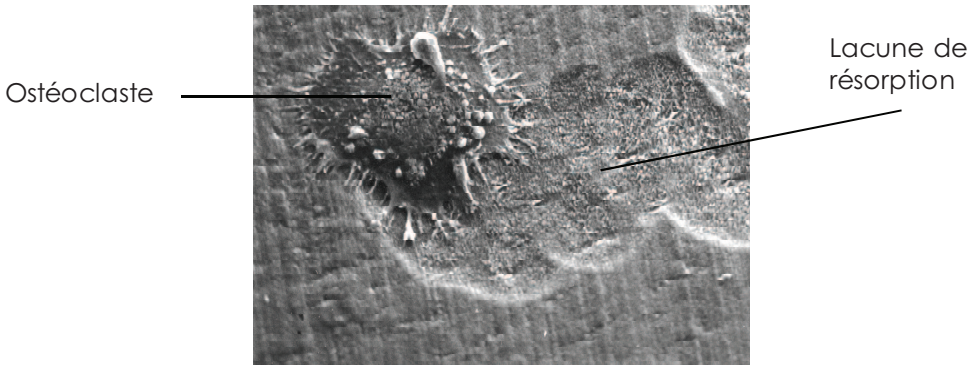


Figure 9 : Vue d'un ostéoclaste résorbant la matrice osseuse au microscope électronique à balayage. (D'après le site internet : http://www.atpbone.org/)

Ces cellules possèdent un appareil de Golgi très développé autour de chaque noyau et de nombreuses mitochondries périnucléaires. Seules cellules responsables de la résorption osseuse, les ostéoclastes possèdent une grande quantité de vésicules lysosomales riches en enzymes lysosomales telles que la phoshatase acide résistante au tartrate (TRAP), la cathepsine K, des collagènases et des métalloprotéases telles que la MMP-9. Elles sont polarisées, les noyaux se trouvant à l'opposé de la surface osseuse tandis que la zone au contact de la matrice osseuse développe des replis membranaires

appelés bordure en brosse. L'ostéoclaste peut être observé au fond des lacunes de résorption appelées lacunes de Howship au contact de la matrice osseuse calcifiée (Figure 9). La phase de résorption débute par l'adhérence de l'ostéoclaste sur la travée osseuse via l'interaction entre des protéines de la matrice osseuse (notamment la vitronectine) et des intégrines de la membrane ostéoclastique (notamment $a_1\beta_1$ et $a_v\beta_3$) avec constitution d'une « poche » hermétique entre la membrane plasmique et l'os. L'ostéoclaste relargue ensuite des ions H^+ grâce à des pompes à protons qui acidifient le milieu. Il s'ensuit une dissolution de la phase minérale du tissu osseux, suivie d'une phase de digestion de la matrice collagénique sous l'effet d'enzymes lysosomiales libérées par exocytose.

4) Le remodelage osseux

Tout au long de la vie, pour répondre à ses différentes fonctions, l'os est le siège d'un remaniement permanent. Ainsi, 5 % des surfaces intracorticales et 20 % des surfaces trabéculaires sont le siège d'un remodelage osseux dont la durée moyenne est de 4 à 6 mois. Ce processus permet ainsi au tissu osseux de s'adapter aux différentes contraintes mécaniques auxquelles il est soumis, d'assurer l'homéostasie minérale (du calcium et du phosphore) et d'assurer la cicatrisation des fractures. Le remodelage osseux se déroule selon une séquence précise d'événements résultant de l'activité de plusieurs types cellulaires. Sur un même site osseux, le remodelage est divisé en 4 grandes étapes et débute par l'activation des ostéoclastes qui vont résorber la matrice osseuse puis par une phase de transition qui aboutit au recrutement et à l'activation des ostéoblastes, s'ensuit une phase de réversion et enfin une phase de formation osseuse (Figure 10).

Phase d'activation : Le remodelage osseux débute en un point d'une surface osseuse quiescente recouvert de cellules bordantes. Ces cellules seraient capables de recevoir un signal de nature mécanique (altération de l'architecture locale de l'os : fracture, prise de poids…)[18] ou hormonal (comme c'est le cas dans l'ostéoporose où une diminution du taux d'oestrogènes entraîne une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes)[19]. Ce signal induirait la dégradation de la fine couche de matrice non minéralisée située sous les cellules bordantes, exposant ainsi la matrice minéralisée à l'action des ostéoclastes. Les cellules bordantes ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se multiplier ou se différencier à nouveau en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires. Lors de la phase d'activation, sous l'action des facteurs ostéorésorbants (PTH, vitamine D3 et prostaglandine E2…), les ostéoblastes se rétractent et laissent la place aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui peuvent adhérer à la matrice.

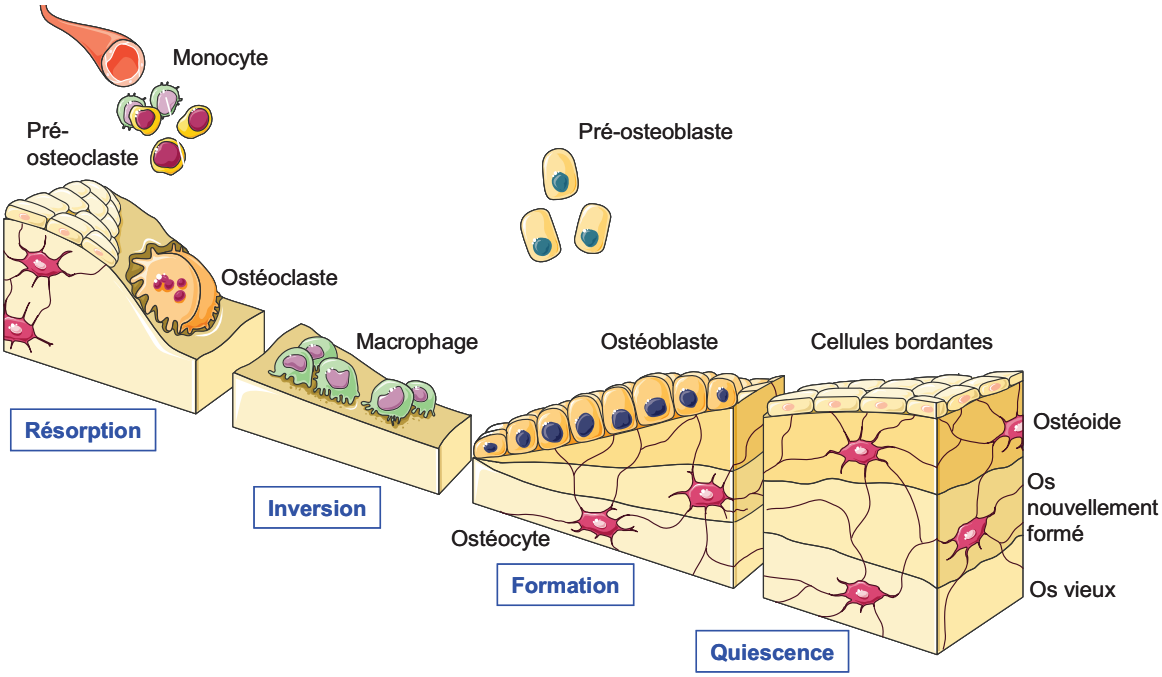


Figure 10 : Les différentes étapes du remodelage osseux. Divers stimuli recrutent les préostéoclastes sur une surface osseuse qui devient le siège d'une résorption ostéoclastique. Dans la lacune formée, des ostéoblastes viennent déposer la matrice collagénique qui se minéralise dans un second temps [Adapté de la publication de Lerner [20]].

Phase de résorption : Cette phase d'environ 30 jours débute par l'activation des précurseurs ostéoclastiques présents dans la moelle osseuse, au niveau du site de remodelage, et conduit à leur différenciation en ostéoclastes matures et à leur attachement à la surface osseuse. Les cellules stromales de la lignée ostéoblastique situées à proximité des pré-ostéoclastes vont favoriser la différenciation de ceux-ci en ostéoclastes matures via la production de différentes cytokines. Parmi ces cytokines, l'interleukine 6 (IL-6) et le M-CSF et RANKL vont favoriser la résorption osseuse. RANKL est ainsi la principale cytokine induisant l'ostéoclastogenèse en se fixant à son récepteur RANK présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques. Une fois attaché à la matrice osseuse, l'ostéoclaste mature va procéder à la dégradation de cette dernière.

Phase de réversion : Le couplage entre résorption et formation intervient durant la phase de réversion. La dégradation de la matrice entraîne une augmentation du taux de calcium intracellulaire dans les ostéoclastes qui va provoquer une désorganisation des podosomes et par conséquent le détachement de l'ostéoclaste. Les ostéoclastes qui se détachent de la surface osseuse meurent par apoptose vraisemblablement médiée par le système Fas/Fas ligand [21]. Ces ostéoclastes sont alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune. Il a été suggéré que les facteurs favorisant la formation osseuse sont intégrés dans la matrice osseuse puis relargués durant la phase de résorption. Cela concernerait en particulier les IGF, le Fibroblast Growth factor (FGF), le TGF-β, les BMP et le Platelet Derived Growth Factor (PDGF)[22]. La surface osseuse ainsi libérée par les ostéoclastes et correspondant au fond de la lacune de Howship est riche en éléments tels que l'ostéopontine qui activeraient les ostéoblastes. Les ostéoclastes pourraient également recruter directement les précurseurs ostéoblastiques au site de remodelage osseux grâce à S1P et BMP6 puis stimuler la formation osseuse en activant la voie Wnt/BMP [23].

Phase de formation : Cette phase de formation d'un nouveau tissu osseux se déroule en deux temps, au cours desquels les ostéoblastes jouent un rôle majeur. Elle débute par la prolifération des cellules ostéoprogénitrices qui vont venir tapisser le fond de la lacune de Howship, au niveau de la ligne cémentante. Les ostéoblastes vont alors synthétiser les constituants de la matrice organique osseuse. La production de cette matrice peut être stimulée par des hormones (oestrogènes, androgènes, vitamine D,…) ou par des facteurs de croissance sécrétés par les ostéoblastes (TGFβ, IGF, BMP…). A l'inverse, l'IL-1 et TNF-a sont capables d'inhiber la production de matrice osseuse par les ostéoblastes. Après un délai de 10 à 15 jours, la minéralisation débute à la jonction entre le tissu ostéoïde et le tissu minéralisé existant. Le tissu ostéoïde se minéralise ainsi par l'apposition de cristaux d'hydroxyapatite dans les espaces interfibrillaires du collagène.

Cette étape de minéralisation comporte une phase rapide appelée minéralisation primaire puis se poursuit plus lentement pendant une durée variable appelée minéralisation secondaire. La durée de la minéralisation secondaire est liée à la fréquence du remodelage. La phase d'ostéoformation dure de 4 à 5 mois.

Phase de quiescence : Une fois la phase de formation terminée, alors que certains ostéoblastes meurent par apoptose ou sont emmurés dans la matrice osseuse et deviennent des ostéocytes, d'autres sont convertis en cellules bordantes qui vont recouvrir la surface osseuse et demeurer quiescentes jusqu'à une prochaine activation locale des ostéoclastes.

II. Le sarcome d'Ewing : une tumeur osseuse primitive

1) Les tumeurs osseuses primitives

Les tumeurs osseuses primitives sont des pathologies rares qui peuvent être divisées en deux catégories : les tumeurs osseuses primitives bénignes et les tumeurs osseuses primitives malignes. Les tumeurs osseuses primitives malignes représentent moins de 1% des cancers et environ 10% de l'ensemble des tumeurs de l'enfant et de l'adulte jeune. Cependant, un deuxième pic d'incidence se situe vers 60 ans avec des tumeurs osseuses primitives qui surviennent à la suite de pathologies du remodelage osseux telles que la maladie de Paget. L'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing sont les deux tumeurs osseuses primitives malignes les plus fréquentes chez l'enfant et l'adulte jeune, représentant environ 90% des tumeurs osseuses primitives

2) Le sarcome d'Ewing

a) Épidémiologie

Décrit en 1921 par James Ewing, le sarcome d'Ewing est une tumeur d'origine neuroectodermique de la famille des Peripheral Neuro Ectodermal Tumors (PNET, Annexe 1). Son origine n'est pas encore clairement établie, les deux principales théories suggèrent que cette tumeur est issue de cellules primaires provenant soit de la crête neurale, soit de CSM [24]. Il représente la deuxième tumeur primitive maligne osseuse la plus fréquente après l'ostéosarcome [25]. La tumeur d'Ewing touche principalement l'enfant et le jeune adulte, rare avant 5 ans et après 30 ans. Le pic d'incidence se situe essentiellement entre 10 et 30 ans et l'âge pédiatrique médian est de 12 ans. Avec environ 100 nouveaux cas diagnostiqués chaque année en France, son incidence annuelle dans la population est d'environ 2,93 cas / millions d'enfants [26][27]. Cette tumeur osseuse est par ailleurs plus fréquente chez les garçons avec un rapport de 1,2 à 1,5 et est exceptionnelle dans les populations noires, africaines ou américaines ainsi que chez les sujets d'origine asiatique. Environ 85 % des sarcomes d'Ewing sont osseux avec une prédominance au niveau de la diaphyse des os longs (fémur, tibia, péroné, humérus). Ils peuvent également être localisés au niveau de la ceinture pelvienne et de la cage thoracique avec une fréquence variable (Figure 11).

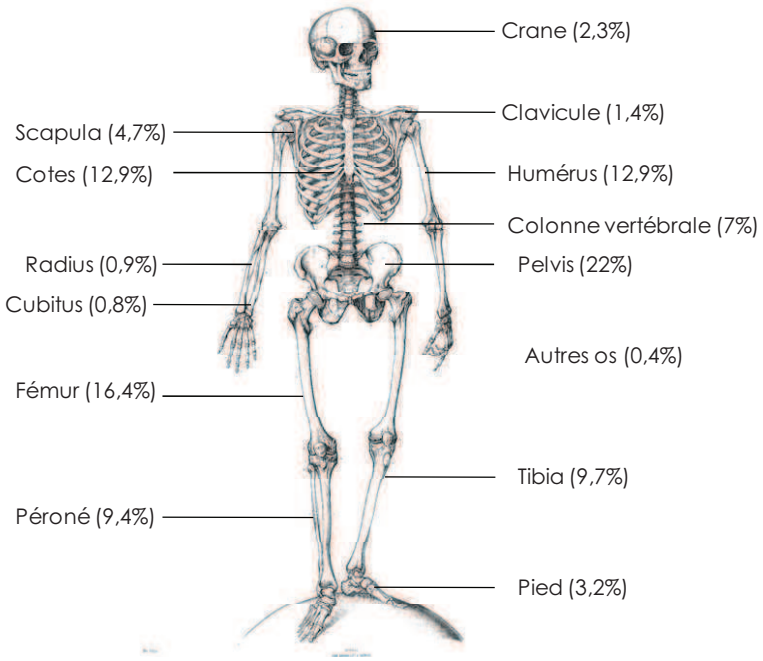


Figure 11 : Principales localisations du sarcome d'Ewing.

b) Etiologie

Le développement du sarcome d'Ewing est associé à une translocation chromosomique unique donnant naissance à un gène de fusion spécifique entre le gène EWS et un gène de la famille ETS. Dans 85 % des cas, la tumeur est associée avec la translocation t(11 ;22)(q24 ;q12) donnant naissance au gène de fusion EWS-FLI1 (Figure 12).

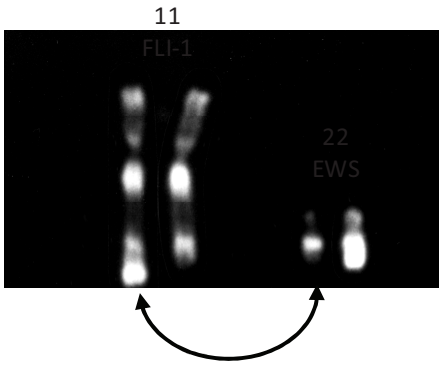


Figure 12 : Translocation chromosomique entre les chromosomes 11 et 22 à l'origine du sarcome d'Ewing.

Membre de la famille EWS	Membre de la famille ETS	Fréquence (%)
EWS	FLI1	85
EWS	ERG	10
EWS	ETV1	<1
EWS	ETV4	<1
EWS	FEV	<1
TLS	ERG	<1

Tableau 1 : Principales translocations chromosomiques responsables du sarcome d'Ewing.

Cibles directes	**Surexpression**	RPB7/POLR2G, TNC, UPP1, ID2, TERT, PTPL1/PTPN13, PLD2, MK-STYX, GLI1, Aurora A et B
	inhibition	p21/CDKN1A, TGFβR2, IGFBP3
Cibles indirectes	**Surexpression**	EAT-2/SH21B, MFNG, UBE2C, CCND1, MAPT, PP1R1A, NEK2, MYC, PIM3, NKX2-2, CCK, CAV1, CD99, VEGF-A, EZH2, TOPK/PBK,IGF1/IGF1R, DAX1/NR0B1
	inhibition	p27/CDKN1B, p57/CDKN1C, ZYX, NOTCH-p53, thrombospondin1 et 2

Tableau 2 : Principales cibles du facteur de transcription EWS-FLI1. [D'après Mackintosh *et al.*, [28]]

Dans 10-15 % des cas, la translocation t(21 ;12)(22 ;12) génère le gène de fusion EWS-ERG et dans les 1-5 % restants, plusieurs translocations sont possibles entre le gène EWS et un membre de la famille ETS tel que ETV1 ou 4 avec des fréquences variables (Tableau1).

EWS-FLI1 est un facteur de transcription aberrant capable d'activer ou d'inhiber, directement ou indirectement, la transcription de certains gènes, deux effets essentiels dans la tumorogenèse du sarcome d'Ewing (Tableau 2).

Par ailleurs, l'association EWS-ETS confère aux domaines activateurs de ce facteur de transcription une capacité accrue à activer les gènes cibles en comparaison des domaines présents sur les facteurs de la famille ETS natifs [29]. De nombreux gènes cibles de l'activation par EWS-FLI1 ont été identifiés dans les cellules de sarcomes d'Ewing et dans les progéniteurs mésenchymateux à l'origine de la pathologie incluant IGF-1 et le co-régulateur de transcription NR0B1 [30][31]. Cette activation de gène se fait non seulement par l'intermédiaire des mêmes sites que ceux des facteurs de transcription ETS natifs mais également par l'intermédiaire de sites dans le promoteur contenant des répétitions GGAA [32]. L'importance de la répression de transcription par EWS-FLI1 a été montrée plus récemment. EWS-FLI1 va induire une activation très forte de la transcription des gènes NKx2.2 ou NR0B1, eux-mêmes capables de réprimer ou activer la transcription de nombreux gènes, cibles indirectes de EWS-FLI1.

Cette activation de la transcription de NKx2.2 et NR0B1 est indispensable à la transformation des cellules de sarcome d'Ewing. La protéine EWS-FLI-1 exerce aussi une action oncogénique en induisant une inhibition de l'expression de l'IGF-Binding-Protein-3 (IGFBP-3). Ainsi, au moment de la croissance chez les adolescents, les cellules normales sont soumises à une intense signalisation par l'hormone de croissance et notamment par l'IGF-1, ce dernier pouvant être inhibé par IGFBP-3. Dans le sarcome d'Ewing, EWS-FLI1 inhibe l'expression d'IGFBP-3. En conséquence, le facteur de croissance IGF-1 n'est plus inhibé et peut alors transmettre en continu un signal ordonnant aux cellules de proliférer de manière anarchique [33]. IGFBP-3, impliqué en amont dans cette voie de signalisation, pourrait par ailleurs servir de cible thérapeutique pour bloquer la prolifération cellulaire anormale induite par IGF-1.

c) Tableau clinique

Le sarcome d'Ewing est caractérisé par une croissance rapide et une destruction massive extensive des os touchés qui peut induire des douleurs osseuses ainsi que des fractures pathologiques. Les signes révélateurs de la maladie sont tout d'abord une douleur intermittente, puis persistante au repos, pouvant être d'intensité progressivement croissante sur plusieurs semaines. Cette évolution progressive peut expliquer un retard fréquent de plusieurs mois du diagnostic. Parfois, la tuméfaction qui apparaît secondairement est d'aspect inflammatoire, de croissance rapide et peut devenir très volumineuse. Dans 15 à 20 % des cas des signes généraux s'associent au développement de la tumeur, en particulier de la fièvre, une asthénie et un amaigrissement. Ces signes généraux sont souvent associés à une maladie métastatique ou à une localisation pelvienne. Dans le cas de métastases pulmonaires, des signes respiratoires révélateurs peuvent être observés et dans le cas d'une tumeur vertébrale, des douleurs radiculaires et une compression médullaire. La radiographie standard permet généralement de confirmer le diagnostic de tumeur osseuse maligne devant le caractère très ostéolytique de la lésion et la réaction périostée en feu d'herbe (Figure 13).

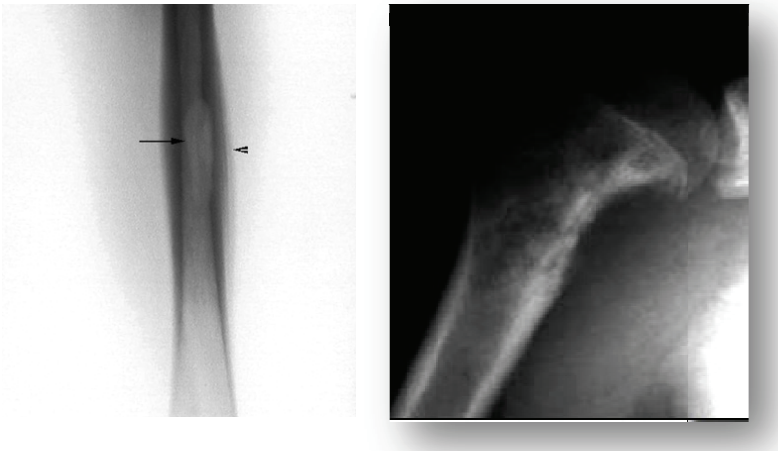


Figure 13 : Radiologie d'un patient présentant des lésions ostéolytiques et une réaction périostée consécutives à un sarcome d'Ewing. (D'après le site internet : http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Radio/curriculum/Harrisons/Oncology/ewings2.jpg).

Parfois la tumeur est découverte à l'occasion d'un traumatisme s'accompagnant de fracture. Une imagerie par résonnance magnétique (IRM) permettra d'évaluer l'extension intramédullaire et dans les parties molles. Il est estimé que 25% des patients présentent une forme métastatique de la pathologie au moment

du diagnostique et les sites métastatiques les plus fréquents sont les poumons et dans une moindre mesure des localisations médullaires ou osseuses.

d) Histologie

Seule la biopsie chirurgicale permet de réaliser un diagnostic définitif. Ainsi, au niveau histologique, le sarcome d'Ewing est une tumeur à petites cellules rondes avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Elles ont également un aspect basophile, d'architecture plus ou moins lobulée, dense, d'aspect uniforme. Parfois, l'arrangement est circulaire autour d'une formation vasculaire en pseudo rosettes. Les cellules sont en effet relativement monomorphes et comportent des noyaux arrondis à ovalaires, vésiculeux à membrane nucléaire cernée, à chromatine finement granitée homogène renfermant un petit nucléole. Les cytoplasmes sont pâles, mal limités, peu abondants. Si le nombre des mitoses est réduit, il peut exister des formes avec un plus grand pléomorphisme et une activité mitotique augmentée (Figure 14).

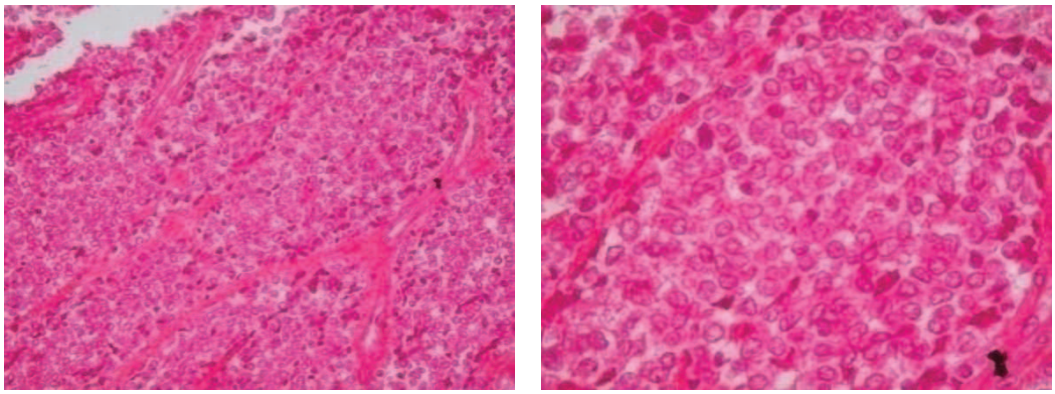


Figure 14 : Aspect histologique d'un sarcome d'Ewing extra-squelettique chez une jeune fille de 13 ans. Cette tumeur est caractérisée par de petites cellules rondes qui groupent de nombreuses entités, au noyau pourvu de chromatine et aux limites du cytoplasme imprécises (gauche : x200, droite : x40).

Il n'y a pas de réseau réticulinique intercellulaire. La vascularisation est riche, parfois masquée par la densité cellulaire. Il peut exister des remaniements hémorragiques, des aspects pseudo-angiomateux. Le glycogène est d'aspect variable, mieux vu sur des prélèvements congelés, présent dans 70 % des cas. Une analyse immunohistologique montre que dans 90 % des cas, les cellules de sarcome d'Ewing expriment le marqueur CD99, généralement associé aux cellules lymphoïdes et qui auraient un rôle dans la transmigration des leucocytes depuis l'endothélium [34]. En fonction du degré de différenciation neuroectodermique, les cellules de sarcome

d'Ewing peuvent aussi exprimer des marqueurs neuraux comme le marqueur neural-spécifique endolase (NSE), S-100, synaptophyine et CD57 [35].

e) Les traitements actuels

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

Traitement des sarcomes d'Ewing localisés :

Le traitement des pathologies localisées repose sur 3 étapes essentielles. La première est l'étape de cytoréduction grâce à une chimiothérapie néo-adjuvante visant à éradiquer les micrométastases et réduire la tumeur locale. La seconde étape repose sur la résection chirurgicale de la tumeur locale avec conservation du membre. La dernière étape consiste en une chimiothérapie adjuvante avec ou sans radiothérapie dans le but de minimiser l'apparition de récidives [27]. La radiothérapie est peu utilisée en raison de ses effets secondaires comme l'apparition de tumeurs secondaires au traitement. Il y a une quarantaine d'années, avant l'apparition de la chimiothérapie moderne, les taux de survie à 5 ans pour les patients atteints de sarcome d'Ewing ne dépassaient pas les 10 % [36]. Les premières améliorations des taux de survie furent observées au début des années 60 avec l'utilisation de la cyclophosphamide [37][38].

Par la suite, l'utilisation de protocoles de chimiothérapie combinatoire associant 4 médicaments ont montré une efficacité certaine mais transitoire en phase II de monochimiothérapie : vincristine, actinomycine D, l'adriamycine et le cyclophosphamide. L'association des 4 (VACA) a montré une efficacité supérieure à d'autres associations, notamment de 3 médicaments, VAC (vincristine, actinomycine D et cyclophophamide) [39]. Ce protocole VACA, un des plus anciens protocoles de chimiothérapie néo-adjuvante, était administré de façon variable, sous forme cyclique, c'est-à-dire 2 à 3 jours toutes les 3 semaines ou à faibles doses de manière continue 1 semaine sur 2. L'apparition de l'ifosfamide en supplément dans ce type de protocole a permis d'améliorer le pronostic des grosses tumeurs et d'augmenter la survie sans récidive après association à l'étoposide, mais son association au protocole VACA reste encore discutée [40][41].

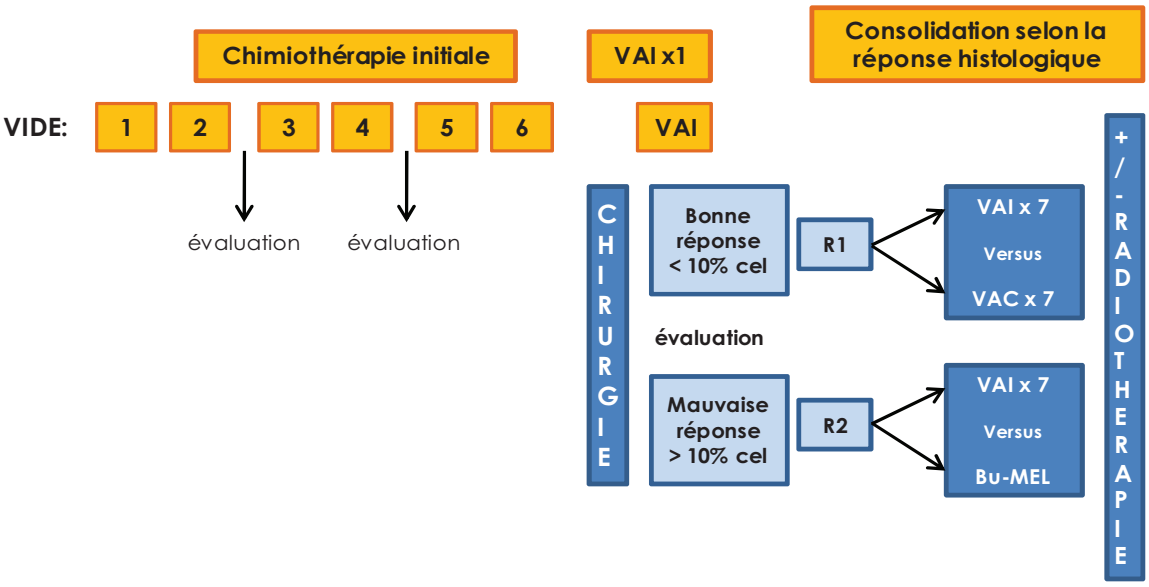


Figure 15 : Protocole euro-EWING 99.

Traitement des sarcomes d'Ewing métastatiques ou récidivant :

Alors que le traitement des patients présentant des formes de sarcome d'Ewing localisées permet dans 60 % des cas d'obtenir une guérison complète, la prise en charge thérapeutique des patients présentant des formes métastatique ou récidivante consiste majoritairement à limiter l'évolution de la tumeur le plus longtemps possible [42][26]. Le taux de survie à 5 ans pour ce type de patients reste aux alentours de 25%. Les patients développant une maladie récidivant dans les 2 premières années après la fin du traitement présentent quant à eux un taux de survie à 5 ans de seulement 7% (contre 30% pour les pathologies récidivantes après plus de 2 ans) [43].

EuroEWING99 :

Depuis 1999, le traitement de référence du sarcome d'Ewing en Europe suit le protocole clinique euro-EWING 99 (EUROpean Ewing tumor Working Initative of Nationnal Groups) qui évalue le bénéfice clinique d'une chimiothérapie combinatoire différente associant vincristine, ifosfamide, adriamycine (= doxorubicine) et étoposide (VIDE) (Figure 15). Le protocole thérapeutique est constitué de 6 cures de cette chimiothérapie néo-adjuvante VIDE associées à une résection chirurgicale quand celle-ci est possible. Une randomisation est ensuite réalisée et les patients sont divisés en 3 groupes en fonction du volume tumoral, de la réponse histologique et de la présence de métastases au moment du diagnostic. Le premier groupe (R1), concerne les patients présentant une pathologie localisée. Le second groupe (R2), concerne les patients présentant des métastases pulmonaires et le dernier (R3), regroupe les patients avec des métastases osseuses, de la moelle osseuse ou multifocales. Pour les patients du groupe R1, la chimiothérapie adjuvante est randomisée entre 7 cures d'une association de vincristine et Actinomycine avec cyclophosphamide (VAC) ou ifosfamide (VAI). Pour le groupe R2, la chimiothérapie adjuvante est randomisée entre le protocole VAI et une chimiothérapie plus forte comprenant busulfan et melphalan. Enfin, pour le groupe R3, présentant les plus faibles taux de survie, les options thérapeutiques comprennent des cures de melphalan/ melphalan et de busulfan/melphalan.

f) Limites des traitements actuels

Comme décrit précédemment, malgré l'amélioration de la prise en charge thérapeutique grâce à la polychimiothérapie néoadjuvante et à la chirurgie conservatrice, les taux de survie à 5 ans pour les patients atteints de sarcome d'Ewing restent à améliorer. Ceci est vrai en particulier pour les patients présentant des métastases au moment du diagnostic, pour les formes récidivantes et pour les patients

présentant des résistances à la chimiothérapie. Par ailleurs, les séquences de traitement, les hospitalisations répétées et les effets secondaires font de la chimiothérapie un traitement très lourd aboutissant à une perte réelle de qualité de vie pour les patients. De nouvelles stratégies thérapeutiques adjuvantes doivent donc être envisagées afin d'améliorer l'espérance et la qualité de vie des patients atteints de sarcome d'Ewing présentant des formes localisées mais surtout pour les patients à haut risques dont les taux de survie à 5 ans restent très faibles (métastases, rechute, résistance aux traitements).

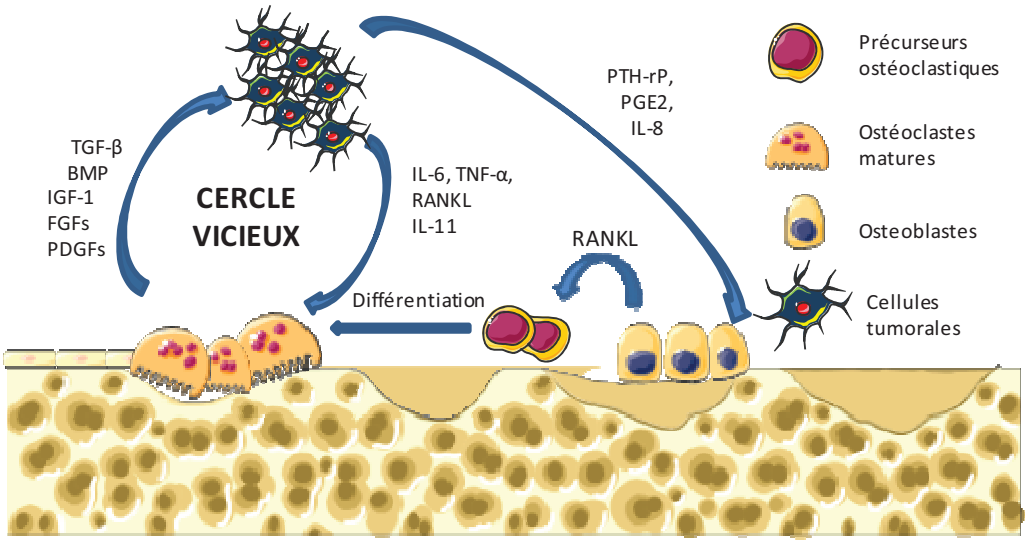


Figure 16 : Le cercle vicieux entre prolifération tumorale et résorption osseuse.

III. Nouvelles approches thérapeutiques du sarcome d'Ewing par inhibition du cercle vicieux entre prolifération tumorale et résorption osseuse

1) Le cercle vicieux

Une des principales conséquences du développement des tumeurs en site osseux est l'apparition de lésions ostéolytiques. Dans le cas des tumeurs primitives comme dans celui des métastases osseuses, ces lésions aboutissent à de fortes douleurs ainsi qu'à des fractures. Chez l'adulte, l'intégrité du squelette est assurée par un équilibre entre résorption et apposition osseuse. Lors du développement tumoral, cet équilibre est altéré et aboutit à la formation de lésions de type ostéolytique ou ostéoblastique. Par ailleurs, l'interaction entre les cellules tumorales, les facteurs qu'elles produisent et le microenvironnement osseux est essentielle à l'implantation et au développement de la tumeur. Ainsi, comme cela a déjà été montré dans le cas des métastases osseuses, il existe lors du développement des tumeurs osseuses primitives un cercle vicieux entre la prolifération tumorale et la résorption osseuse (Figure 16)[44][45].

Le tropisme des tumeurs osseuses primitives ou métastatiques pour l'os provient en particulier de la présence de facteurs de croissances tels que l'IGF-1, le TGF-β et le FGF dans le microenvironnement osseux après leur relargage durant le phénomène de résorption osseuse [46][47][48]. Tous ces facteurs vont stimuler l'installation et le développement de la tumeur selon la théorie de « seed and soil » [49]. En retour, les cellules tumorales vont produire directement ou indirectement, des facteurs pro-ostéolytiques (tels que des hormones, des cytokines ou des facteurs de croissance) via des interactions avec les cellules stromales [50][51][52]. Parmi ces facteurs, le PTH-rP va promouvoir la différenciation, l'activation et la survie des ostéoclastes en induisant la production de RANKL par les ostéoblastes. Ainsi, l'intensification de la résorption osseuse va favoriser le cercle vicieux en induisant la libération des facteurs de croissances stockés dans la matrice osseuse et de cette manière, favoriser le développement de la tumeur. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration calcique induite par la résorption osseuse va stimuler la croissance tumorale et la production de PTH-rP.

2) Traitements expérimentaux

Une des approches thérapeutiques novatrices des tumeurs osseuses primitives est de rompre ce cercle vicieux. Deux hypothèses thérapeutiques peuvent être envisagées:

● Inhiber la prolifération des cellules tumorales, notamment par des agents de chimiothérapie conventionnels ou autres, et ainsi bloquer la libération de facteurs pro-ostéolytiques.

● Inhiber la résorption osseuse et donc la libération de facteurs de croissance piégés dans la matrice osseuse et favorables et à la prolifération des cellules tumorales. Cette hypothèse thérapeutique est au centre des recherches expérimentales au sein du laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse.

Des données bibliographiques rapportent plusieurs stratégies expérimentales actuellement en cours d'évaluation afin d'inhiber le développement tumoral :

● **Anti IGF1-R :**

IGF1-R joue un rôle important dans la transformation des cellules tumorales, leur protection contre l'apoptose ainsi que dans l'invasion et le développement métastatique. Présent dans tous les sarcomes d'Ewing, IGF1-R est un récepteur à tyrosine kinase dont l'activité est influencée par EWS-FLI1 via l' inhibition de l'expression de l'IGF-BP-3, un inhibiteur du ligand de IGF1-R, IGF-1[33][53][54]. Lors d'une étude préclinique, Manara et collaborateurs ont montré chez des souris athymiques que l'inhibition de IGF1-R par un inhibiteur spécifique, le NVP-AEW541 induisait une inhibition de la migration, du développement de métastases et de l'angiogénèse [55]. Des anticorps dirigés contre IGF1-R ont été développés. Un de ces anticorps, le SCH717454 a été testé par le « Pediactric Preclinical Testing Program » sur le sarcome d'Ewing et l'ostéosarcome et a montré des effets anti-tumoraux *in vivo*. Plusieurs essais cliniques de Phase I et II ont ensuite mis en évidence l'intérêt de l'utilisation d'anticorps anti-IGF1-R en monothérapie dans le sarcome d'Ewing avec une très bonne tolérance et des résultats prometteurs sur des patients résistants à la chimiothérapie [56][57]. Malgré ces résultats encourageants, en raison du faible nombre de patients touchés par le sarcome d'Ewing et d'une absence de retour sur investissement pour les firmes pharmaceutiques, tous les essais cliniques sur les anticorps anti-IGF1-R ont été stoppés. Cependant, l'inhibition de mTOR en combinaison avec l'inhibition de la voie IGF1-R induit des effets synergiques et pourrait éviter l'apparition de phénomènes de résistance. Par ailleurs, un essai clinique de phase I est actuellement en cours aux Etats-Unis pour tester cette approche.

● **Thérapies anti-angiogéniques :**

L'angiogenèse joue un rôle très important dans le développement du sarcome d'Ewing *in vivo* [58]. Une forte production de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) a par ailleurs été mise en évidence *in vitro* et dans les modèles murins de sarcome d'Ewing, suggèrant un rôle important dans le développement de la tumeur. Pour cette raison, l'effet d'une combinaison d'un anticorps monoclonal anti-VEGF, le bevazcizumab (Avastin®) et de vincristine, cyclophosphamide et topecan est évalué sur des patients atteints de sarcome d'Ewing récidivant dans l'essai clinique COG-AEWS-0521 [59].

● **Thérapies ciblant EWS-FLI1 :**

De nombreuses études *in vitro* ont montré que l'inhibition de EWS-FLI1, que ce soit grâce à des oligonucléotides anti-sens, de l'ARN interférence ou des dominants négatifs est capable d'induire une inhibition de la croissance des lignées cellulaires de sarcome d'Ewing [60][61][62][63]. La transposition de ces résultats à la clinique reste problématique en raison de la nécessité de vectoriser ces molécules pour permettre leur entrée dans les cellules. Pour contourner ce problème, il est donc intéressant d'utiliser des molécules chimiques influant sur l'expression d'EWS-FLI1. Ainsi, le traitement de cellules de sarcome d'Ewing par la cytarabine, une molécule chimique capable d'inhiber les effets d'EWS-FLI1, induit une réduction de la viabilité cellulaire *in vitro* et limite la prolifération tumorale *in vivo* dans un modèle de xénogreffe [64]. Un essai clinique de phase II réalisé sur des patients atteints de sarcome d'Ewing récidivant a cependant montré des effets très limités de la cytarabine sur le développement tumoral ainsi qu'une toxicité hématologique [65].

Ces stratégies sont pour le moment à un stade expérimental et la réponse relative des tumeurs à ces traitements ainsi que la toxicité observée lors des essais cliniques laissent penser que d'autres options thérapeutiques devraient être envisagées. Dans ce sens, l'inhibition de la résorption osseuse et ainsi du cercle vicieux entre prolifération tumorale et résorption osseuse, pourrait représenter une approche prometteuse.

● **Les Bisphosphonates:**

Dans ce cadre, les Bisphosphonates (BP), connus pour leur fort pouvoir anti-résorptif, sont à l'heure actuelle une des approches les plus utilisées dans le traitement palliatif des métastases osseuses mais ils sont également envisagés dans le traitement des tumeurs osseuses primitives telles que l'ostéosarcome ou le sarcome d'Ewing. Les BPs sont des analogues synthétiques du pyrophosphate endogène qui se concentrent spécifiquement au niveau osseux grâce à leur interaction avec les cristaux d'hydroxyapatite. Ils sont relargués durant l'ostéolyse et vont agir comme des puissants inhibiteurs de la résorption osseuse [66][67][68]. Différents BP sont actuellement disponibles et divisés en plusieurs familles selon la structure de leurs chaînes latérales. Les BP de première génération (ofetidronate, clodronate et tiludronate), de seconde génération (pamidronate, alendronate et oribandronate) et les plus efficaces pour prévenir les lésions ostéolytiques, ceux de troisième génération (zoledronate, risedroniate, orminodronate) (Figure)[69][70][71]. Les BP de première génération sont métabolisés comme un analogue toxique de l'adénosine triphosphate (ATP) qui induit la mort des ostéoclastes [72][73]. L'acide Zolédronique, comme les autres BP de troisième génération inhibe la Farnésyl diphosphate synthase et la geranylgeranyl diphosphate synthase, deux enzymes impliquées dans la voie du mévalonate et nécessaires pour la prénylation des petites GTPase intracellulaires telles que Ras, Rho et Rac [74]. Ces petites GTPase sont nécessaires pour la fonction des ostéoclastes et leur inhibition entraîne l'apoptose de ces derniers par la perte de signaux de survie [75][76]. Par ailleurs, les BP seraient aussi capables d'inhiber la résorption osseuse en augmentant la production d'ostéoprotégérine (OPG), cytokine antirésorptive, par les ostéoblastes humains [77]. En plus de ses capacités antirésorptives, l'acide zolédronique est capable d'induire la mort des cellules tumorales comme cela a été observé dans des études précliniques sur des lignées de myélomes et de carcinomes du sein et de la prostate [70]. Il aurait de plus un effet inhibiteur sur l'invasion de la tumeur et sur l'angiogenèse, essentielles au processus métastatique [78]. Les effets des BP sont actuellement étudiés sur la perte osseuse consécutive à la ménopause mais aussi sur les lésions osseuses induites par les métastases de cancers tels que celui de la prostate et du sein [79][80]. Les bénéfices cliniques observés sont variables mais une réduction significative de la perte osseuse a été observée dans ces études malgré l'absence d'effets significatifs sur l'incidence métastatique et sur la survie des patients. Les effets des BP sur les métastases du cancer du poumon ainsi que sur les métastases viscérales sont aussi discutés [81][82][83][84]. Les résultats encourageants sur l'ostéolyse et sur l'induction de la mort des cellules tumorales font de l'acide zolédronique un bon candidat dans le traitement des tumeurs osseuses primitives. Ainsi l'acide zolédronique pourrait à la fois inhiber les deux aspects du cercle

vicieux, la prolifération tumorale et la résorption osseuse. Plusieurs études ont déjà démontré les effets thérapeutiques de l'acide zolédronique sur le développement de l'ostéosarcome [85][86][87][88] et en particulier une inhibition de la croissance tumorale et une augmentation de la survie dans des modèles précliniques [88]. Au vu de ces résultats encourageants, l'acide zolédronique a été associé à la chimiothérapie conventionnelle dans le traitement de l'ostéosarcome et à la chirurgie dans l'essai clinique de phase III, OS2006. Suite à ces résultats d'autres essais précliniques et cliniques ont été réalisés en France sur l'ostéosarcome [89][90][91][92].

Au vu des résultats obtenus sur l'ostéosarcome, l'association de l'acide zolédronique à la chimiothérapie conventionnelle pourrait être une approche prometteuse pour limiter l'ostéolyse associée au développement du sarcome d'Ewing et prévenir l'apparition de métastases osseuses. Plusieurs études précliniques ont déjà montré l'effet antitumoral des BP sur les lignées de sarcome d'Ewing [93][94][95]. Nous avons par ailleurs récemment montré au laboratoire que l'administration d'acide zolédronique est capable, dans un modèle préclinique induit chez la souris Nude, d'entraîner une inhibition significative du développement tumoral en site osseux, de réduire les lésions ostéolytiques et d'accroitre la survie des animaux (Annexe 2, [96]). Ces résultats n'ont pas été retrouvés dans le cas d'un développement tumoral en tissus mous mais un effet synergique de l'acide zolédronique et de l'ifosfamide a toutefois été observé sur l'inhibition du développement tumoral et la survie des animaux. Ces résultats sont en accord avec d'autres études ayant montrées les effets synergiques observés avec l'association de BP et d'agents de chimiothérapie [97][98][99]. En Allemagne, dans le contexte de l'essai clinique Euro-Ewing 2009, les effets de l'acide zolédronique sont actuellement testés sur des patients présentant un sarcome d'Ewing localisé et devraient apporter plus d'informations sur ses bénéfices cliniques.

Malgré des résultats prometteurs, l'utilisation des BP dans les pathologies reste un traitement lourd à endurer pour les patients en raison des séquences d'injections répétées et à des effets secondaires tels que l'ostéonécrose de la mâchoire. Par ailleurs, un effet bénéfique significatif sur la survie des patients n'a pas non plus été clairement démontré.

3) Les modèles précliniques de Sarcome d'Ewing

Plusieurs modèles animaux de sarcome d'Ewing ont été développés et décrits dans la littérature, induits généralement par injections sous cutanées de cellules tumorales humaines de sarcome d'Ewing chez la souris Nude [100][101]. Ces modèles reproduisent le développement d'une pathologie en tissus mous mais ne présentent pas les atteintes osseuses caractéristiques du sarcome d'Ewing observées chez les patients (85% des patients atteints de sarcome d'Ewing présentent une atteinte osseuse).

Dans le but de reproduire le plus fidèlement possible les signes cliniques et la cinétique de développement observés chez les patients, nous avons développé au sein du laboratoire, des modèles précliniques permettant un développement tumoral au contact du squelette de l'animal. Ces modèles sont induits par injection de cellules tumorales humaines de sarcome d'Ewing chez des souris athymiques immunodéprimées de fond génique NMRI Nude. Ces injections sont réalisées soit en site intramusculaire au contact du périoste du tibia, soit directement en site intra-osseux dans la cavité médullaire du tibia, au niveau diaphysaire (Figure17).

Ainsi, nous avons développé des modèles précliniques de sarcome d'Ewing reproduisant les 2 aspects cliniques observés chez les patients : le développement en tissus mous (15% des cas chez les patients) et le développement en tissus osseux (85% des cas chez les patients).

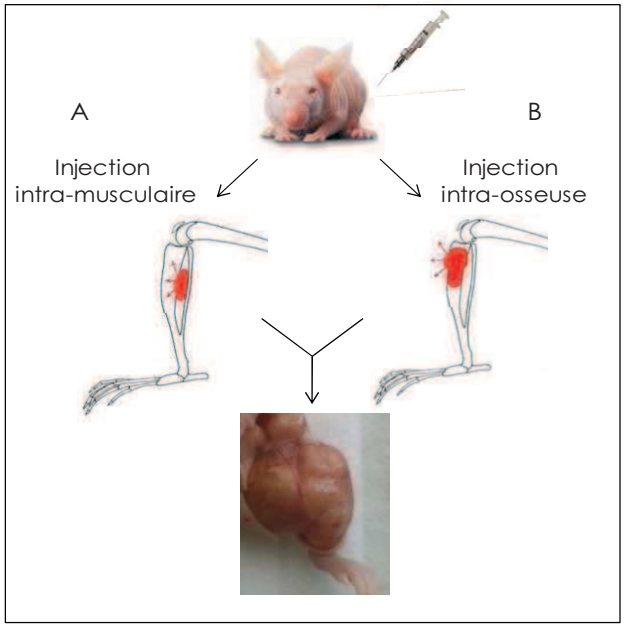


Figure 17 : Induction des modèles de sarcome d'Ewing par injection de cellules tumorales humaines. Les cellules sont injectées en site intramusculaire au contact du tibia (A) ou directement dans le fût tibial médullaire (B).

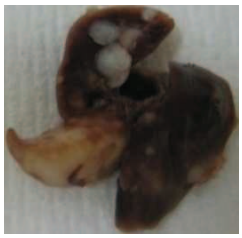
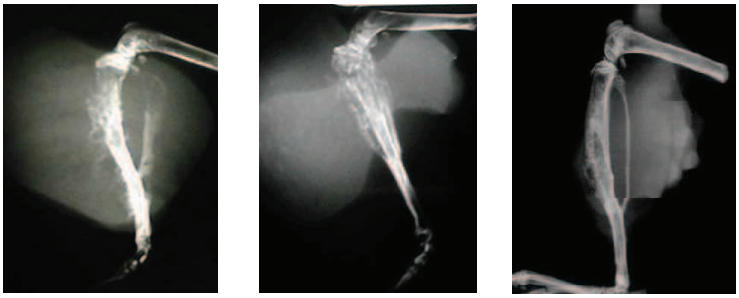


Figure 18 : Cliché de métastases pulmonaires. Ces métastases sont consécutives au développement d'une tumeur de sarcome d'Ewing chez la souris Nude induite par injection de 2 millions de cellules A673 en site intra-osseux.



A673 IM | A673 IO | TC-71 Transplanté

Figure 19 : Cliché radiographiques des lésions ostéolytiques associées à des tumeurs de 3000 mm³. Les tumeurs sont induites par injection de cellules A673 en site intramusculaire (A673 IM), en site intra-osseux (A673 IO) ou par transplantation de tumeur TC-71(TC-71 transplanté).

Ces modèles ont été développés à partir des lignées cellulaires humaines de sarcome d'Ewing TC-71, A673, SK-N-MC, SK-ES-1, STA-ET-1, TC-32 et EW24. Ils ont été caractérisés en termes de cinétique de développement tumoral, d'atteinte osseuse (par radiographie et microscanner) ainsi qu'au niveau histologique. Ces modèles présentent une cinétique de développement différente mais montrent tous une forte atteinte osseuse.

Les modèles induits à partir de l'injection de cellules tumorales en site intramusculaire présentent un développement de la tumeur débutant en tissus mous puis dégradant l'os cortical et envahissant le tissu osseux pour présenter ensuite les atteintes mixtes caractéristiques du sarcome d'Ewing (une forte ostéolyse accompagnée d'une légère formation osseuse ectopique). Pour ce type de modèle, le développement de métastases pulmonaires reste un évènement rare.

Un autre modèle a été développé à partir du modèle intramusculaire TC-71, par transplantation d'un fragment tumoral au contact du tibia après avivement du périoste. Ce modèle présente les mêmes caractéristiques de développement que les modèles intramusculaires mais avec une cinétique plus lente. Les atteintes osseuses associées au développement tumoral sont identiques à celles obtenues avec le modèle intra-musculaire.

Les modèles induits par injection intra-osseuse sont, quant à eux, les plus proches de la réalité clinique avec une atteinte de la partie médullaire de l'os dans un premier temps, puis de l'os cortical. Dans un second temps, la tumeur va envahir les tissus mous adjacents. Une forte ostéolyse est observée, accompagnée d'une formation osseuse ectopique. La cinétique des modèles intra-osseux est plus lente que celles des modèles intra-musculaires (environ une semaine de décalage), probablement en raison du temps nécessaire à la tumeur pour dégrader l'os et envahir les tissus mous adjacents. Dans ce type de modèle, des métastases pulmonaires sont fréquemment observées à l'euthanasie des animaux (Figure 18).

Malgré une cinétique de développement tumoral différente entre ces différents types de modèles, les atteintes osseuses observées au moment de l'euthanasie des animaux (quand la tumeur atteint environ 3000 $mm^{3)}$ sont similaires, aussi bien au niveau de l'analyse radiologique qu'au niveau de l'analyse misco-scanner, avec une ostéolyse très prononcée et une légère formation osseuse ectopique (Figure 19). Par ailleurs, lors d'une étude transcriptomique, aucune différence significative d'expression n'a été observée entre les modèles intra-musculaires et intra-osseux (Etude réalisée par l'équipe de Franck Tirode, Institut Curie, INSERM U830, Paris).

Toutefois, ces modèles précliniques présentent des limites avec un développement tumoral parfois trop rapide (3000 mm^3 en un mois environ), rendant parfois la réponse aux traitements difficiles à apprécier. De plus, même si le modèle intra-osseux est le plus proche de la réalité clinique, le modèle intramusculaire est le plus fréquemment utilisé. Il est ainsi plus aisé à mettre en œuvre et reproduit à l'issue du développement tumoral les mêmes caractéristiques que le modèle intra-osseux. Par ailleurs, lors de leur injection en site intra-osseux, un certain nombre de cellules tumorales semblent passer dans la circulation sanguine et provoquer des embolies conduisant à la mort de certains animaux. De plus, le modèle intra-osseux présente une reproductibilité relative et un manque d'homogénéité en termes de développement tumoral entre les souris d'un même groupe.

Le premier modèle développé au sein du laboratoire et le plus couramment utilisé est le modèle A673 induit en site intramusculaire (Figure 20). Ce modèle présente une bonne reproductibilité et une forte ostéolyse associée au développement tumoral.

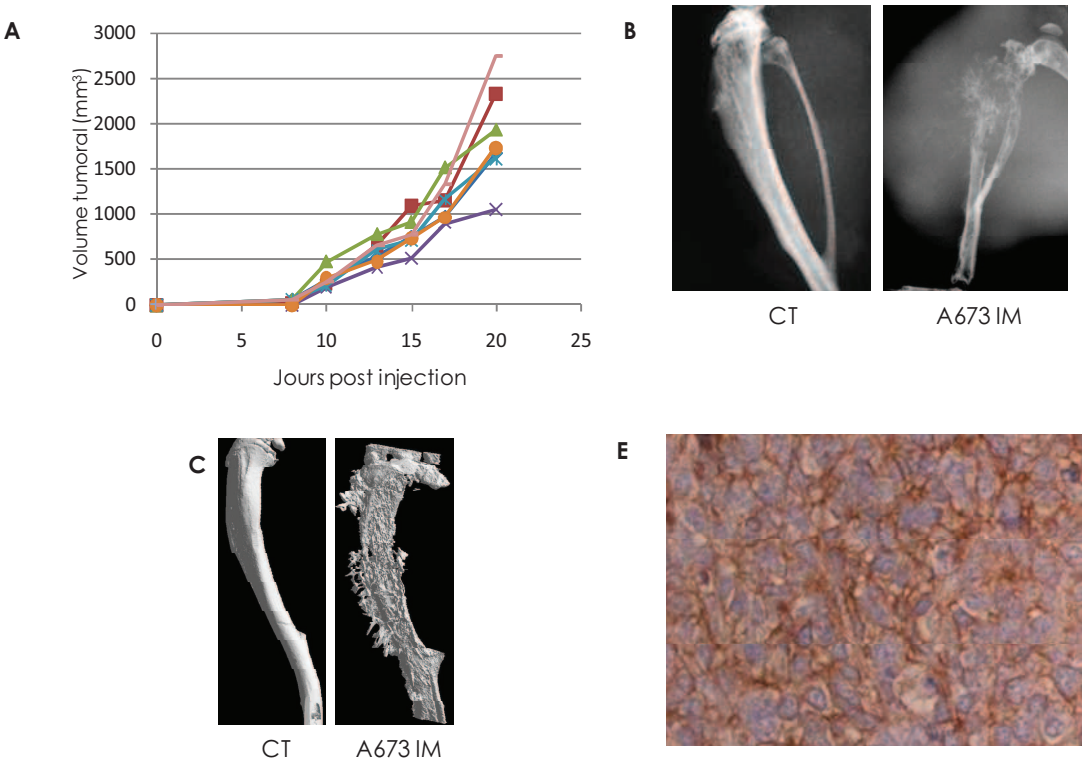


Figure 20 : Caractérisation de la tumeur A673 induite par injection intramusculaire. Développement tumoral en fonction du temps du modèle de sarcome d'Ewing A673 en intramusculaire (A). Analyse des clichés radiographiques (B) et de la reconstruction 3D par microscanner (C) des lésions ostéolytiques associées au développement de tumeurs induites par injection de cellules A673 en site intramusculaire (A673 IM) comparativement aux animaux contrôles (CT). Au niveau histologique, le tissu tumoral ne présente aucune formation de plaque d'ostéoïde mais un fort indice mitotique et un marquage positif pour le marqeur CD99, caractéristique de la tumeur d'Ewing (D)(coloration Hématoxyline Eosine après marquage immuno-histochimique par un anticorps anti-CD99 humain, x40).

4) Le transfert de gène

Le transfert de gène consiste à faire pénétrer un gène codant une protéine dans la cellule afin de lui faire produire une grande quantité de cette protéine. Ce transfert de gène présente de nombreux avantages comparativement à l'administration de protéines recombinantes. En effet, la production à grande échelle de protéines recombinantes est onéreuse et leur efficacité reste limitée en raison d'une élimination ou dégradation rapide dans la circulation sanguine. Ainsi, l'utilisation de protéines recombinantes nécessite des injections répétées et à fortes doses. Les forts taux circulants obtenus ainsi que la répétition des injections entraînent fréquemment des effets indésirables, voire une certaine toxicité. Dans le cadre du transfert de gène, une fois la membrane plasmique traversée, la molécule d'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) introduite va devoir atteindre le noyau pour y être transcrite en Acide RiboNucléique messager (ARNm). Cet ARNm devra ensuite retourner dans le cytoplasme pour y être traduit en protéine.

a) La membrane plasmique

Les cellules sont délimitées par une bicouche lipidique de 6 à 9 nm d'épaisseur appelée membrane plasmique qui sépare le cytoplasme du milieu extracellulaire. Cette membrane est dite semi-perméable et joue un double rôle de protection et de contrôle des échanges entre les milieux intracellulaire et extracellulaire. Seul un nombre limité de molécules hydrophobes peuvent traverser directement la membrane plasmique, les autres doivent pénétrer par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques (Figure 21).

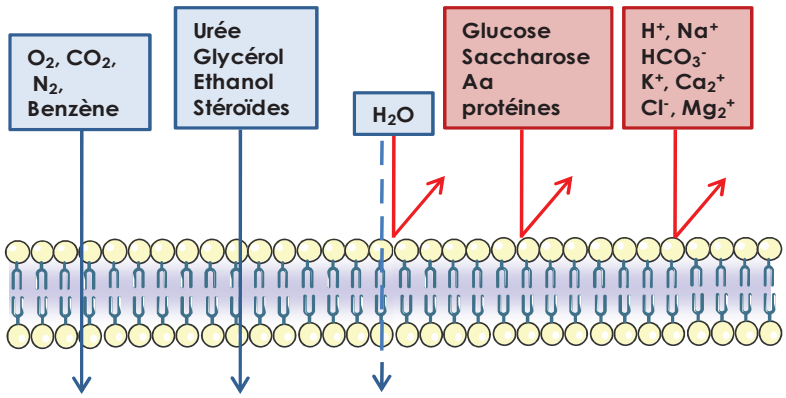


Figure 21 : La membrane plasmique semi-perméable.

Ainsi, l'utilisation de vecteurs est nécessaire pour que l'ADN puisse passer la membrane plasmique avec une grande efficacité. Différents moyens sont actuellement disponibles.

b) Le transfert de gène viral

Les virus, de par leur longue évolution et leur tropisme cellulaire naturel, représentent des outils de choix pour la thérapie génique aussi bien en termes d'efficacité de pénétration intracellulaire que de persistance du matériel génétique. Ce sont donc naturellement les premiers vecteurs à avoir été utilisés. Ce sont aussi les plus utilisés avec notamment les rétrovirus et adénovirus. Les vecteurs viraux sont classés en deux grands groupes : ceux qui intègrent leur patrimoine génétique à l'ADN de la cellule hôte (lentivirus et rétrovirus) et ceux qui ne l'intègrent pas (virus adénoviraux, adénoassociés et herpétiques). Ces particules virales non-pathogènes sont employées pour de nombreuses applications *in vivo* et le type utilisé varie suivant le tissu ou les cellules ciblées. Au sein du laboratoire les activités thérapeutiques de l'OPG et de l'Oncostatine M (OSM) sur l'ostéosarcome ont ainsi pu être étudiées grâce à des vecteurs de type adénoviraux [45][102]. Malgré une production de protéines élevée, ces vecteurs présentent cependant de nombreux inconvénients :

- une intégration souvent difficile des transgènes de grande taille
- une apparition de réactions immunitaires en réponse à certains virus
- des problèmes de toxicité ou la possibilité pour certains virus de redevenir pathogènes après mutagenèse ou recombinaison avec un virus parent infectieux
- une manipulation et une production de lots cliniques compliquées et coûteuses
- un risque d'intégration aléatoire dans le génome de la cellule transfectée

Compte tenu de ces limites, des vecteurs synthétiques non viraux ont été développés.

c) Le transfert de gène non viral

Ce type de transfert de gène présente les avantages d'être peu immunogène et donc de permettre des administrations répétées, de ne pas avoir de taille limite théorique de la cassette d'expression et d'être facile et peu cher à produire. Ces méthodes sont actuellement en plein essor et depuis l'injection d'ADN plasmidique nu,

de nombreuses méthodes chimiques, physiques ou cellulaires ont été développées (Tableau 3).

Méthodes physiques	Méthodes chimiques
Microinjection Canon à ADN Jet injection Sonoporation Irradiation laser Injection hydrodynamique Electrotransfert	Polymères cationiques Dendrimères Lipides cationiques Copolymères à blocs amphiphile non ioniques

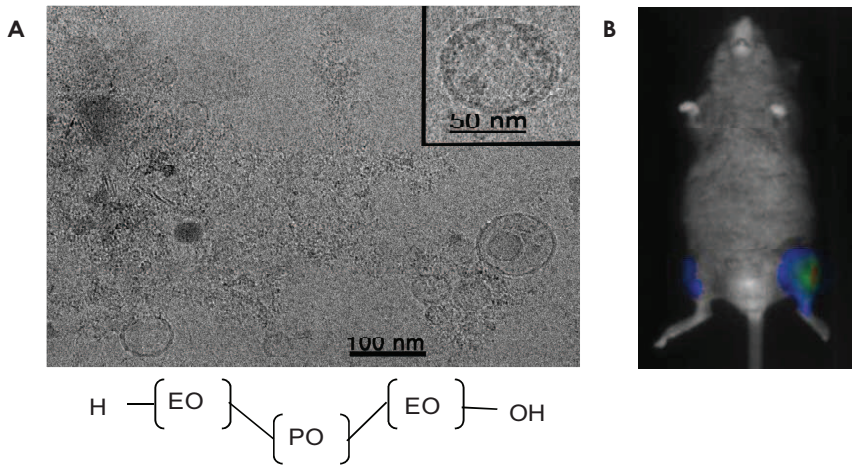
Tableau 3 : Les différentes méthodes de transfert de gène non viral.

Au sein du laboratoire, le faible coût et la facilité de mise en œuvre du transfert de gène non viral a montré un intérêt certain dans le but d'administrer *in vivo*, des protéines potentiellement thérapeutiques dans le cadre des tumeurs osseuses primitives. Nous avons pour cela utilisé deux grandes classes de vecteurs synthétiques, un copolymère amphiphile à bloc, le F68 (Lutrol®) et un lipide cationique, le KLN143. Nous nous sommes par la suite intéressés à un mode de transfert de gène physique, l'électrotransfert.

Copolymère amphiphile non ionique à bloc :

Les copolymères à blocs amphiphiles sont composés de motifs hydrophobes d'oxyde de propylène (OP) et de motifs hydrophiles d'oxyde d'éthylène (OE). Les polymères formés de blocs d'OE et d'OP agencés selon une structure linéaire A-B-A sont appelés Pluronics : $(EO)_x$–$(PO)_y$–$(EO)_x$. Ils se sont révélés efficaces pour de nombreuses applications en transfert de gènes. Ces polymères se sont en outre montrés efficaces pour surexprimer des protéines d'intérêt thérapeutique dans des modèles murins de pathologies humaines, au niveau local ou sécrétées. L'action de ces polymères repose sur des mécanismes agissant au niveau tissulaire, mais également au niveau cellulaire et permettent une amélioration drastique du transfert de gène *in vivo* comparé à l'injection d'ADN nu. Ces copolymères à blocs, amphiphiles, non viraux, non pathogènes, non immunogènes sont par ailleurs faciles à produire à l'échelle industrielle.

Au sein du laboratoire, différentes études ont été menées utilisant ce type de transfert de gène *in vivo*. Ainsi, l'Ostéoprotegérine (OPG) et RANK-Fc (une forme soluble du récepteur RANK) ont démontré leur intérêt thérapeutique dans des modèles expérimentaux d'ostéosarcome grâce à une administration d'un plasmide en association avec un copolymère amphiphile à bloc, le F68 (Lutrol®) [45] [Annexe 3, [103](Figure 22)].



<u>Figure 22 :</u> Structure du complexe Lutrol® (copolymère à bloc amphiphile non ionique)/ADN (A) et visualisation de l'efficacité du transfert de gène par bioluminescence *in vivo* après injection du complexe Lutrol / plasmide codant la luciférase (50 µg) (B).

L'injection du complexe est réalisée dans les 2 muscles tibiaux antérieurs et la protéine est produite par les fibres musculaires squelettiques. La réponse immunitaire induite par l'injection du complexe Lutrol / plasmide aboutit à une élimination rapide du transgène et une injection de complexe par semaine est nécessaire pour assurer des taux de protéines suffisants à l'induction d'un effet thérapeutique.

<u>Les lipides cationiques :</u>

Les lipides cationiques sont des molécules monomériques amphiphiles comportant 3 parties : une tête polaire, chargée positivement (permettant la liaison à l'ADN), une ou plusieurs chaînes hydrophobes et un domaine de liaison séparant les deux éléments (appelé aussi espaceur). Pour l'étude de l'efficacité thérapeutique de TRAIL dans le sarcome d'Ewing, nous avons choisi d'utiliser une sous-classe de lipide cationique de type Phosphonolipide, nommée KLN143 (Figure 23). *In vivo*, ce vecteur synthétique complexé à l'ADN plasmidique est administré par injection intra-veineuse dans le sinus rétro-obital de la souris. A la suite de cette injection, une forte expression du transgène

par les cellules épithéliales pulmonaires alvéolaires de type II a été montrée, aboutissant à une forte expression systémique de la protéine d'intérêt [104].

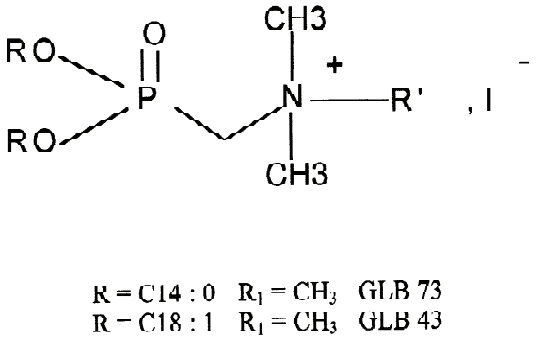


Figure 23 : Structure d'un Phosphonolipide cationique. [d'après Floch *et al.*, [105]]

Ce type de vecteur synthétique est légèrement immunogène et la réponse immunitaire qu'il déclenche a pour conséquence de les éliminer. Une administration par semaine du complexe Phosphonolipide / ADN est donc nécessaire pour obtenir une quantité de protéine circulante suffisante pour obtenir un effet thérapeutique. L'inconvénient majeur de l'utilisation de ce type de vecteur reste généralement une efficacité de transfection *in vivo* bien inférieure à celle de vecteurs viraux.

L'électrotransfert :

La bicouche lipidique de la membrane plasmique, faiblement conductrice, sépare deux solutions ayant une force ionique différente (le cytoplasme et le milieu extracellulaire) (Figure 24). La membrane se comporte donc comme un diélectrique et l'ensemble milieu externe, membrane, cytoplasme est modélisable par un condensateur en série avec des résistances.

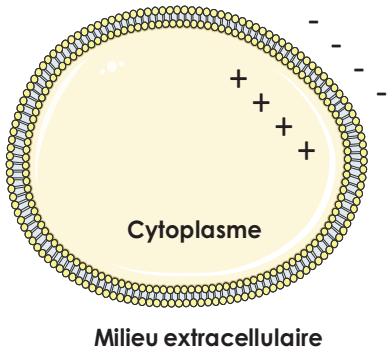


Figure 24 : Différence de potentiel entre les couches interne et externe de la membrane plasmique.

L'application d'un champ électrique uniforme induit un potentiel transmembranaire à l'origine de la perméabilisation. La différence de potentiel entre la membrane externe et la membrane interne d'une cellule est d'environ 70 mV. Si le potentiel transmembranaire dépasse une valeur seuil d'environ 200 mV, la membrane va se désorganiser et se perméabiliser. Plus la différence de potentiel entre la valeur seuil et la valeur appliquée est grande, plus la surface perméabilisée sera importante. Ainsi, en induisant cette perméabilité membranaire non spécifique, réversible et contrôlée, un accès direct au compartiment intracellulaire sera facilité pour des molécules non perméantes. Deux théories ont été émises concernant l'entrée de l'ADN au sein de la cellule lors de l'électrotransfert :

- Lors de l'application de la différence de potentiel, la membrane va se désorganiser et des « électropores » vont se former. L'ADN plasmidique pénétrerait ainsi la cellule par diffusion après une étape de liaison à la surface cellulaire.

- L'ADN plasmidique passerait la membrane pendant l'application des impulsions électriques grâce aux forces électrophorétiques associées au champ électrique.

De même qu'*in vitro*, la manière dont l'ADN pénètre dans les cellules *in vivo* n'est pas complètement élucidée. Le mécanisme serait comparable à celui décrit précédemment mais étendu à l'ensemble du tissu. Des impulsions électriques permettent d'augmenter le transfert de gène dans le muscle squelettique non seulement par un effet de perméabilisation mais également par un effet électrophorétique direct sur l'ADN, permettant sa migration et son entrée dans la cellule [106][107]. L'ADN plasmidique pénètre certainement dans la cellule selon ces deux principes mais d'autres mécanismes peuvent aussi être impliqués tel que le métabolisme énergétique (ATP et ADP).

Le principal intérêt de l'utilisation de l'électrotransfert *in vivo* pour nos études repose sur une production systémique de la protéine d'intérêt plus de 10 fois supérieure à celle obtenue avec l'utilisation de vecteurs synthétiques. Par ailleurs, cette production est aussi beaucoup plus stable dans le temps avec des taux élevés de protéine mesurés dans le sérum durant plusieurs semaines après l'électrotransfert. Ainsi, un seul électrotransfert est suffisant pour assurer une production satisfaisante de protéine durant toute l'expérimentation au lieu d'une injection par semaine avec les complexes vecteur synthétique / ADN.

IV. Objectifs de la thèse

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre entre deux mécanismes complémentaires : la formation et la résorption osseuse. Tout déséquilibre entre ces processus est à l'origine de pathologies qui peuvent être ostéocondensantes ou ostéolytiques, bénignes ou malignes. Le sarcome d'Ewing est la deuxième tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente après l'ostéosarcome et est très souvent associée à une forte ostéolyse. Les traitements actuels consistent en une polychimiothérapie néoadjuvante associée à une résection chirurgicale de la tumeur et une polychimiothérapie adjuvante. Ces traitements ont largement contribué à l'amélioration des taux de survie des patients mais l'espérance de vie de ceux présentant des métastases au moment du diagnostic ou une résistance à la chimiothérapie reste faible. De plus, les agents de chimiothérapie utilisés présentent une forte toxicité, de nombreux effets secondaires délétères et sont souvent mal tolérés chez les jeunes patients dont l'âge pédiatrique médian est de 12 ans. Il est donc nécessaire de développer pour ces tumeurs de nouvelles options thérapeutiques adjuvantes aux thérapies actuelles. Parmi celles-ci, une voie de recherche prometteuse pour le sarcome d'Ewing et les tumeurs osseuses primitives en général repose sur l'existence d'un cercle vicieux entre la prolifération tumorale et résorption osseuse. Le développement du sarcome d'Ewing a ainsi pour conséquence d'affecter rapidement la balance entre l'apposition et la résorption osseuse en faveur d'une forte dégradation osseuse aux abords de la tumeur. Lors de cette dégradation, des facteurs de croissance piégés dans la matrice extracellulaire osseuse sont libérés et vont stimuler la prolifération tumorale maligne. Les cellules tumorales vont à leur tour stimuler la résorption osseuse soit directement en sécrétant des facteurs pro-résorptifs, soit indirectement par l'intermédiaire des ostéoblastes et de la cytokine RANKL.

Nous avons choisi dans un premier temps de cibler les cellules tumorales avec l'étude de l'efficacité thérapeutique potentielle du TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), cytokine à forte activité anti-tumorale, dans le sarcome d'Ewing. L'effet de TRAIL a tout d'abord été évalué *in vitro* sur 8 lignées de sarcome d'Ewing disponibles au laboratoire, en termes de viabilité et prolifération cellulaire. D'après la littérature, TRAIL est capable d'induire l'apoptose des cellules tumorales d'une façon dépendante de la caspase-3. L'induction de l'apoptose et l'expression des récepteurs de TRAIL ont donc ensuite été étudiées dans les lignées de sarcome d'Ewing disponibles. Nous avons par la suite évalué l'efficacité thérapeutique de l'administration de TRAIL par transfert de gène non viral grâce à un vecteur synthétique de type Phosphonolipide cationique, le

KLN143, dans 2 modèles précliniques de sarcome d'Ewing. Ces modèles on été induits chez la souris Nude athymique par injection dans le muscle paratiblial de cellules tumorales sensibles à TRAIL *in vitro*. Les effets de cette administration ont été évalués en termes de développement tumoral, de survie des animaux et d'effets sur l'ostéolyse associée au développement tumoral.

Le principal obstacle à l'utilisation de TRAIL ou d'anticorps agonistes de ses récepteurs activateurs en clinique est l'apparition de phénomènes de résistance. Nous avons donc ensuite décidé de nous intéresser à l'origine de ces phénomènes dans le sarcome d'Ewing et plus précisément à l'implication de l'expression des récepteurs de TRAIL et d'un inhibiteur de sa voie signalisation : cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP). Nous avons dans un second temps tenté de sensibiliser des lignées résistantes disponibles au laboratoire par modification de ces cellules grâce à la technologie lentivirale.

Dans le contexte de l'ostéolyse tumorale associée au sarcome d'Ewing, l'équilibre apposition / résorption, est dérégulé. Notre objectif a donc aussi été de développer de nouvelles approches thérapeutiques innovantes qui ciblent la résorption osseuse. Plusieurs voies d'ostéoclastogénèse semblent être impliquées dans les lésions ostéolytiques associées au sarcome d'Ewing, impliquant principalement 3 cytokines : RANKL, M-CSF et TNF-a [108][109][110].

L'intérêt de l'inhibition de RANKL pour rompre le cercle vicieux grâce à l'administration de l'OPG et de RANK-Fc a déjà été démontré dans un modèle préclinique d'ostéosarcome POS-1 au sein du laboratoire [45][103]. Délivrées par transfert de gène non viral, ces deux molécules thérapeutiques ont été utilisées *in vivo* afin de bloquer la fixation de RANKL à son récepteur RANK. Les stratégies développées ont permis d'utiliser des outils novateurs : des modèles animaux originaux d'ostéosarcome chez la souris et le rat, ainsi que le transfert de gène à l'aide de vecteurs synthétiques en comparaison avec les vecteurs viraux. L'OPG et RANK-Fc se sont ainsi montrés capables de limiter le développement tumoral, d'accroître la survie des animaux et d'inhiber l'ostéolyse associée au développement de l'ostéosarcome. Nous avons donc voulu transposer ces résultats au sarcome d'Ewing qui présente le même type d'atteintes osseuses que le modèle d'ostéosarcome utilisé dans ces études et ainsi de déterminer l'importance du cercle vicieux dans le développement de cette pathologie. L'effet de l'administration de l'OPG et du TNF-Receptor1 (TNF-R1, récepteur soluble du TNF-a) par électrotransfert a été évalué en termes d'inhibition du développement tumoral et de protection contre les lésions ostéolytiques, sur plusieurs modèles précliniques de sarcome d'Ewing développé chez la souris Nude.

RESULTATS

PARTIE I :

Etude de l'efficacité thérapeutique de TRAIL dans le sarcome d'Ewing

I. Introduction: utilisation de TRAIL dans le traitement des cancers

1) TRAIL : structure et fonction

TRAIL (Apo2L) est un membre de la super famille du TNF découvert de façon indépendante par 2 équipes qui ont toutes deux rapporté une homologie de séquence avec le domaine extracellulaire de CD95 Ligand (Fas-L)(28%) et du TNF (23%) [111][112]. Localisé sur le chromosome 3, le gène de 20 kb qui code la protéine TRAIL est composé de 5 exons et de 4 introns. A l'inverse des autres membres de la superfamille du TNF dont l'expression est souvent inductible et détectée de façon transitoire au niveau des cellules activées, l'ARN messager de TRAIL a été identifié de façon constitutive dans la plupart des tissus humains avec une expression significativement plus importante dans la rate et la prostate [112]. TRAIL, comme les autres membres de la superfamille du TNF est exprimé sous la forme d'une protéine transmembranaire de type II composée de 281 acides aminés dans sa forme humaine. Le clivage de sa partie C-terminale (domaine extracellulaire) libère une forme soluble de la protéine [113]. La structure cristallographique de la forme monomérique TRAIL présente par ailleurs une forte homologie avec les structures du TNF et CD40 Ligand [114]. TRAIL se présente sous forme homotrimérique pour se fixer à ses récepteurs. La forme trimérique de la protéine est biologiquement beaucoup plus active que sa forme monomérique [112](Figure 25).

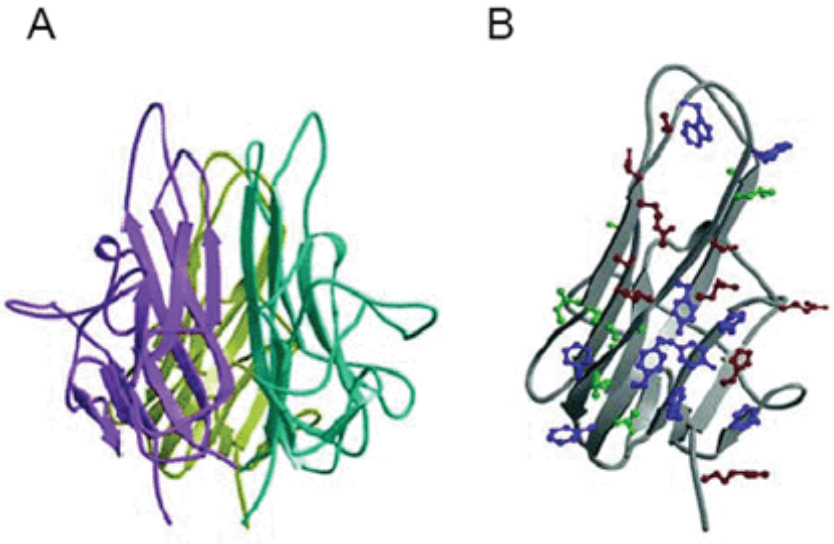


Figure 25 : Structure cristallographique de TRAIL. Structure de la forme trimérique de TRAIL (A) et structure monomérique de TRAIL illustrant les résidus impliqués dans la trimérisaion : en violet : les cycles aromatiques, en vert : les résidus hydrophobes et en marron les résidus polaires [d'après Kimberley *et al.*, [113]].

La capacité de TRAIL à induire l'apoptose des cellules transformées a été démontrée mais son rôle physiologique n'est pas encore bien défini. Les souris déficientes pour son récepteur ou pour la forme murine de TRAIL sont viables et se développent normalement, ce qui suggère une absence de rôle de cette voie de signalisation dans le développement embryonnaire [115][116]. TRAIL est exprimé spécifiquement à la surface des cellules Natural Killer (NK), des lymphocytes T cytotoxiques, des macrophages et des cellules dendritiques. La transcritpion de son ARN messager peut être induite par l'interféron de type I [117]. L'expression sélective de TRAIL à la surface des cellules effectrices du système immunitaire suggère un rôle de TRAIL dans la formation du répertoire immun et dans la régulation de la réponse immunitaire. Des études réalisées chez l'homme et dans des modèles animaux suggèrent que TRAIL joue un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire dans le but d'éviter des réactions excessives vis-à-vis d'agents infectieux comme la listéria ou le cytomégalovirus [115][118] et d'auto-antigènes impliqués dans des pathologies auto-immunes telles que l'arthrite, le diabète et la sclérose multiple [119][120][121]. D'autres études suggèrent que TRAIL aurait un rôle de suppresseur de tumeur et aprticiperait ainsi à la surveillance immunitaire contre le développement de tumeurs primitives ou de métastases. Ainsi, chez la souris, l'inhibition de l'activité de TRAIL par Knock Out (KO) génétique, grâce à des anticorps bloquant ou encore par inhibition de la forme murin de DR5 a confirmé ce rôle de suppression de tumeur dans des modèles spontanés ou induits de métastases issues de lymphome ou de carcinome cutané [122][123][124]. Par ailleurs, une étude récente réalisée sur 368 échantillons de tumeurs mammaires humaines a montré une corrélation entre une sous régulation de TRAIL dans ces tumeurs et la présence de métastases au niveau du cerveau [125]. Si le rôle de TRAIL dans l'inhibition du développement métastatique a été bien montré, son rôle dans la suppression des tumeurs primaires reste encore discuté. Ainsi, les souris déficientes pour TRAIL ne développent pas plus de tumeurs spontanées que les souris sauvages et le développement de tumeurs cutanées en réponse à des agents chimiques cancérogènes n'est pas non plus augmenté [124].

2) Les récepteurs de TRAIL

TRAIL est capable d'interagir avec 5 récepteurs : 2 récepteurs de mort [Death Receptor (DR)] et 3 récepteurs leurres. Il est ainsi capable de se lier aux récepteurs de mort DR4 / TRAIL-R1 / TNFRSF10A et DR5 / TRAIL-R2 / KILLER / TNFRSF10B, pouvant transduire un signal de mort et aux récepteurs leurres DcR1 / TRAIL-R3 / TNFRSF10C et DcR2 / TRAIL-R4 / TNFRSF10D [126][127][128](Figure 26). Il a été montré que TRAIL est

capable de se fixer à ses récepteurs activateurs avec une plus forte affinité qu'à DcR1 et DcR2 [129]. En plus d'interagir avec ces 4 récepteurs membranaires, TRAIL est capable de fixer avec une faible affinité un troisième récepteur leurre soluble, l'OPG [130]. Chez la souris en revanche TRAIL ne peut se fixer que sur un seul récepteur de mort mDR5 (mTRAILR2 / mKILLER) qui partage le même degré d'homologie pour DR4 et DR5 [131].

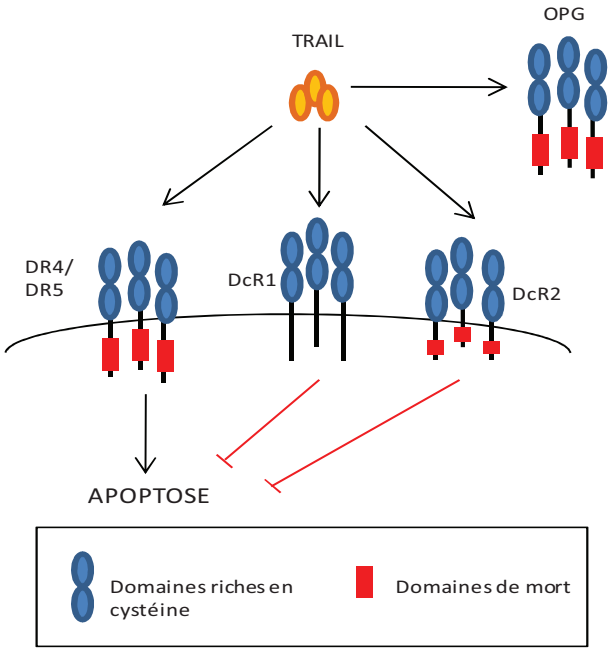


Figure 26 : Les récepteurs de TRAIL.

Les récepteurs de mort, DR4 et DR5 :

Les récepteurs DR4 et DR5 sont des protéines transmembranaires de type I contenant dans leur domaine intracytoplasmique un domaine de mort [Death Domain (DD)] capable de se lier à d'autres domaines de mort. Il a été longtemps supposé que les récepteurs de mort étaient retrouvés au niveau de la membrane sous forme monomérique et se trimerisaient uniquement lors de la fixation de leur ligand trimérique. A présent, de nombreux indices laissent penser que ces récepteurs seraient déjà oligomériques avant la fixation de leur ligand [132][133]. L'expression de DR4 et DR5 est par ailleurs régulée par p53 [134]. Ainsi, le gène codant DR5 possède dans son promoteur un élément de réponse pour p53 et il est surexprimé en réponse à une irradiation aux rayons γ par l'intermédiaire de p53 [135][136]. Des régulations post-traductionnelles des récepteurs DR4 et DR5 telles que la glycosylation et la palmitoylation ont par ailleurs été montrées comme étant des régulateurs importants de la signalisation induite par TRAIL.

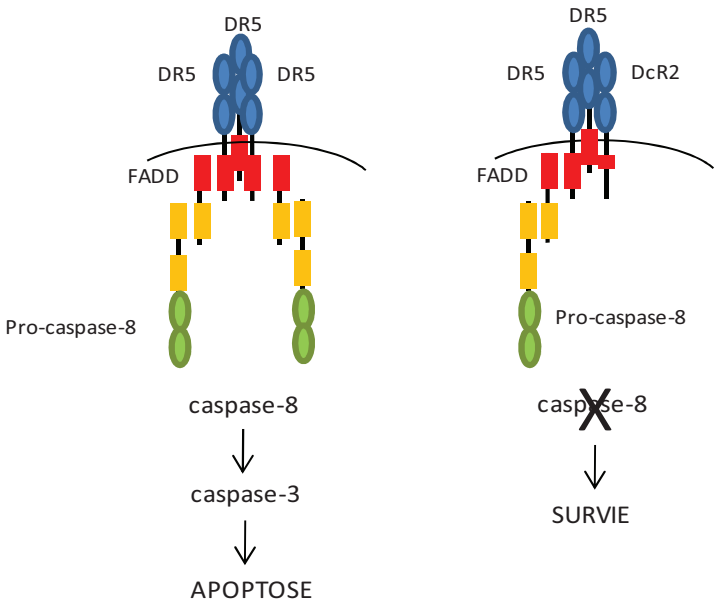


Figure 27 : Mode d'action de DcR2.

Ainsi, il existe une corrélation entre l'expression de l'enzyme initiatrice de la glycosylation GALNT14 et la sensibilité à TRAIL de cellules de carcinome pancréatique, de cancer du poumon et de mélanome malin [137]. Ces O-glycosylation ne semblent cependant pas altérer l'expression de DR4 et de DR5 à la membrane, ni leur affinité pour TRAIL. Elles sembleraient en revanche, avoir une incidence sur l'oligomerisation des récepteurs en réponse à la fixation de TRAIL, celle-ci étant nécessaire à la formation du complexe Death-Inducing Signaling Complex (DISC) et à l'activation de la caspase 8. Concernant la palmitoylation, elle serait nécessaire à la localisation de DR4 dans les radeaux lipidiques, permettant sa trimerisation en absence de ligand mais l'effet de son inhibition sur la sensibilité à TRAIL des cellules tumorales n'a pas encore été montré [138]. La fixation d'un ligand sur ses récepteurs induit souvent une endocytose du complexe ligand-récepteur et le rôle de cette internalisation a été récemment étudié en ce qui concerne la voie de signalisation de TRAIL. Après fixation de TRAIL, DR4 et DR5 sont tous deux internalisés par un mécanisme dépendant de la dynamine [139][140]. Le rôle biologique de cette endocytose est à l'heure actuelle mal connu et son inhibition ne semble pas influer sur l'induction de l'apoptose induite par TRAIL [139][140].

Les récepteurs leurres DcR1 et DcR2 :

L'expression de ces deux récepteurs peut prévenir l'induction de l'apoptose dans différentes lignées humaines tumorales telles que des lignées de lymphome, de carcinome du rein, du sein et de la prostate [141][142][143] mais leur implication dans la résistance à TRAIL reste cependant controversée [144]. Concernant, leurs modes d'action, DcR1 est un récepteur avec un ancrage GlycoPhosphatidylInositol (GPI) mais sans domaines intracellulaires et donc capable de séquestrer TRAIL dans les radeaux lipidiques. DcR2 lui, possède un domaine de mort tronqué et va interagir avec DR5 pour former un hétérotrimère au niveau du complexe DISC pour inhiber l'activation de la caspase-8 [145], cette interaction aurait même lieu en amont de l'interaction avec TRAIL [129] (Figure 27).

3) Les voies de signalisation apoptotiques de TRAIL : induction des voies extrinsèque et intrinsèque

La fixation de TRAIL à ses récepteurs de morts, DR4 ou DR5, induit le changement de conformation de leurs domaines de mort ce qui, avec leur oligomérisation, représente l'activation fonctionnelle du récepteur. Cette activation va induire le recrutement de Fas-Associated protein with Death Domain (FADD) sur les récepteurs de mort par interaction de leurs Domaines de mort (DD) respectifs (Figure 28).

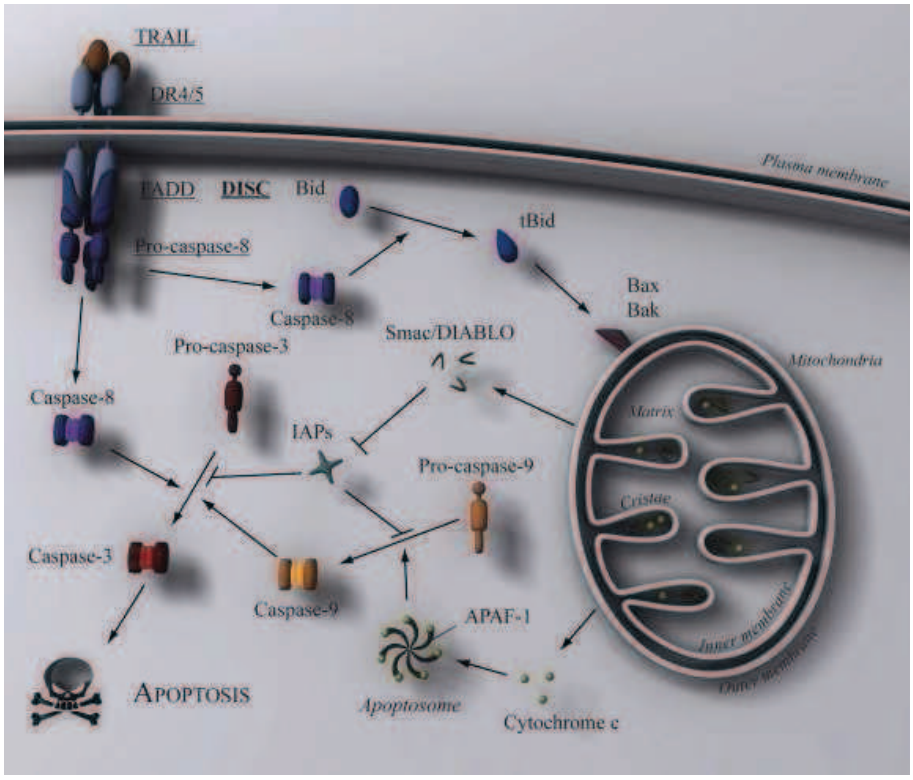


Figure 28 : Voie de signalisation de DR4 et 5 induite par TRAIL. [D'après Mellier *et al.*, [146]]

Agissant comme une protéine adaptatrice, FADD va permettre le recrutement de la procaspase-8 / -10 par interaction de leur Death Effector Domains (DED) respectifs [147]. Le complexe multiprotéique résultant de ces associations porte le nom de DISC et induit l'auto-activation des caspases initiatrices [148]. En réponse à leur activation, les caspases-8 et 10 vont induire le clivage protéolytique de la caspase-3 effectrice qui va elle-même cliver d'autres caspases ainsi que d'autres régulateurs et protéines structurales [149]. Ceci va aboutir à un bourgeonnement de la membrane plasmique, une condensation du noyau et un clivage de la chromatine conduisant à l'apoptose de

la cellule dite de type extrinsèque (voie des récepteurs de mort) [150]. Un pont entre l'apoptose de type extrinsèque et de type intrinsèque (mitochondriale) existe grâce à la protéine BH3-interacting domain death agonist (Bid), un membre de la famille B-CELL/Lymphoma 2 (Bcl-2), substrat de la caspase 8. Selon le type cellulaire, le clivage de Bid (p22) en tBid (p15) va entrer ou non dans le mécanisme primaire d'induction d'apoptose en réponse à TRAIL. Dans les cellules de Type I (indépendante de la voie intrinsèque), la surexpression de la protéine Bcl-2 bloque les modifications mitochondriales aboutissant à l'apoptose par la voie intrinsèque mais le complexe DISC active suffisamment de caspase-8 pour stimuler les caspases effectrices et induire directement l'apoptose par la voie extrinsèque. Dans les cellules de Type II (dépendante de la vie intrinsèque) en revanche, une quantité moindre de caspase-8 est activée et une amplification du signal par la voie intrinsèque est nécessaire [151]. La présence ou non des protéines X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) et sa régulation négative de l'activaion de la caspase 3, pourrait aussi être impliquée dans cette catégorisation des cellules. La forme clivée de la protéine Bid, tBid engage la voie intrinsèque de l'apoptose par fixation à la protéine Bcl-2-associated X (BAX) et Bcl-2 homologous antagonist killer (BAK). Ceci va aboutir à leur oligomérisation et à leur translocation à la membrane externe de la mitochondrie, initiant la perméablisation de cette membrane [152]. Des protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome c et Second mitochondria-derived activator of caspase / direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI (Smac/DIABLO), normalement localisées dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie vont ainsi être libérées dans le cytosol.[153] Le cytochrome c s'associe avec l'ATP et l'Apoptotic Peptidase Activating Factor-I (APAF-1) pour former une structure appelée apoptosome, qui va induire l'activation de la caspase-9. En retour, la caspase-9 va activer les caspase-3, -6 et -7 aboutissant à l'apoptose de la cellule dite voie intrinsèque [154].

4) Les voies de signalisation non apoptotiques

De nombreuses études ont montré que TRAIL ne serait pas uniquement impliqué dans l'induction de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort mais serait aussi capable d'induire des signaux de survie et de prolifération cellulaire. L'activation de nuclear Factor κB (NFκB) se ferait via les récepteurs DR4, DR5 et DcR2 grâce à la formation d'un complexe de signalisation secondaire généré après la formation du complexe DISC [155][156](Figure 29).

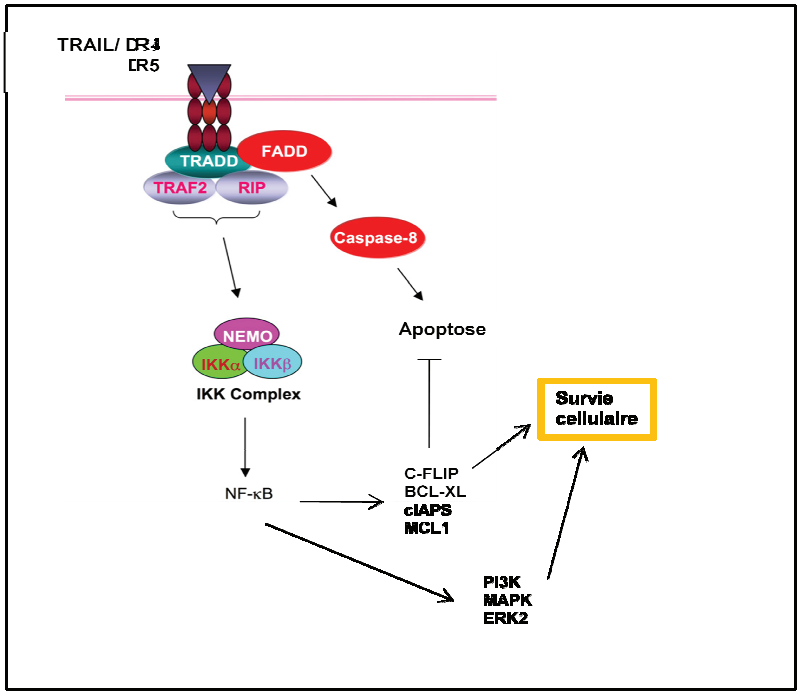


Figure 29 : Les voies de signalisation non apoptotiques de TRAIL. [Adapté de la publication de Li *et al.*, [157]]

Ce complexe impliquerait FADD, la caspase-8 activée, le Receptor Interacting Protein 1 (RIP1), TNF-Receptor Associated Protein (TRAF-2), TNF-Receptor Associated Death Domain (TRADD) et Inhibitor of KB Kinase (IKKγ)/NEMO [157]. Ainsi, après son recrutement, RIP va interagir avec IKKγ, aboutissant au recrutement de IKKa et β qui vont phosphoryler l'Inhibitor of κB (IκB), induisant sa dégradation protéolytique et l'activation de NFκB. Cette activation de NFκB serait capable d'induire la survie cellulaire via la surexpression de diverses protéines anti-apoptotiques telles que c-FLIP, BCL-extra large (BCL-Xl), Myeloid cell leukemia sequence 1 (MCL1) et cIAPS [158][159]. De plus, ce complexe est capable d'induire des signaux de survie impliquant la PhosphoInositide 3-Kinase (PI3K)-Akt et des mitogen-activated protein kinase (MAPK : Jun-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase 2 (Erk2) et p38) [160][161]. Il semblerait que dans les cellules résistantes, le principal signal induit par TRAIL implique NFκB. Une étude sur une forme résistante à l'apoptose de cholangiocarcinome a en effet montré que cette activation de NFκB peut promouvoir l'invasion et la formation de métastases [162]. De même, dans un modèle préclinique d'adénocarcinome résistant à l'apoptose induit chez la souris Severe combined ImmunoDeficiency (SCID), un traitement par TRAIL augmente la formation de métastases [158].

5) Utilisation de TRAIL dans la thérapie des cancers

a) Etudes précliniques

Durant les 10 dernières années, TRAIL s'est imposé comme le plus prometteur des membres de la superfamille du TNF pour une utilisation dans la thérapie des cancers. Cet intérêt est né de la capacité de TRAIL à induire spécifiquement l'apoptose de lignées cellulaires dérivées de tumeurs solides ou hématologiques en association avec divers agents de chimiothérapie ou des radiations, *in vitro* mais surtout *in vivo* [112][111] [163][164][165][166][167][168][169] sans effets notables sur les cellules normales. Ces résultats sur l'acitivté anti-tumorale spécifique de TRAIL suggérent qu'il pourrait être un meilleur candidat pour une utilisation clinique que le CD95L ou le TNF qui présentent des effets secondaires délétaires *in vivo*. Cependant, l'utilisation de TRAIL comme agent thérapeutique dans des essais cliniques a été retardée en raison d'études *in vitro* ayant mis en évidence l'induction d'apoptose sur des cultures d'hépatocytes traités par une forme recombinante de TRAIL (rhTRAIL) [170][171][172]. Cependant, toutes les formes recombinantes de TRAIL utilisées dans ces études possédaient un Tag exogène polyhistidine ou flag. Ces formes taguées possédent une structure tertiaire aberrante induisant une suragrégation des récepteurs, responsables des effets secondaires sur les hépatocytes [171]. Depuis, il a été montré que la forme recombinante non taguée de TRAIL induit spécifiquement l'apoptose des cellules tumorales sans effets secondaires sur les hépatocytes [173].

b) Essais cliniques

Des essais cliniques ont été réalisés pour évaluer le potentiel antitumoral de TRAIL sur des tumeurs solides et hématologiques. Un essai clinique de phase 1 pour étudier la pharmacocinétique et l'innocuité de rhTRAIL a été réalisé sur 51 patients adultes dont 36 présentant des cancers colorectaux, des ovaires, des poumons et des mélanomes [174]. Ces patients ont été traités par des doses de 15 mg/kg de rhTRAIL. Durant cet essai, TRAIL n'a démontré aucune toxicité et aucun anticorps dirigé contre TRAIL n'a été détecté.

Suivant des essais précliniques ayant montré une potentialisation de l'effet de TRAIL en association avec des agents chimiothérapeutiques [175][176], un essai clinique de phase Ib a été réalisé avec une association de rhTRAIL avec du rituximab sur des patients présentant un lymphome non Hodgkinien de bas grade [174]. Sur 7 patients, 2 ont présenté une réponse complète, 1 a présenté une réponse partielle et 2 ont présenté

une stabilisation de la maladie. Cette étude a mis en évidence qu'une combinaison de rhTRAIL et rituximab apparait sans effets secondaires et possède une activité positive sur ces patients. Un autre essai clinique a été réalisé cette fois avec une combinaison de rhTRAIL et de l'association paclitaxel, carboplatin et bevacizumab sur des patients présentant un cancer avancé des poumons. Une fois de plus l'innocuité de l'association de rhTRAIL avec des agents de chimiothérapie ainsi qu'une efficacité antitumorale prometteuse ont été observés. Dans cet essai clinique, sur 18 patients, 10 ont présenté une réponse confirmée (9 partielles et une complète) avec un taux de réponse de 56%. Au vu de ces résultats prometteurs, un essai clinique de phase 2 est actuellement en cours sur la même pathologie. En raison des réserves émises initialement sur la possible hépatotoxicité de rhTRAIL, des anticorps monoclonaux agonistes de ses récepteurs activateurs ont été développés.

Plusieurs essais cliniques de phase I et II sont en cours ou ont été menés avec l'anticorps agoniste de DR4, le mapatumumab, associé ou non à des agents de chimiothérapie tels que paclitaxel plus carboplatin ou gemcitabine plus cisplatin, sur des tumeurs solides avancées ou des lymphomes non Hodgkinien (récidivants ou résistants) [177][178][179][180][181][182][183]. Ce dernier est bien toléré et possède une demi-vie d'environ 18 jours. Des patients ont montré des bénéfices cliniques avec des réponses partielles ou des stabilisations de la maladie. Cependant, des marqueurs hépatiques élevés ont été mesurés chez certain patients, certainement dus à l'administration du mapatumumab. Des essais cliniques de phase I ont également été menés avec l'anticorps agoniste de DR5, le lexatumumab sur des patients présentant des tumeurs solides avancées en association ou non avec un cocktail d'agents de chimiothérapie composé de gemcitabime, premetrexeb, doxorubicin, et FOLFIRI (leuvovorin, fluorouracil et irinotecan) [184][185]. Cet anticorp est bien toléré et possède une demi-vie d'environ 16 jours. Là encore certains patients ont présenté des stabilisations de la maladie et des réponses partielles.

L'apomab [186], un autre anticorps agoniste de DR5 est testé au cours d'un essai clinique de Phase I sur des tumeurs solides avancées résistantes aux traitements. Sa demi vie s'est avérée être de 15-20 jours et il est égalementi bien toléré. Aucune réponse objective n'a été observée mais 2 patients ont semblé présenter des bénéfices cliniques.

II. Article 1

« Preuves précliniques du bénéfice thérapeutique de TRAIL dans l'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing : inhibition de la croissance tumorale, prévention de l'apparition de lésions osseuse ostéolytiques et accroissement de la survie des animaux »

G. Picarda, F. Lamoureux, L. Geffroy, P. Delepine, T. Montier, K. Laud, F. Tirode, O. Delattre, D. Heymann, F. Rédini, **Clinical Cancer Research.** 2010, Apr 15;16(8):2363-74

L'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing sont des tumeurs osseuses primitives touchant principalement les os des enfants et des adolescents. Malgré les progrès réalisés dans la prise en charge thérapeutique des patients, les taux de survie à 5 ans des patients résistant aux traitements ou présentant des métastases au moment du diagnostic avoisinent seulement les 20%. Parmi les nouvelles approches thérapeutiques proposées, la cytokine TRAIL, membre de la superfamille du TNF qui possède une forte activité anti-tumorale et une toxicité minimale pour la plupart des cellules normales non transformées, représente une option prometteuse. Son efficacité a été évaluée *in vitro* et dans des modèles précliniques.

La sensibilité à TRAIL de lignées cellulaires de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome a été évaluée *in vitro* en étudiant l'expression de ses récepteurs et les effets de traitements par TRAIL sur la viabilité cellulaire. Des études précliniques complémentaires ont été réalisées dans des modèles expérimentaux de tumeurs induites par l'injection de cellules tumorales d'ostéosarcome ou de sarcome d'Ewing en site paratibial. En complément, un modèle de dissémination a été développé par l'injection de cellules d'ostéosarcome par voie intra veineuse.

In vitro, les lignées cellulaires de sarcome d'Ewing et d'ostéosarcome expriment les récepteurs activateurs de TRAIL, DR4 et DR5 et sont sensibles à l'apoptose dépendante de la caspase-8 induite par TRAIL. Administré par transfert de gène non viral, TRAIL réduit l'incidence et le développement tumoral de 87% et prévient l'ostéolyse associée au développement tumoral, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la survie d'un facteur 2, 40 jours après l'induction de la tumeur. Par ailleurs, TRAIL inhibe la dissémination métastatique pulmonaire dans un modèle d'ostéosarcome induit par injection de cellules tumorales en site intraveineux.

Ces résultats suggèrent que TRAIL est un candidat prometteur pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing.

Published OnlineFirst April 14, 2010; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

Cancer Therapy: Preclinical

Clinical Cancer Research

Preclinical Evidence that Use of TRAIL in Ewing's Sarcoma and Osteosarcoma Therapy Inhibits Tumor Growth, Prevents Osteolysis, and Increases Animal Survival

Gaëlle Picarda[1], François Lamoureux[1], Loïc Geffroy[2], Pascal Delepine[3], Tristan Montier[3], Karine Laud[4], Franck Tirode[4], Olivier Delattre[4], Dominique Heymann[1], and Françoise Rédini[1]

Abstract

Purpose: Osteosarcoma and Ewing's sarcoma are high-grade neoplasms typically arising in the bones of children and adolescents. Despite improvement in therapy, the five-year survival rate is only 20% for patients not responding to treatment or presenting with metastases. Among new therapeutic strategies, the efficacy of tumor necrosis factor (TNF)–related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), a member of the TNF superfamily with strong antitumoral activity and minimal toxicity to most normal cells and tissues, was investigated by complementary approaches both *in vitro* and in preclinical models.

Experimental design: The sensitivity of osteosarcoma and Ewing's sarcoma cell lines to TRAIL was investigated *in vitro* by determining TRAIL receptor expression together with TRAIL effects on cell viability and apoptosis. Complementary preclinical studies were carried out in respective tumor models by inoculation of osteosarcoma or Ewing's sarcoma tumor cells in paraosseous location. In addition, a model of lung nodule dissemination was developed by i.v. injection of osteosarcoma cells.

Results: *In vitro,* both osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells that express the TRAIL death receptors were highly sensitive to TRAIL-induced caspase-8–mediated apoptosis. TRAIL administered *in vivo* by nonviral gene therapy inhibited primary bone tumor incidence and growth by 87% and prevented tumor-induced osteolysis, leading to a significant 2-fold increase in animal survival 40 days after tumor induction. Furthermore, TRAIL inhibited tumor nodule dissemination in lungs and increased survival in an osteosarcoma model.

Conclusion: These findings suggest that TRAIL is a promising candidate for the development of new therapeutic strategies in the most frequent malignant primary bone tumors. *Clin Cancer Res; 16(8); 2363–74.* ©*2010 AACR.*

Bone sarcomas are rare malignancies diagnosed in fewer than 700 individuals per year in the United States. Osteosarcoma, the most common primary malignant bone tumor in both children and adults, is characterized by the development of bone or osteoid substance by the tumor cells (1). The disease develops mainly in young patients between ages 10 and 25 years with a peak of incidence at 18 years (2). Current therapeutic protocols consist in neoadjuvant and adjuvant poly-chemotherapy associated to definitive surgery with limb salvage. The rate of long-term survival is 50% to 70% at 5 years for patients with localized tumor but only 15% to 20% when pulmonary metastases are detected at diagnosis or not responding to therapy, or with disease relapse. Ewing's sarcoma is a high-grade neoplasm that accounts for approximately half of osteosarcoma cases in children, representing 2% of childhood cancers with a peak incidence at age 15 years (3–5). It is characterized by a rapid tumor growth and extensive bone destruction that can result in bone pain and pathologic fracture (6). Ewing's tumors show a typical chromosomal translocation in >90% of cases linking the *EWS* gene on chromosome 22q12 to a member of the ETS transcription gene family, most commonly to Fli-1 on 11q24 (7, 8), leading to an aberrant transcription factor that promotes tumorigenicity (9–11). Current treatment consists of several rounds of multidrug cytostatic therapy combined with surgery and radiotherapy for local control. With the use of alkylating agents, long-term survival can

Authors' Affiliations: [1]Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale UMR_S 957, Université de Nantes EA 3822, Nantes Atlantique Universités, Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives and [2]Service de pédiatrie, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France; [3]Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale UMR 613, IBISA, Université de Bretagne occidentale, Brest, France; and [4]Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale UMR 830, Institut Curie, Paris, France

Corresponding Author: Françoise Rédini, Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale UMR 957, Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France. Phone: 33-0-240-412-842; Fax: 33-0-240-412-860; E-mail: francoise.redini@univ-nantes.fr.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

©2010 American Association for Cancer Research.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 14, 2010; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

Translational Relevance

Despite improvement in therapy, the five-year survival rate for the two more frequent primary bone tumors in children (osteosarcoma and Ewing's sarcoma) is only 20% for patients not responding to treatment or presenting with metastases. The results of preclinical studies presented in this article show the proof of concept of the beneficial use of tumor necrosis factor–related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in osteosarcoma and Ewing's sarcoma therapy. These data could be easily translated to cancer medicine given that agonist antibodies to TRAIL death receptors are already tested in clinical trial with encouraging results in solid tumors other than primary bone tumors. Furthermore, we showed that the expression of death receptor is a prerequisite for TRAIL sensitivity in bone tumor cell lines. Given that 70% of osteosarcoma and Ewing's sarcoma biopsies express DR4 or DR5, it can be suggested that these patients may benefit from such TRAIL therapy.

be achieved in >50% of patients with localized disease, whereas patients with clinically detectable metastases at diagnosis or who are not responding to therapy have a significantly poorer prognosis, with long-term survival decreasing to 15% to 25%, especially for patients with bone metastases (12).

As the survival rates for metastatic and relapsed osteosarcoma or Ewing's sarcoma patients have not changed in the past 30 years despite the use of intensive chemotherapy (13), new therapeutic approaches are therefore needed.

Tumor necrosis factor (TNF)–related apoptosis-inducing ligand (TRAIL or APO-2L) is a member of the TNF superfamily that has a strong antitumor activity in a wide range of cancer cell lines while being minimally cytotoxic to most normal cells and tissues (14). TRAIL is able to bind five cognate receptors: two death receptors acting as activating receptors [DR4 (TRAIL-R1) and DR5 (TRAIL-R2)] and three decoy receptors [DcR1 (TRAIL-R4), DcR2 (TRAIL-R5), and secreted osteoprotegerin (OPG); ref. 15]. The TRAIL decoy receptors are unable to trigger a death signal because they lack a functional death domain (16). TRAIL activates the extrinsic apoptotic pathway by inducing Fas-associated death domain protein recruitment to the death domain, leading to caspase-8 activation and caspase-3 cleavage (17). In addition, it has been shown that TRAIL can induce the mitochondrial apoptotic pathway through caspase-8 activation followed by NFκB and Bid recruitment (18). Clinical trials are currently in progress testing fully humanized activating monoclonal antibodies directed against DR4 or DR5. Two phase 1 studies targeting DR4 (Mapatumab, HGS-ETR1, TRM-1; ref. 19) or DR5 (Lexatumumab; ref. 20) are currently carried out in patients with solid malignancies and a phase 2 study with lexatumumab is in progress in patients with solid tumors (21). These studies show promising results on tumor progression, but over a limited time span. Except hepatic toxicity, the major limitation of the therapeutic use of TRAIL is the resistance that occurs in cancer cell lines, which can be attributed to dysfunctions in the TRAIL signaling pathway (16, 22, 23).

In the present study, complementary experimental approaches were used to study TRAIL mechanism of action on osteosarcoma and Ewing's sarcoma cell lines *in vitro*. Then, its potential therapeutic interest was investigated by gene transfer *in vivo* in respective tumor models induced by osteosarcoma POS-1 and Ewing's sarcoma A673 cell inoculation in mice. The results showed antitumor effects of TRAIL in both models, with significant prevention of bone lesions, inhibition of bone tumor development, and increased survival rates. TRAIL also diminished lung nodule dissemination induced by osteosarcoma cells.

Materials and Methods

Cell lines

Ewing's sarcoma. Eight human Ewing's sarcoma cell lines were used. A673, TC32, SKES1, SKNMC, and RDES cell lines were kindly provided by Dr. S. Burchill (Children's Hospital, Leeds, United Kingdom) and the EW24, TC71, and EW7 by Dr. O. Delattre (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale U830, Paris, France). The cell lines A673, TC32, SKES1, and RDES were cultured in DMEM (BioWhittaker) with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone) and SKNMC, EW24, TC71, and EW7 cells were cultured in RPMI (BioWhittaker) with 10% FBS. In addition, EW7 cells require type I collagen to grow.

Osteosarcoma. Seven osteosarcoma cell lines were studied as follows: human HOS, U2OS, MG63, rat ROS and OSRGa, and mouse POS-1, MOS-J. The mouse POS-1 osteosarcoma cell line was kindly provided by Dr. A. Kamijo (Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, Japan; ref. 24). Rat osteosarcoma OSRGA cell line was established from a initially radioinduced osteosarcoma (25). Murine MOS-J osteosarcoma cell line was kindly provided by Dr. L. Shultz (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine; ref. 26); Human MG63, U2OS, HOS, and rat ROS cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (Promochem). All cell lines were cultured in DMEM (Lonza) supplemented with 5% FCS (Hyclone) and 2 mmol/L L-glutamine (Lonza) except the POS-1 and MOS-J cell lines, which were cultured in RPMI (Lonza) supplemented with 10% FCS and 2 mmol/L L-glutamine.

Other. Cells (2.93) derived from human fetal kidney used in *in vitro* cell transfection assays (27) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 2 mmol/L L-glutamine.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 14, 2010; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

In vitro experiments

Plasmid constructs. The pBF42-hTRAIL construct (kindly provided by Dr. B. Fang, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas), contains the DNA sequence encoding human TRAIL inserted into the pBF42 plasmid between the *Xho1* and *BamH1* sites. For both *in vitro* and *in vivo* studies, the empty pBF42 plasmid was used as control.

Cell transfection. To assess the cellular expression of hTRAIL, 80% confluent 2.93 cells in six-well plates were transfected with 8 μg of pBF42 or pBF42-hTRAIL using a synthetic transfection reagent, the lipophosphoramide KLN143. Transfections were done in serum-free optiMEM, and after 2 h and 30 min at 37°C, the transfection medium was replaced by 2 mL of DMEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (complete medium). The transfection efficiency was quantified *in vitro* by using the pEGFP-N3 construct encoding the green fluorescent protein. Expression of the hTRAIL transgene was quantified at the protein level 48 h after transfection. In addition, to validate the biological activity of pBF42-hTRAIL *in vitro*, the proliferation of pBF42-TRAIL–transfected A673 cells was compared with the proliferation of pBF42-transfected cells during 72 h, by using the proliferation assay described below.

Cell proliferation and viability. Subconfluent cultures of osteosarcoma or Ewing's sarcoma cells in 96-well plates were treated for 72 h with 50 ng/mL^{-1} hTRAIL (R&D systems). Cell viability was determined using the sodium 3′[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate (XTT) cell proliferation reagent assay kit (Roche). Cell viability was also assessed by trypan blue exclusion. The percentage of cells exhibiting intracytoplasmic trypan blue staining was determined using a Malassez counting chamber.

Apoptosis. Subconfluent tumor cells cultured in 24-well plates were treated with 50 ng/mL TRAIL for 1 to 6 h, washed, and lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer [150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris (pH 7.4), 1% NP40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mmol/L Na_3VO_4, 0.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mmol/L NaF, 10 μg/mL leupeptin, and 10 μg/mL aprotinin] for 30 min. The cells were then scraped off and the lysates were cleared of debris by centrifugation at 12,000 *g* for 15 min, after which total protein was quantified using the bicinchoninic acid + copper II sulfate assay (Pierce Chemical). Caspase-3 activity was assessed in 10 μL of cell lysate with the CaspACE assay kit (Promega) following the manufacturer's recommendations. Cells treated with 1 μmol/L staurosporin 4 h before harvesting were used as positive control for caspase activity. Caspase-8 activity was assessed by Western blot analysis as described below.

Gene expression analysis. Expression of hTRAIL death receptors DR4 and DR5 was assessed in subconfluent tumor cells cultured in six-well plates. TRAIL receptor mRNA expression was determined by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) after total RNA extraction using Trizol reagent (Invitrogen). Briefly, 10 ng of cDNA were amplified using the IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) for the *DR4* and *DR5* gene. Sense and antisense primers used are as follow (DR4: sense, ggaggcacagtgtctgctg; antisense, cagcaccatttgctggaac; DR5: sense, agagccaacaggtgtcaacat; antisense, gcctcctcctctgagacctt). Each sample was analyzed twice and quantified with the analysis software for iCycler iQ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad).

hTRAIL ELISA. Ninety-six-well plates were coated with polyclonal anti-human TRAIL antibody (0.2 μg/well, R&D Systems) overnight at room temperature and then washed and incubated for 1 h with a blocking solution (1% bovine serum albumin/5% sucrose/PBS). After washing, the wells were incubated at room temperature with dilute serum or with media from transfected 2.93 cells for 2 h, followed by a 2-h incubation with Biotin-SP–conjugated Donkey Anti-Human IgG (1:20,000; R&D Systems). Detection was done by incubating with streptavidin–horseradish peroxidase (1:200; R&D systems) for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 50 μL of 1 mol/L H_2SO_4 and then absorbance at 410 nm was measured using a VICTOR^2 Multilabel counter (Perkin-Elmer). The ELISA detection limit was 0.02 ng/mL. TRAIL production was also assessed in the muscle and tumor after tissue lysing and crushing as described below (*in vivo* analysis of transgene expression).

Western blot analysis. Fifty micrograms of total protein were separated by SDS-PAGE and were electrophoretically transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore). The membrane was incubated with antibodies [caspase-8 and DR5 (Cell Signaling Technology) and DR4 (R & D systems)] in PBS containing 0.05% Tween 20 and 3% bovine serum albumin. The membrane was washed and probed with secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. Antibody binding was visualized with an enhanced chemiluminescence system (ECL kit, Roche). For quantification, luminescence was detected with a Charge Couple Device (CCD) camera (Syngene) and was analyzed using the GeneTools program (Syngene).

Fluorescence-activated cell sorting analysis. Cells (2×10^5) were washed twice and were resuspended in 100 μL of PBS and 4% FBS. Two microliters of phycoerythrin-conjugated anti–TRAIL-R1 (DR4), anti–TRAIL-R2 (DR5), anti–TRAIL-R3 (DcR1), or anti–TRAIL-R4 (DcR2) antibodies (R&D systems) were added in 50 μL PBS 0.1% FBS. The cells were incubated on ice for 30 min, washed twice with PBS 2% FBS, and then analyzed using the Cytomics FC500 flow cytometer (Beckman-Coulter).

In vivo experiments

Osteosarcoma model. Four-week-old male C3H/He 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 n°06) and under the supervision of authorized investigators. Animals were housed 1 wk before the start of experiments. The mice were anesthetized by

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 14, 2010; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

inhalation of an isoflurane/air mixture (1.5%, 1 L/min) combined with 0.05 mg/kg buprenorphine (Temgesic, Schering-Plough) before receiving an injection of 2×10^6 POS-1 cells in close proximity to the metatarsus. Tumors appeared at the injection site ~8 d later. The tumor volume (V) was calculated from the measurement of two perpendicular diameters using a calliper, according to the following formula: $V = 0.5 \times L \times (S)^2$, in which L and S are, respectively, the largest and smallest perpendicular tumor diameters. Mice were sacrificed when tumor volume reached 1,000 mm^3 for ethical reason.

Ewing's sarcoma model. Four-week-old Rj:NMRI-nude mice (Elevages Janvier) were housed at the experimental Therapy Unit as described above. They were anesthetized as described before receiving an intramuscular injection of 2×10^6 A673 cells.

Models of pulmonary nodule dissemination. Four-week-old male C3H/He mice were anesthetized as described before i.v. injection of 1.5×10^5 murine osteosarcoma POS-1 cells. Under these conditions, pulmonary nodules develop rapidly, leading to the death of the animals in 3 to 4 wk after POS-1 cell injection (28).

Formulation preparations. Experiments were done with the third-generation phosphonolipid transfection reagent KLN143, containing an ammonium polar head. It was used and formulated as previously described for the second generation of cationic phosphonolipids (29, 30). Briefly, cationic lipids were dissolved in chloroform in a glass vial. Chloroform was evaporated under vacuum to produce a dry lipid film. Sterile saline (NaCl 0.9% w/v) was then added to the lipid film, and after storage at 4°C overnight, the resulting solution was sonicated for 10 min before use. Cationic lipids were mixed with plasmid DNA and diluted in sodium chloride solution (0.9%) as required. The mixture was incubated at room temperature for 30 min before administration.

Experimental protocols. To determine the effect of hTRAIL delivered by synthetic vectors on primary tumor growth or pulmonary nodule formation, mice were injected with tumor cells as described above. Three groups of eight mice were then treated as follows: controls (vehicle treated), pBF42 (empty plasmid treated controls: KLN143/empty pBF42), and hTRAIL (KLN143/pBF42-hTRAIL). The KLN143 reagent alone did not affect tumor development (data not shown). TRAIL treatment in both models consisted of weekly i.v. injections of the lipophosphoramide/DNA formulations in the retro-orbital vein, beginning at the time of tumor cell inoculation until 28 to 42 d posttumor cell injection, depending on the series. Treatment was continued until the volume reached 5,000 mm^3 for Ewing's sarcoma or 1,000 mm^3 for osteosarcoma at which point mice were sacrificed by CO_2 inhalation, in accordance with ethical regulations. In the model of lung dissemination following i.v. injection of POS-1 cells, the animals were sacrificed when respiratory distress was observed and the number of nodules was assessed at necropsy.

In vivo *analysis of transgene expression.* Blood was drawn intermittently from the retro-orbital vein to monitor circulating hTRAIL protein levels throughout the experiment. At necropsy, the tumor and muscle tissues were lysed in reporter lysis buffer (Promega) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biomedicals) and crushed for 30 s using Ultraturax. After which, the lysates were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at 4°C and processed for hTRAIL detection using the ELISA described above.

***Terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick end labeling staining for detection of apoptosis* in vivo.** The proportion of apoptotic cells in primary bone tumor was determined using the *in situ* cell death detection kit (Roche Diagnostics), based on the terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method. TUNEL-positive cells were counted by microscopic examination with a ×40 objective lens and indices were determined as the mean percentages of positive cells among total cells.

Radiographic analysis. Radiographs on anesthetized animals [xylazine (Rompun)-ketamine (Imalgène 500) 8% and 13%, respectively, in PBS; 100 μL/10 g] were taken every week and at necropsy with a PLANMED Sophie mammography apparatus (SN RAH 40710).

Statistics

For analysis of TRAIL concentrations, results from treated groups were compared with the control using Dunnett's multiple comparison test. *In vivo*, Gaussian distributions were tested for the analysis of tumor volumes in the three groups by the Kolmogorov and Smirnov test. A two-tailed unpaired t test with Welch correction was used to compare mean tumor volumes. To compare metastatic incidence, a Fisher exact test was performed. Mouse survival was analyzed using the Kaplan Meier survival curves with log-rank analysis.

Results

Eight human Ewing's sarcoma and seven mouse, rat, or human osteosarcoma cell lines available in our laboratory were screened for their sensitivity to TRAIL *in vitro*: four Ewing's sarcoma (A673, TC71, RDES, and EW7) and four osteosarcoma (HOS, MG63, U2OS, and POS-1) cell lines were found sensitive to TRAIL. The further studies on TRAIL mechanisms of action were done with all sensitive cell lines, but to simplify the article, the results obtained with one representative sensitive cell line of each tumor type are shown.

Osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells sensitive to TRAIL express death receptors DR4 and DR5

The expression of TRAIL death receptors was determined in all sensitive osteosarcoma and Ewing's sarcoma cell lines at the mRNA and protein levels, respectively, by RT-qPCR and fluorescence-activated cell sorting (FACS) analyses. Figure 1A shows an example of the results obtained with the A673 (Ewing's sarcoma) and HOS (osteosarcoma) cells at the mRNA level, showing the expression

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 14, 2010; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

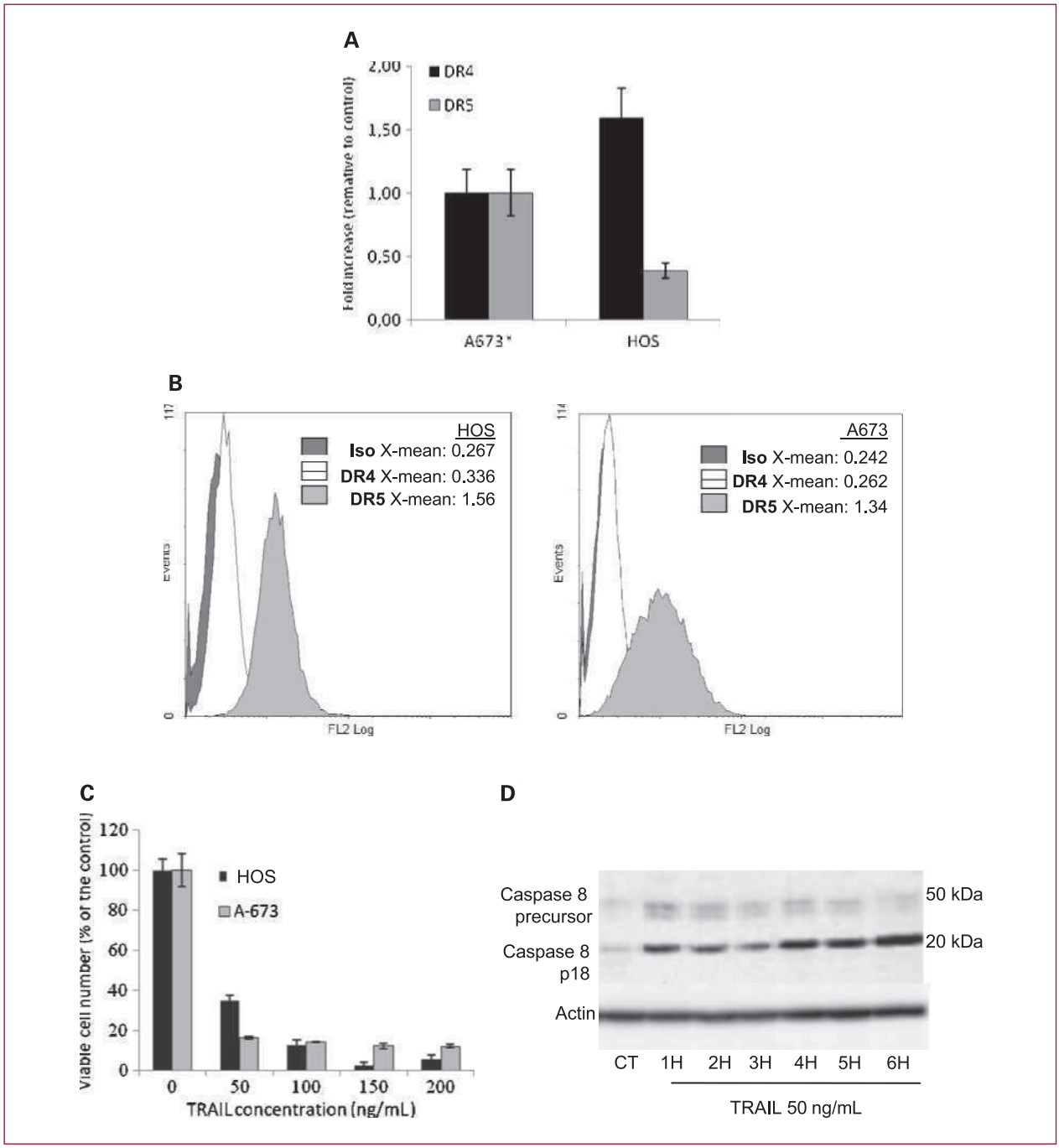


Fig. 1. Human A673 Ewing's sarcoma and HOS osteosarcoma cells express TRAIL death receptors and are sensitive to TRAIL-induced apoptosis. TRAIL DR4 and DR5 death receptor expression was assessed at the transcript level by RT-qPCR (A) and at the protein level by FACS analysis (B) in Ewing's sarcoma A673 and osteosarcoma HOS cells. TRAIL sensitivity of primary bone cell lines was determined by XTT assay after treatment with 0 to 200 ng/mL TRAIL for 72 h (A673 and HOS cells as an example (C). Caspase-8 activation was analyzed in response to TRAIL in the Ewing's sarcoma A673 cell line by the Western blot of caspase-8 cleavage (caspase-8 p18) after treatment of A673 cells with 50 ng/mL TRAIL for 1 to 6 h (D).

of the death receptors DR4 and DR5 by both cell lines, DR4 being more expressed in the HOS cell line than DR5 (Fig. 1A). However, at the protein level, FACS analysis reveals a higher expression of DR5 at the surface of both A673 and HOS cells than DR4 (Fig. 1B).

TRAIL induces apoptosis in osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells *in vitro*

The effect of recombinant human TRAIL was investigated on the viability of osteosarcoma and Ewing's sarcoma cell lines using an XTT assay. Treatment with increasing

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 14, 2010; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

concentrations (0-200 ng/mL) of TRAIL for 72 h decreased cell viability in both cell types, with maximum inhibition achieved at 150 ng/mL (IC_{50}, 38.3 ng/mL) for HOS and 50 ng/mL for A673 cells (IC_{50}, 29.9 ng/mL) for example (Fig. 1C). Treatment of cells with 50 ng/mL TRAIL for 24 to 72 hours induced a time-dependent decrease in the number of viable cells, compared with the control, with a maximum decrease observed after 72 hours of treatment (data not shown). To determine whether the decrease in viable cell number was due to induction of cell death, cell viability was analyzed by trypan blue dye exclusion, revealing a 27% increase in cell death in response to treatment with 50 ng/mL TRAIL for 48 hours in both cell lines (data not shown). Activation of caspase-8 was investigated in osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells incubated with 50 ng/mL TRAIL. Western blot analyses of caspase-8 activation are given for the Ewing's sarcoma A673 cell line (Fig. 1D) and show that caspase-8 is activated in a time-dependent manner in response to TRAIL, confirming the induction of death receptor–mediated apoptotic cell death.

In vitro validation of TRAIL transgene expression and biological activity

To show the transfection efficiency achieved using the synthetic transfection reagent KLN143, hTRAIL transgene expression was analyzed by ELISA in the supernatant of 2.93 cells 48 hours after transfection with empty plasmid pBF42 or pBF42-hTRAIL using the KLN143 reagent. Results presented in Fig. 2A confirmed that pBF42-hTRAIL–transfected cells expressed a high level of hTRAIL (3.78 ng/mL), whereas no TRAIL was detected in the supernatant of pBF42 empty plasmid–transfected cells, as expected. The biological activity of hTRAIL produced by pBF42-hTRAIL–transfected cells was confirmed *in vitro* by a ~40% inhibition of pBF42-TRAIL–transfected A673 cell proliferation after 72 hours, compared with cells transfected by the empty plasmid pBF42 (Fig. 2B).

In vivo analysis of TRAIL transgene expression

In vivo, TRAIL transgene expression was analyzed at systemic and local levels: TRAIL overexpression was detected

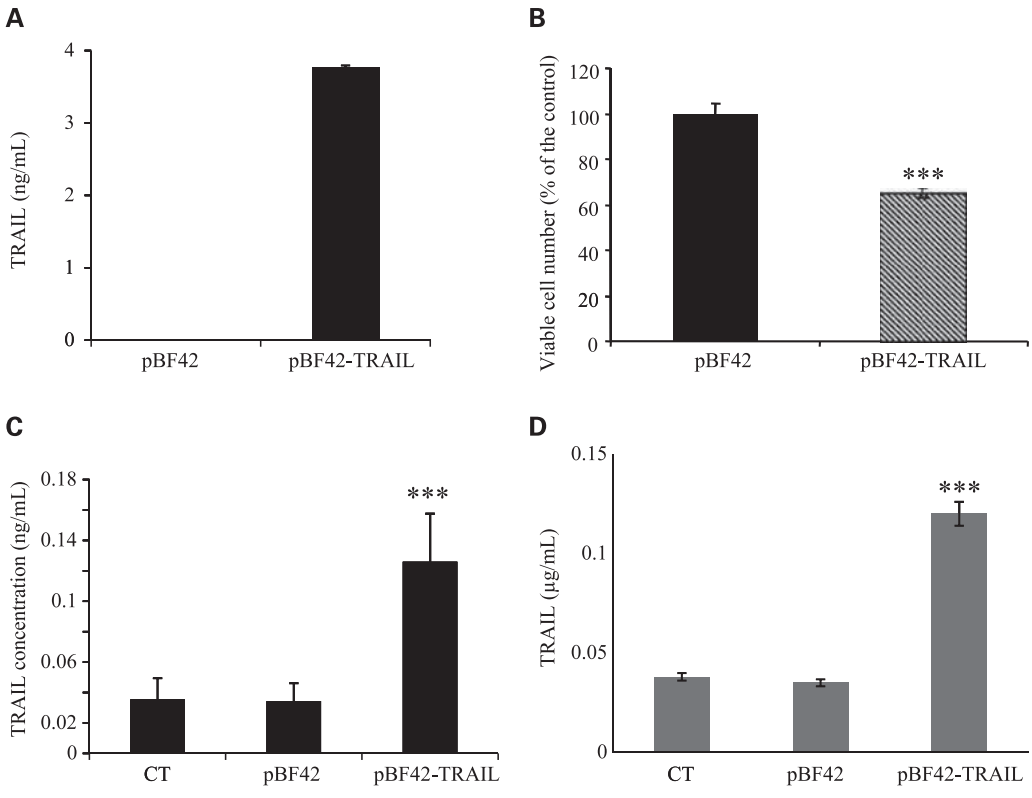


Fig. 2. *In vitro* and *in vivo* validation of TRAIL transgene overexpression and biological activity. TRAIL transgene expression was assessed at the protein level by ELISA in the culture medium of 2.93 cells 48 h after transfection with the pBF42-hTRAIL plasmid using the KLN143 synthetic vector (A). The biological activity of TRAIL transgene protein was assessed by its ability to induce apoptosis in A673 Ewing's sarcoma cells: cells transfected with KLN143/pBF42 or KLN143/pBF42-TRAIL were cultured for 72 h and the viable cell number was determined using an XTT assay (B). *In vivo*, KLN143/DNA formulations were administered weekly through the retro-orbital sinus of the mice bearing Ewing's sarcoma and TRAIL expression was analyzed 7 d postinjection by ELISA in the (C) serum or in the (D) tumor tissue (***, $P < 0.0001$ compared with respective control group); CT, control.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 14, 2010; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

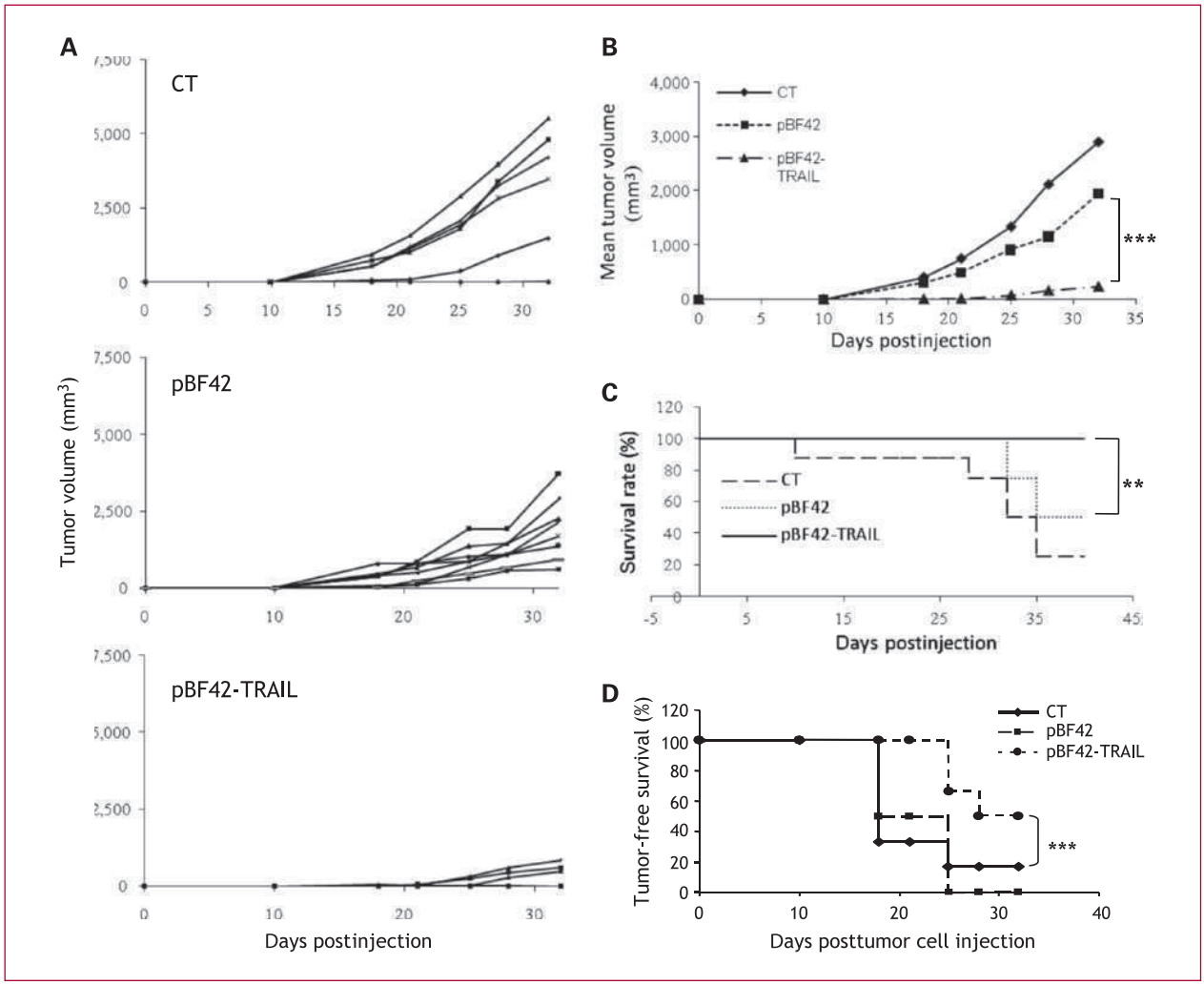


Fig. 3. TRAIL prevents Ewing's sarcoma development and increases mouse survival. Mice were injected with 2 million A673 cells as described in Materials and Methods. Groups of six to eight mice were assigned to controls (CT: vehicle treated), pBF42 (empty pBF42 plasmid/KLN143 reagent), and pBF42-TRAIL (KLN143 reagent/pBF42-hTRAIL). The KLN143/DNA formulations were administered through injection into the retro-orbital vein weekly, beginning at the time of tumor cell inoculation and continued for up to 28 d. A, tumor volumes of individual mice. B, mean tumor volume per group (***, $P = 0.0002$). C, overall survival rates for the three groups over a 40-d period (**, $P = 0.009$). D, tumor-free survival over a 32-d period (***, $P < 0.001$).

in the serum 2 days after i.v injection of plasmids pBF42-hTRAIL formulated with KLN143 compared with pBF42 empty plasmid or controls (respectively, 0.12 ng/mL versus 0.03 ng/mL, $P < 0.0001$; Fig. 2C). Local transgene TRAIL overexpression was also investigated at the site of injection (muscle) and at the tumor level by ELISA test. As expected, higher expression of TRAIL was detected in the muscle injected with KLN143/pBF42-TRAIL formulation compared with empty plasmid pBF42 (data not shown). This overexpression was also observable at the tumor site: the group treated by pBF42-hTRAIL expresses significantly higher amount of TRAIL (0.12 μg/mL) compared with both pBF42 empty plasmid and control groups (0.035 and 0.038 μg/mL, respectively; $P < 0.0001$; Fig. 2D).

hTRAIL transgene expression decreases osteosarcoma and Ewing's Sarcoma incidence and progression, and increases animal survival

Models of primary Ewing's Sarcoma and osteosarcoma were induced by para-osseous injection of 2×10^6 human A673 or mouse POS-1 tumor cells into nude mice or C3H/HeN mice, respectively. Mice received the first i.v. injection of KLN143 alone or KLN143/DNA formulations at the time of tumor cell inoculation, and then weekly thereafter for 4 weeks. Tumor volume was measured and calculated twice weekly.

A673 Ewing's sarcoma model. A significant decrease in tumor incidence was observed in the TRAIL-treated group with only 50% of mice developing a tumor compared with 100% in the pBF42 empty vector–treated and 83% in the vehicle-treated control groups at day 32 (Fig. 3A).

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 14, 2010; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

Moreover, tumor volumes for the mice that develop tumors were significantly lower in the TRAIL-treated group compared with the pBF42 empty plasmid or the vehicle-treated control groups (Fig. 3A). For example, 32 days after tumor cell inoculation, mean tumor volume in the TRAIL-treated group was 241.6 mm^3 compared with 1,943.6 and 2,894.8 mm^3, respectively, for the pBF42 empty plasmid and the vehicle-treated control groups ($P = 0.0002$; Fig. 3B). Animals had to be sacrificed due to progressive tumor development. Overall and tumor-free survivals were analyzed by comparing Kaplan-Meier curves with a log-rank test. No significant difference was found between the survival curves of the vehicle-treated and empty plasmid–treated groups (Fig. 3C and D); however, a significant increase in overall survival was observed at day 40 with 100% of survival in the TRAIL-treated group versus 50% in the empty plasmid–treated group and 25% in the vehicle-treated group ($P = 0.009$; Fig. 3C). Tumor-free survival curves also showed significant increase in the TRAIL-treated group compared with controls or empty plasmid groups ($P < 0.001$; Fig. 3D).

Mouse POS-1 osteosarcoma model. A model of primary osteosarcoma was developed by injecting tumor cells in the foot pad of syngenic mice by a para-osseous approach in close contact to the metatarsus as previously described (31). Mice treated with empty plasmid show a rapid development of tumors at the site of tumor cell injection in 83% of mice, whereas TRAIL gene transfer induced a tumor progression in only 33% of mice ($P < 0.001$; Fig. 4A).

TRAIL increases mouse survival by preventing pulmonary nodule development

TRAIL efficacy was also investigated in a model of tumor nodules developed secondary to Ewing's sarcoma. A673 or TC71 human Ewing's sarcoma cells (2-5 × 10^6) were injected i.v. in nude mice similar to models previously described (32). However, this approach led to the development of only few lung nodules in a small number of animals (<25%), impossible to use for preclinical studies in which high number of animals are needed per group. Therefore, because we previously showed that i.v. injection of 1.5 × 10^5 murine osteosarcoma POS-1 cells

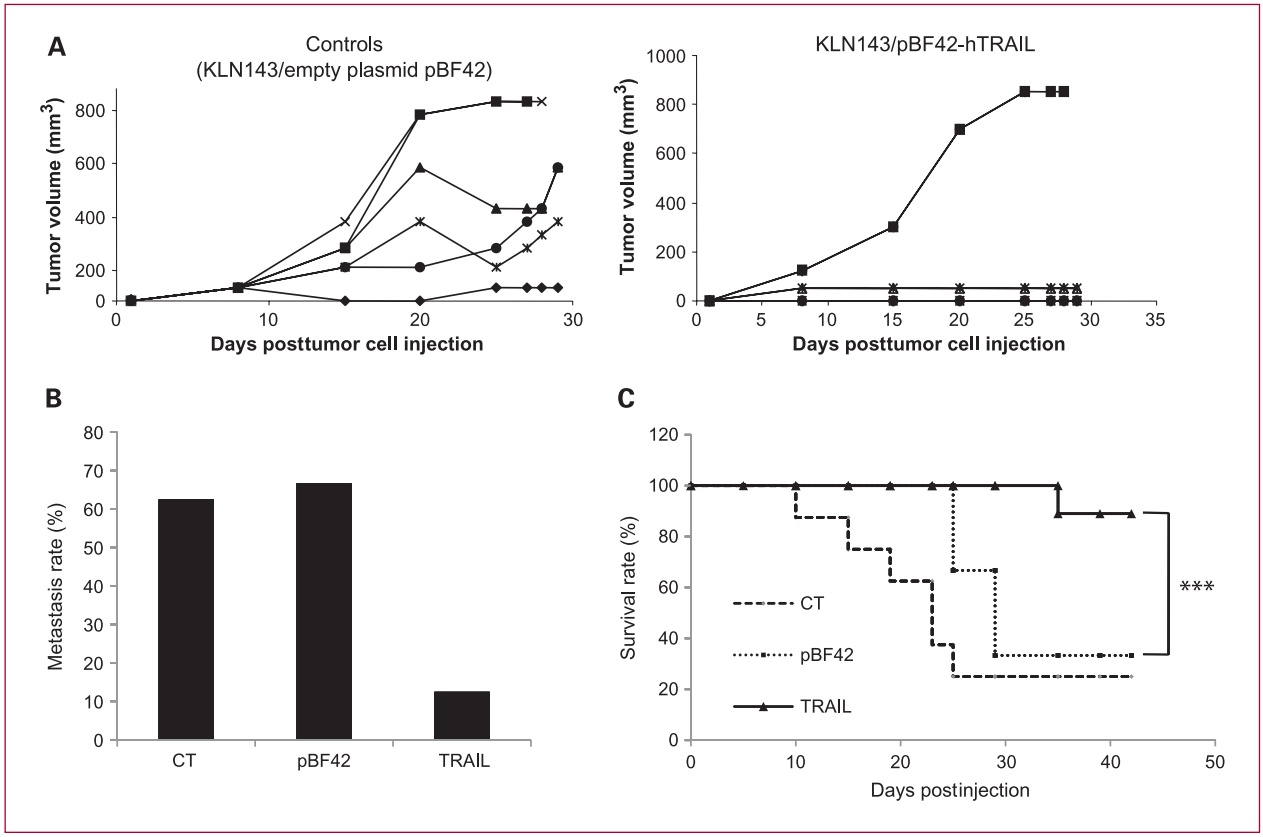


Fig. 4. TRAIL gene transfer inhibits osteosarcoma incidence and prolongs mouse survival by inhibiting pulmonary tumor nodule dissemination. Four-week-old male C3H/HeN mice were injected with 2 × 10^6 murine POS-1 cells near the metatarsus. Primary osteosarcoma develops at the site of injection. Mice were treated i.v. with PBS (CT), pBF42, or pBF42-TRAIL (TRAIL) weekly, starting at time of tumor cell inoculation and continued until day 28. A, individual tumor volume of empty pBF42 plasmid– and pBF42-TRAIL–treated groups are shown. For the lung nodule model, mice were i.v. injected with 150,000 POS-1 cells and treated with PBS (CT), pBF42, or pBF42-TRAIL (TRAIL) weekly until day 42 as described above. B, metastasis rate was calculated at necropsy by the proportion of mice bearing pulmonary tumor nodules. C, survival rate at day 42 is shown by Kaplan-Meier curve analysis ***, $P = 0.0025$).

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 14, 2010; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

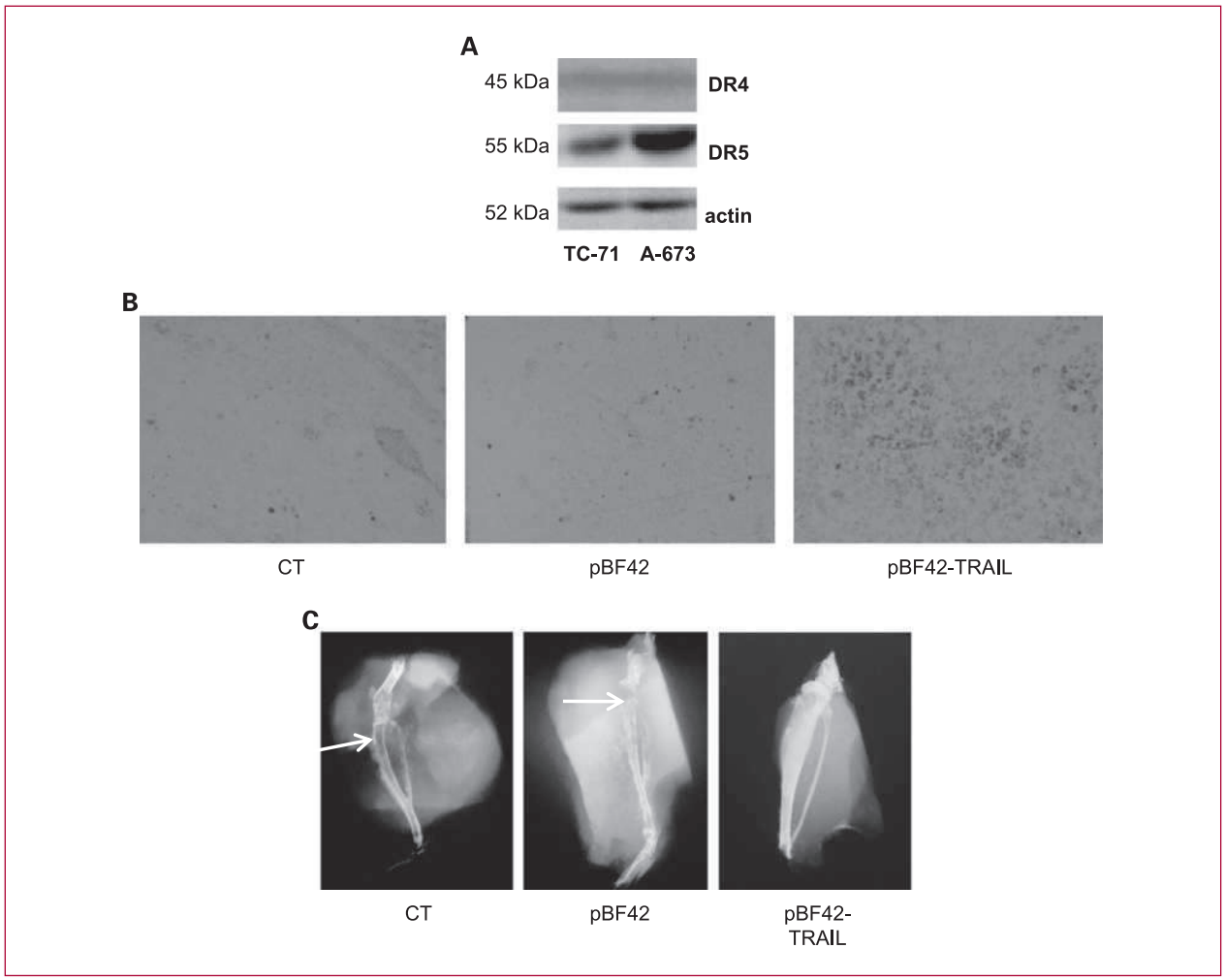


Fig. 5. TRAIL mechanisms of action *in vivo*: expression of death receptors, induction of apoptosis, and prevention of tumor-associated osteolysis. A, death receptors DR4 and DR5 expression was measured by Western blot in Ewing's sarcoma A673 tumor tissue after lysing and crushing the tissue as described in Material and Methods. B, TUNEL staining was done on 6-μm sections of A673 Ewing's sarcoma tumors from empty pBF42– and pBF42-TRAIL–treated mice (magnification, ×200). C, tumor-associated osteolysis was analyzed by radiography at day 40 on control mice (CT), mice treated with empty pBF42 plasmid (pBF42), or mice treated with pBF42-TRAIL formulation (pBF42-TRAIL). Arrows, osteolytic lesions.

leads to the development of lung nodules in 80% to 90% of mice (28); this model was further used to test TRAIL efficacy against lung nodule dissemination. The results presented in Fig. 4B show a significant decrease in the development of lung nodules counted at autopsy in the TRAIL-treated group, with only 12.5% of mice developing lung nodules versus 66.7% and 62.5% in the pBF42 empty plasmid– and the vehicle-treated control groups, respectively. Consequently, a significant increase in animal survival was observed in the TRAIL-treated group compared with the empty plasmid and vehicle-treated control groups, with, respectively, 89% of survival 42 days after tumor cell injection in the TRAIL group versus 33.3% and 25% for the control groups ($P = 0.0025$; Fig. 4C). These results show that TRAIL does not only exert an inhibitory effect on primary bone tumor growth but also on lung nodule dissemination.

Mechanisms of TRAIL action *in situ*

To better understand the mechanisms of action of TRAIL *in vivo*, several parameters have been analyzed as follows: the expression of death receptors by the tumor cells *in situ*, the induced apoptosis, and bone lesions. DR4 and DR5 expression analyzed in A673 and TC71 human Ewing's sarcoma tumors by Western blot shows a higher expression of DR5 compared with DR4 in tumors induced by both cell lines (Fig. 5A). This result confirms the difference already observed *in vitro* by FACS analysis on cultured A673 cells (Fig. 1B). Similar higher expression of DR5 compared with DR4 was observed in the osteosarcoma POS-1 tumor (data not shown). To analyze the antitumor effect of TRAIL *in vivo*, TUNEL staining was done on histologic sections from A673 tumors of TRAIL-treated mice versus controls and empty plasmid–treated mice. Results showed a higher proportion of TUNEL-stained cells in

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 14, 2010; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

tumors from the TRAIL-treated group compared with both control groups (90 positively stained cells in the TRAIL group versus 9 and 14 in the vehicle-treated and pBF42 empty plasmid–treated groups, respectively; Fig. 5B). As a consequence of tumor inhibition, TRAIL also diminished the osteolytic lesions associated with Ewing's sarcoma development (Fig. 5C). Radiographic analysis of tibia close to Ewing's sarcoma development show an intensive cortical bone degradation in the Ewing's sarcoma–bearing mice or in pBF42 empty plasmid–treated animals, which was totally prevented in pBF42-hTRAIL–treated animals (Fig. 5C).

Taken together, these results show that TRAIL induces a significant slowdown of tumor progression and an increase in animal survival in both Ewing's Sarcoma and osteosarcoma models by exerting a direct effect on tumor cells, as shown both *in vitro* (Fig. 1C and D) and *in vivo* (Fig. 5B).

Discussion

Osteosarcoma and Ewing's sarcoma are rare primary bone tumors with a poor prognosis for patients with disease relapse or with metastases at diagnosis. There is an urgent need to develop new adjuvant therapeutic approaches to improve patient survival and to diminish chemotherapy dosing. TRAIL, a member of the TNF superfamily, represents a promising potential therapeutic option owing to its ability to kill transformed cells. Several studies have reported TRAIL efficacy in Ewing's sarcoma and osteosarcoma cell lines *in vitro* (33, 34), but very few preclinical studies are available (35).

TRAIL can bind five cognate receptors and several studies done with tumor cell lines showed that TRAIL sensitivity is linked to the presence of activating DR4 and/or DR5 death receptors expressed on the surface of tumor cells (36). We confirm that osteosarcoma and Ewing's sarcoma cell lines sensitive to TRAIL express the death receptors DR4 and DR5 at the mRNA level and mostly DR5 at the cell membrane as evidenced by cytometry analysis in cell culture or by Western blot *in situ*. This finding may be related to publications that describe that DR5 acts as the primary transducer of the TRAIL signal (37). Similarly, it has been reported that normal cells are sensitized to TRAIL when DR5 is upregulated by overexpression of c-*myc* or oncogenic ras mutants (38).

The actions of TRAIL are generally thought to be mediated through the activation of the extrinsic apoptotic pathway, but the intrinsic apoptotic pathway may also be involved through the cleavage of Bid. Depending on the cell line, the intrinsic pathway may be necessary as a primary mechanism of apoptosis or serve to amplify the signal (39). In the sarcomas and osteosarcoma cell lines, we confirmed that TRAIL-mediated apoptosis is caspase dependent, as shown by caspase-3 and caspase-8 activation within 2 hours of TRAIL treatment. The intrinsic pathway does not seem to be involved, as no Bid cleavage could be detected (data not shown).

To test the effectiveness of TRAIL therapy *in vivo*, preclinical models of Ewing's sarcoma and osteosarcoma induced, respectively, by injection of human A673 or murine POS-1 cells were used. These models closely reproduce the clinical development of bone tumors, as the tumor normally develops in the vicinity of the bone, stimulates degradation of the cortical bone through osteoclasts, and then invades the medullar cavity, with development of extensive osteolysis. TRAIL delivery as a recombinant protein has been effective in limiting tumor development in several preclinical models of solid tumors, including lung and breast carcinoma (40–42), as well as in a xenograft model of Ewing's sarcoma (35). A novel approach was used in the present study by the use of the cationic lipid vector KLN143. Previous studies from our laboratory using other synthetic vectors, such as block copolymers, have shown the feasibility of providing efficient and long-lasting protein expression using nonviral gene transfer approaches in osteosarcoma (43). Synthetic vectors present real interest for subsequent clinical application, as a nontoxic alternative to gene delivery through retroviral vectors, which is associated with toxicity due to innate and adaptative immune responses. TRAIL overexpression through gene delivery using cationic vectors was validated *in vivo* both at the local (muscle) and systemic (serum) level. It was also validated at the tumor level (even if the tumors were small) by ELISA on the tumor tissue. The biological activity of TRAIL was evidenced by inhibition of tumor progression and tumor incidence as a result of direct tumor cell apoptosis, which was confirmed by TUNEL staining on histologic sections.

TRAIL-induced inhibition of tumor growth was accompanied by a prevention of associated bone osteolysis. Bone osteolysis represents an important feature of primary bone tumor development and can significantly diminish the patient's quality of life. This is the first study to show that TRAIL inhibits not only the tumor development but also the tumor-associated osteolysis observed in primary bone tumors. This effect could be explained by the blockade of the vicious cycle between tumor cells and osteoclasts that occurs during tumor development in bone more than a direct effect of TRAIL on osteoclasts. This theory was first hypothesized by Pajet in the late 19th century as the "seed and soil" theory (44). Subsequent studies showed that tumor cells produce osteoclast-activating factors such as receptor activator of NF-κB ligand or TNF, which induce the differentiation and activation of osteoclast precursors (45, 46). When activated, osteoclasts degrade bone, allowing the release of growth factors stored in the bone matrix, including insulin-like growth factor, transforming growth factor, and fibroblast growth factors, which in turn activate tumor cell proliferation. We showed in this study that targeting tumor cells with TRAIL blocks this vicious cycle, leading to indirect inhibition of the severe bone lesions observed in Ewing's sarcoma for instance.

Our study also revealed that TRAIL not only decreased tumor growth and indirectly osteolysis but also significantly increased animal survival. Because osteosarcoma

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 14, 2010; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

and Ewing's sarcoma patient's death is mainly caused by metastasis dissemination in lungs, complementary studies were undertaken in a model of lung nodule dissemination. However, models of lung nodule dissemination derived from Ewing's sarcoma cell injection were difficult to set up with a poor incidence and variable number of lung nodules following 2 to 5 × 10^6 cells injected i.v. (32). It was therefore not possible to conduct preclinical studies with significant number of animals with lung nodules per group with homogenous nodule incidence. This is the reason why we have continued our studies with a model of lung nodules induced with POS-1 osteosarcoma cells. This model has already been published (29) and was induced by injection of tumor cells isolated from osteosarcoma into the retro-orbital sinus of the mice. In this model, TRAIL significantly prolonged animal survival associated with a strong inhibition of lung nodule formation. These results are consistent with previous studies in other tumor models, such as skin carcinoma (47), which have shown the ability of TRAIL to limit metastasis development.

Taken together, the results presented here are encouraging and warrant the evaluation of TRAIL therapy in clinical trials for Ewing's sarcoma and osteosarcoma. However, the major limitation of the therapeutic use of TRAIL is the occurrence of cellular resistance, which is attributed to several dysfunctions arising at various levels in the TRAIL signaling pathway, such as an imbalance in death/decoy receptors or upregulation of c-FLIP expression (16). Therefore, before TRAIL can be successfully used for the treatment of patients, it is crucial to study the mechanisms of resistance in Ewing's sarcoma. Nevertheless, it has been shown that ~70% of Ewing's sarcoma patients express one of the two death receptors DR4 or DR5 (48), suggesting that TRAIL treatment may represent a good therapeutic option for these patients. Moreover, three clinical trials currently in progress using fully humanized agonist antibodies targeting DR4 or DR5 in solid tumors, including osteosarcoma, show encouraging results (19–21). TRAIL toxicity previously reported in several studies has been recently shown to be due to the exogenous poly-histidine tag of the recombinant TRAIL used in these clinical studies (49), which induces apoptosis of hepatocytes. A phase I/II clinical trial is currently in progress using a more stable version of TRAIL comprising the extracellular domain, showing promising results without dose-limiting toxicity or hepatotoxicity.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank C. Bailly, C. Le Corre, A. Lefèbvre, and M-A. Muller from the Experimental Therapy Unit Platform (IFR26, Nantes, France) for their technical assistance and G. Odri for his help with statistical analyses.

Grant Support

Association pour la Recherche sur le Cancer fellowship (F. Lamoureux), Ligue Contre le Cancer (comité régional des Pays de la Loire), Fondation de l'Avenir, Institut National du Cancer n°R07022NN fellowship (G. Picarda), and Société Française des Cancers de l'Enfant.

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 07/08/2009; revised 02/02/2010; accepted 02/20/2010; published OnlineFirst 04/06/2010.

References

1. Lamoureux F, Trichet V, Chipoy C, Blanchard F, Gouin F, Rédini F. Recent advances in the management of osteosarcoma and forthcoming therapeutic strategies. Expert Rev Anticancer Ther 2007;7:169–81.
2. Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). Orphanet J Rare Dis 2007;2:6.
3. Ewing J. Diffuse endothelioma of bone. Proc NY Pathol Soc 1921;21:17–2.
4. Hense HW, Ahrens S, Paulussen M, et al. Descriptive epidemiology of Ewing's tumors: analysis of German patients from (EI)CESS 1980-1997. Klin Padiatr 1999;211:271–5.
5. Stiller CA, Bielack SS, Jundt G, Steliarova-Foucher E. Bone tumours in European children and adolescents 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System Project. Eur J Cancer 2006;42:2124–35.
6. Lau YS, Adamopoulos IE, Sabokbar A, Giele H, Gibbons CLMH, Athanasou NA. Cellular and humoral mechanisms of osteoclast formation in Ewing's sarcoma. Br J Cancer 2007;96:1716–22.
7. Jaffe R, Santamaria M, Yunis EJ, et al. The neuroectodermal tumor of bone. Am J Surg Pathol 1984;8:885–98.
8. Folpe AL, Chand EM, Goldblum JR, Weiss SW. Expression of Fli-1, a nuclear transcription factor, distinguishes vascular neoplasms from potential mimics. Am J Surg Pathol 2001;25:1061–6.
9. May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, et al. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:5752–6.
10. Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, et al. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. J Biol Chem 2003;278:15105–15.
11. Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, et al. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2and c-Myc expression. Oncogene 2001;20:3258–65.
12. Cohen MD, Bugaieski EM, Haliloglu M, Faught P, Siddiqui AR. Visual presentation of the staging of pediatric solid tumors. Radiographics 1996;16:523–45.
13. Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, et al. Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study. J Clin Oncol 2000;18:3108–14.
14. Bouralexis S, Findlay DM, Evdokiou A. Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL. Apoptosis 2005;10:35–51.
15. Holen I, Shipman CM. Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. Clin Sci (Lond) 2006;110:279–91.
16. Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. Cancer Gene Ther 2005;12:228–37.
17. Liabakk NB, Espevik T. Monoclonal antibodies against TRAIL. Vitam Horm 2004;12:65–79.
18. Kruyt FA. TRAIL and cancer therapy. Cancer Lett 2008;263:14–25.
19. Tolcher AW, Mita M, Meropol NJ, et al. Phase I pharmacokinetic and

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 14, 2010; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. J Clin Oncol 2007;25:1390–5.
20. Plummer R, Attard G, Pacey S, et al. Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers. Clin Cancer Res 2007;13:6187–94.
21. Marini P. Drug evaluation: lexatumumab, an intravenous human agonistic mAb targeting TRAIL receptor 2. Curr Opin Mol Ther 2006;8:539–46.
22. Kurbanov BM, Fecker LF, Geilen CC, Sterry W, Eberle J. Resistance of melanoma cells to TRAIL does not result from upregulation of antiapoptotic proteins by NF-κB but is related to downregulation of initiator caspases and DR4. Oncogene 2007;26:3364–77.
23. Martínez-Ramírez A, Rodríguez-Perales S, Meléndez B, et al. Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. Cancer Genet Cytogenet 2003;141:138–42.
24. Kamijo A, Koshino T, Uesugi M, Nitto H, Saito T. Inhibition of lung metastasis of osteosarcoma cell line POS-1 transplanted into mice by thigh ligation. Cancer Lett 2002;188:213–9.
25. Klein B, Pals S, Masse R, et al. Studies of bone and soft-tissue tumours induced in rats with radioactive cerium chloride. Int J Cancer 1977;20:112–9.
26. Joliat MJ, Umeda S, Lyons BL, Lynes MA, Shultz LD. Establishment and characterization of a new osteogenic cell line (MOS-J) from a spontaneous C57BL/6J mouse osteosarcoma. In Vivo 2002;16:223–8.
27. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 1977;36:59–74.
28. Wittrant Y, Lamoureux F, Mori K, et al. RANKL directly induces bone morphogenetic protein-2 expression in RANK-expressing POS-1 osteosarcoma cells. Int J Oncol 2006;28:261–9.
29. Ory B, Heymann MF, Kamijo A, Gouin F, Heymann D, Rédini F. Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. Cancer 2005;104:2522–9.
30. Floch V, Loisel S, Guenin E. Cation substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity. J Med Chem 2000;43:4617–28.
31. Floch V, Delépine P, Guillaume C, et al. Systemic administration of cationic phosphonolipids/DNA complexes and the relationship between formulation and lung transfection efficiency. Biochim Biophys Acta 2000;1464:95–103.
32. Scotlandi K, Benini S, Manara MC, et al. Murine model for skeletal metastases of Ewing's sarcoma. J Orthop Res 2000;18:959–66.
33. Evdokiou A, Bouralexis S, Atkins GJ, et al. Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. Int J Cancer 2002;99:491–504.
34. Kontny HU, Hämmerle K, Klein R, Shayan P, Mackall CL, Niemeyer CM. Sensitivity of Ewing's sarcoma to TRAIL-induced apoptosis. Cell Death Differ 2001;8:506–14.
35. Merchant M S, Yang X, Melchionda F, et al. Interferon γ enhances the effectiveness of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonists in a xenograft model of Ewing's sarcoma. Cancer Res 2004;64:8349–56.
36. Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. Oncogene 2003;22:8628–33.
37. Kelley RF, Totpal K, Lindstrom SH, et al. receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis fctor-apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. J Biol Chem 2005;208:2205–12.
38. Wang Y, Engels IH, Knee DA, Nasoff M, Deveraux QL, Quon KC. Synthetic lethal targeting of MYC by activation of the DR5 death receptor pathway. Cancer Cell 2004;5:501–12.
39. Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, Jong SD, Samali A. TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? Cancer Treat Rev 2009;35:280–8.
40. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. J Clin Invest 1999;104:155–62.
41. Jin H, Yang R, Fong S, et al. Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cooperates with chemotherapy to inhibit orthotopic lung tumor growth and improve survival. Cancer Res 2004;64:4900–5.
42. Shankar S, Ramsing Singh T, Chen X, Thakkar H, Firnin J, Srivastava RK. The sequential treatment with ionizing radiation followed by TRAIL/Apo-2L reduces tumor growth and induces apoptosis of breast tumor xenografts in nude mice. Int J Oncol 2004;24:1133–40.
43. Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. Cancer Res 2007;67:7308–18.
44. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. Lancet 1889;1:571–2.
45. Chirgwin JM, Guise TA. Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2000;10:159–78.
46. Chirgwin JM, Mohammad KS, Guise TA. Tumor-bone cellular interactions in skeletal metastases. J Musculoskelet Neuronal Interact 2004;4:308–18.
47. Grosse-Wilde A, Voloshanenko O, Bailey SL, et al. TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. J Clin Invest 2008;118:100–10.
48. Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades C, Tsokos M. Ewing's sarcoma family of tumors are sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand and express death receptor 4 and 5. Cancer Res 2001;61:2704–12.
49. Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. Nat Med 2001;7:383–5.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

III. Complément de la discussion de l'article 1

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre de deux mécanismes : la formation et la résorption osseuse. Tout déséquilibre entre ces processus est à l'origine de pathologies qui peuvent être ostéocondensantes ou ostéolytiques, bénignes ou malignes. Le sarcome d'Ewing est associé à une ostéolyse dans 85% des cas. Les traitements actuels, consistent en une polychimiothérapie néo adjuvante, une résection chirurgicale de la tumeur et une polychimiothérapie adjuvante. Ces protocoles thérapeutiques ont certes permis d'améliorer les taux de survie mais compte tenu de la forte toxicité des molécules de chimiothérapie utilisées et du mauvais pronostic associé à la présence de métastases (et en particulier osseuses) rend le développement de nouvelles approches thérapeutiques nécessaire.

Comme cela a déjà été montré dans d'autres types de cancers, nous décrivons pour la première fois l'intérêt thérapeutique de TRAIL, administré par transfert de gène non viral, dans le traitement du sarcome d'Ewing. Ainsi, ce traitement induit une inhibition de la progression tumorale conduisant à une augmentation de la survie des animaux mais prévient également l'apparition des lésions osseuses associées au développement de la tumeur. Ces résultats ont été obtenus dans 2 modèles de sarcome d'Ewing humains, A673 et TC-71, induits chez la souris Nude Athymique. TRAIL a été administré par transfert de gène utilisant le lipide cationique KLN143. Ces études ont été réalisées sur des modèles précliniques originaux induits par injection en site paratibiale de cellules de sarcome d'Ewing. Ces modèles reproduisent les deux aspects du sarcome d'Ewing, le développement en tissus mous (15% des patients) et en site osseux, avec les atteintes osseuses caractéristiques du développement de la pathologie chez l'homme (85% des patients). Cependant, une des limites de notre étude est de ne pas avoir été à même de démontrer l'efficacité de TRAIL sur l'inhibition de la dissémination métastatique. Ainsi, comme cela a déjà été montré dans la littérature, le développement d'un modèle de dissémination pulmonaire de cellules tumorales de sarcome d'Ewing par injection intraveineuse et difficile à mettre en œuvre. Il présente par ailleurs une faible reproductibilité, peu compatible avec des essais précliniques [187]. Pour résoudre ce problème, nous tentons d'obtenir au sein du laboratoire, un modèle de dissémination métastatique consécutif à une tumeur primaire de sarcome d'Ewing, après une amputation de la patte présentant la tumeur. Des résultats prometteurs ont été obtenus et la mise au point de ce modèle est en cours. De plus, ce modèle se rapproche beaucoup de ce qu'il se produit en clinique lors des résections chirurgicales.

Ainsi, la chirurgie des tumeurs de type ostéosarcome induit une augmentation de l'incidence métastatique chez les patients. Une fois ce modèle mis au point, l'effet thérapeutique de TRAIL sur la dissémination des cellules tumorales d'Ewing pourra être étudié.

Précédent notre étude, d'autres équipes se sont intéressées à l'étude de l'efficacité thérapeutique de TRAIL dans le sarcome d'Ewing. Ainsi, TRAIL est capable d'induire l'apoptose dépendante des caspases dans la majorité des lignées de sarcome d'Ewing étudiées, montrant ainsi l'intérêt de cette approche thérapeutique [188][189][190]. D'autre part, l'équipe de Kontny a montré que 80 % des échantillons de tumeurs d'Ewing issues de patients étudiées expriment DR4 et que toutes expriment DR5 [191]. Une autre étude a quant à elle montré sur 32 échantillons issus de tumeurs d'Ewing que 72 % expriment DR4 et DR5, 25 % un des 2 et que seulement 3 % de ces échantillons n'expriment aucun des 2 récepteurs de mort [189]. Ces résultats suggèrent une forte probabilité de sensibilité des tumeurs d'Ewing à l'apoptose induite par TRAIL et justifiant l'intérêt d'un traitement activant cette voie d'apoptose. Selon des études précédentes, la résistance à TRAIL dans les sarcomes d'Ewing ne serait pas la résultante des taux d'expression des récepteurs activateurs ou leurres. Les taux de DR4 et de DR5 seraient selon leur étude relativement constant entre les lignées sensibles et résistantes et les récepteurs leurres, à la limite du détectable dans ces mêmes lignées (sensibles ou résistantes). In-vivo, une autre équipe a étudié l'effet thérapeutique de TRAIL et d'un agoniste de DR5 dans un modèle de xénogreffe de sarcome d'Ewing, dans le muscle tibial postérieur et confirmé nos résultats. Cette étude ne s'est cependant pas intéressée à la composante osseuse du développement tumoral et à l'ostéolyse associée, principale complication retrouvé par les patients [192].

Des essais cliniques utilisant la forme recombinante de TRAIL ou des agonistes de DR4 et DR5 sont actuellement en cours mais l'apparition de phénomènes de résistance reste la limite majeure de leur utilisation en clinique. Certaines lignées cellulaires résistantes à des agents de chimiothérapie conventionnels tels que l'adriamycine ou l'etoposide sont cependant sensibles à TRAIL, ce qui démontre son intérêt en tant que traitement alternatif pour ce type de patients dont le taux de survie à 5 ans est très faible. Ces deux agents seraient même capables de sensibiliser des cellules tumorales à l'apoptose induite par TRAIL dans des lignées de carcinome pulmonaire à petites cellules [193]. De plus, des agents de chimiothérapie tels que la Doxorubicine, administrés en association avec TRAIL, présentent un effet synergique dans certains cancers tel que le cancer colorectal même dans un lignée rendue résistante à TRAIL [194]. TRAIL active principalement la voie extrinsèque de l'apoptose et la Doxorubicine, la voie intrinsèque ce qui pourrait expliquer un effet synergique des ces deux molécules [195]. Par ailleurs, la

Doxorubicine peut accroître le pouvoir pro-apoptotique de TRAIL dans un modèle préclinique de cancer de la prostate en inhibant l'expression de c-FLIP, inhibiteur clé de l'apoptose extrinsèque [196]. Concernant le sarcome d'Ewing, selon des études, TRAIL pourrait aussi avoir un effet synergique *in vitro* avec le Bortezomib (VELCADE®), agent utilisé dans le myélome multiple et lymphomes [197]. Ces résultats démontrent eux aussi l'intérêt de l'utilisation de TRAIL dans la thérapie des cancers, en association avec des agents de chimiothérapie conventionnels, pouvant à la fois aboutir à un effet synergique ou contrecarrer la résistance des cellules tumorales à TRAIL. La compréhension des mécanismes impliqués de la résistance à TRAIL dans le sarcome d'Ewing reste cependant essentielle pour une application clinique ultérieure et nous avons donc choisi dans un second temps d'étudier les causes inhérentes à la résistance des lignées de sarcome d'Ewing afin de définir des protocoles de (re)sensibilisation *in vitro* puis *in vivo*.

PARTIE II :

Etude de la résistance à TRAIL des lignées cellulaires de sarcome d'Ewing

I. Introduction : les mécanismes de la résistance à TRAIL

Malgré le grand intérêt que représente la capacité de TRAIL à induire spécifiquement l'apoptose des cellules tumorales, de nombreuses tumeurs malignes y sont résistantes. C'est le cas en particulier des tumeurs pancréatiques, du neuroblastome et du mélanome malin. De nombreux mécanismes de résistance développés par les cellules cancéreuses ont déjà été décrits dans la voie de signalisation de TRAIL et leur compréhension est nécessaire afin d'envisager une utilisation thérapeutique de TRAIL ou des agonistes de ses récepteurs activateurs (Figure 30).

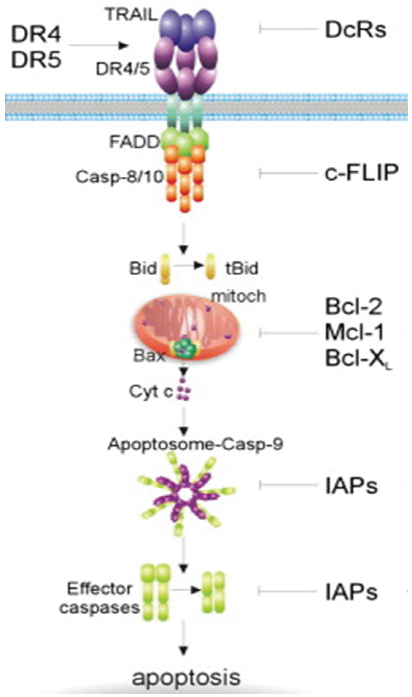


Figure 30 : Les mécanismes de la résistance à TRAIL. [Adapté de Mahalingam *et al.*, [198]]

Les récepteurs de TRAIL:

Le premier point de régulation de la sensibilité à TRAIL se situe au niveau de l'expression membranaire de ses récepteurs. L'interaction de TRAIL avec ses récepteurs de mort à la membrane est nécessaire pour la transduction du signal aboutissant à l'apoptose des cellules tumorales. Ainsi, un défaut dans l'expression à la membrane de DR4 a été corrélé avec des phénomènes de résistances dans les cancer de l'ovaire [199] et une diminution de son expression membranaire, consécutive à un défaut de transport, peut amplifier le phénomène de résistance dans le cancer du colon [200]. Des mutations

invalidantes ainsi que des modifications post-traductionnelles de DR4 et DR5 telles que les O-glycosylation peuvent aussi jouer un rôle clé dans les mécanismes de résistance [201]. Ces récepteurs ne sont cependant pas les seuls à jouer un rôle dans ces phénomènes de résistance. Ainsi, certaines tumeurs telles que le méningiome et le médulloblastome présentent une forte expression membranaire de DR4 et DR5 mais sont résistantes à TRAIL [202]. La balance entre l'expression des récepteurs leurres et activateurs à la membrane pourrait être déterminante pour la protection des cellules tumorales contre l'apoptose induite par TRAIL mais aucune corrélation définitive n'a été montrée à l'heure actuelle [127][128][203][204].

Les inhibiteurs de la voie de signalisation de TRAIL :

Un autre point de régulation de la sensibilité à TRAIL se situe au niveau du complexe DISC. c-FLIP peut être recruté au niveau de ce complexe grâce à deux domaines DED permettant une interaction avec FADD [205][206]. c-FLIP coexiste sous 3 formes, c-FLIP$_S$, c-FLIP$_L$ et c-FLIP$_R$, qui possèdent une forte homologie avec les caspases-8 et 10 via leurs deux domaines DED et pour c-FLIP$_L$, un domaine «caspase-like» inactif en c-terminal [207][208](Figure 31).

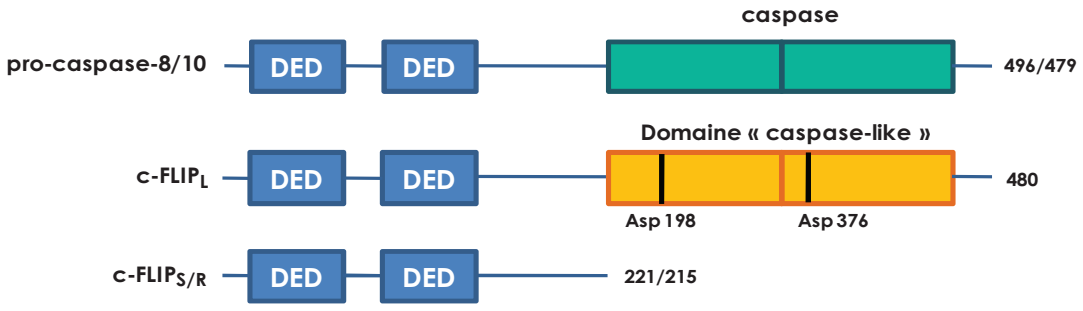


Figure 31 : Structure des différents isoformes de c-FLIP. [Adapté de Bagnoli *et al.*,[209]] La longueur en acide aminé est indiquée pour chaque isoforme.

Tous les isoformes de c-FLIP sont capables d'inhiber le clivage protéolytique et donc l'activation de la caspase-8 au niveau du complexe DISC. Grâce à cette fonction, c-FLIP représente un inhibiteur majeur de l'apoptose induite par TRAIL (Figure 32). Dans la voie de signalisation de TRAIL, c-FLIP$_S$ et c-FLIP$_R$ vont inhiber le recrutement de la pro-caspase-8 au niveau de complexe DISC selon des mécanismes identiques [210]. Le role de c-FLIP$_L$ est quant à lui plus complexe et controversé. Il aurait ainsi, en plus de son activité anti-apoptotique similaire à celle de c-FLIP$_S$ et c-FLIP$_R$, la capacité de promouvoir le clivage de la caspase-8 dans le contexte de la voie dépendante de FAS [211]. Cette activité pro-apoptotique serait dépendante de son niveau d'expression. Dans les cellules

résistantes à TRAIL, en complément de son activité anti-apoptotique, c-FLIP$_L$ serait capable de promouvoir l'induction de signaux de survie impliquant le recrutement de RIP et l'activation de NFκB [209]. D'après la littérature, le ratio Caspase-8 / c-FLIP peut s'avérer déterminant pour la sensibilité des cellules tumorales à TRAIL. Ainsi, un haut niveau d'expression de c-FLIP peut induire une résistance dans de nombreuses lignées tumorales telles que les carcinomes du sein, du poumon et du colon, le mélanome malin, le carcinome hépatocellulaire ou encore le glioblastome [212][213][199][214]. Un défaut d'expression de la caspase-8 serait aussi responsable de la résistance à TRAIL dans le mélanome, le neuroblastome et dans des tumeurs cérébrales d'origine neuroectodermiques [144][215][216][217]. Il a aussi été montré dans le cancer du colon et le mélanome qu'une inhibition de l'expression de c-FLIP permettait une sensibilisation des cellules tumorales à l'apoptose induite par TRAIL et que sa surexpression pouvait, à l'inverse, induire une résistance [218][219][220][221].

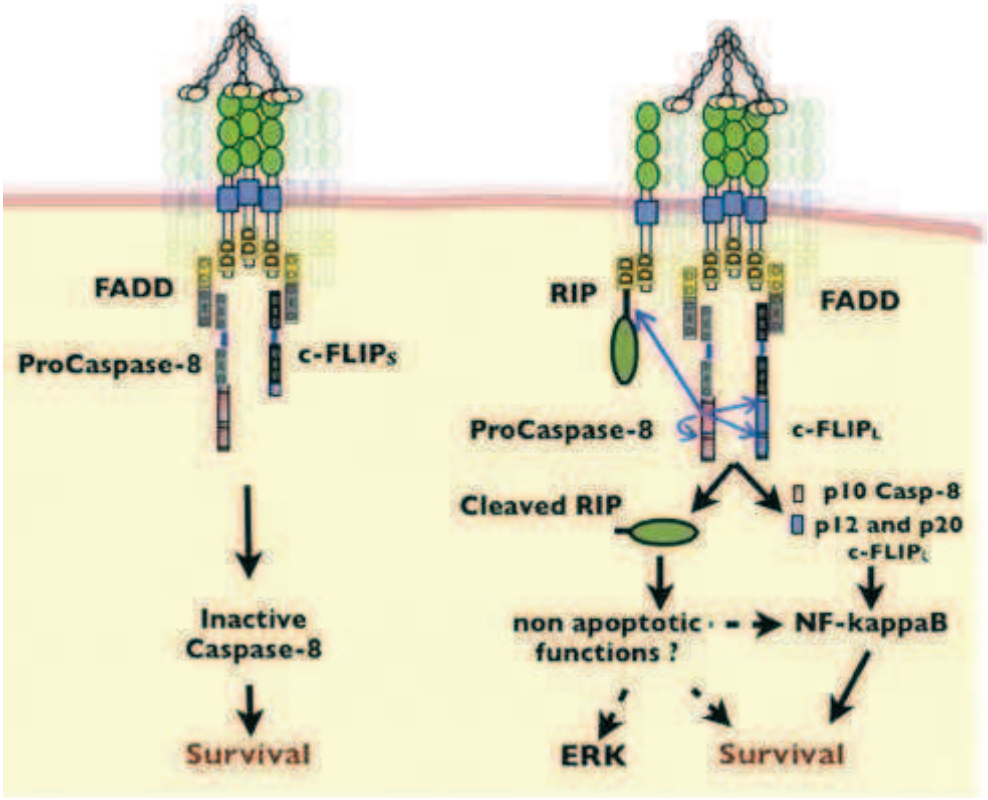


Figure 32 : Mecanismes d'inhibition de l'apoptose par les différents isoformes de c-FLIP. [(Adapté de Shirley *et al.*, [222]]

Une famille d'inhibiteurs des caspases très conservés, les Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) peuvent être aussi responsables de la résistance à TRAIL en inhibant les caspases-9, -3 et -7 [223]. Cette famille comprend XIAP, c-IAP1, c-IAP2 et la survivin. Ainsi,

une forte expression de XIAP peut induire la résistance de lignées cellulaires tumorales [224]. Les protéines anti-apoptotiques de la famille BCl-2 peuvent aussi inhiber l'apoptose induite par TRAIL dans les lignées cellulaires de type II telles que des lignées de neuroblastome, de gliome et de carcinome mammaire [225]. L'expression de la protéine Mcl-1 est également liée à la résistance des cellules tumorales à TRAIL dans le carcinome hépatocellulaire et dans le cholangiocarcinome [226][227].

D'après des études récentes, l'expression des acteurs de la voie de signalisation non apoptotique de TRAIL tels que TRADD seraient aussi impliqués dans ces phénomènes de résistances [228].

De nombreux acteurs, présents à différents niveaux de la voie de signalisation de TRAIL peuvent donc être responsables des phénomènes de résistance dans les différentes lignées tumorales. En ce qui concerne le sarcome d'Ewing, la résistance à TRAIL pourrait être liée à une déficience en caspase-8 dont l'expression serait absente dans 20% des lignées [191]. Ainsi, l'IFN-γ, en induisant une surexpression de la caspase-8, serait capable de sensibiliser les cellules à l'apoptose induite par TRAIL [192][225]. En, revanche, dans le sarcome d'Ewing, aucune corrélation significative n'a été montrée entre l'expression des récepteurs activateurs et leurres ou encore de c-FLIP et la résistance des lignées cellulaires[191].

Dans notre étude, nous avons choisi de nous intéresser à deux niveaux de régulation impliqués dans la sensibilité à TRAIL : la balance entre l'expression des récepteurs activateurs et leurres, et la balance entre l'expression de la caspase 8 et c-FLIP, dans 7 lignées de sarcome d'Ewing.

II. Article 2

« Mise en évidence d'un nouvel isoforme tronqué du Death Receptor 4 dans les lignées cellulaires de sarcome d'Ewing potentiellement impliqué dans les méchanismes de la sensibilité / résistance à TRAIL »

G. Picarda, S. Surget, S. Teletchea, M. Berreur, C. Pellat, D. Heymann, V. Trichet, F. Rédini. Soumis à **Molecular Cancer Research**.

Le sarcome d'Ewing est une tumeur osseuse primitive qui touche principalement les enfants et les adolescents. Les taux de survie à 5 ans chutent de plus de 50% à seulement 20 % pour les patients résistant au traitement ou présentant des métastases au moment du diagnostic. Parmi les nouvelles approches thérapeutiques potentielles, TRAIL, cytokine à forte activité anti-tumorale est un candidat prometteur. Cependant, son utilisation en clinique est limitée en raison de l'apparition de phénomènes de résistance chez plus de 30% des patients.

Des expériences de viabilité cellulaire réalisées sur 7 lignées de sarcome d'Ewing humaines ont montré que 4 lignées cellulaires sur 7 sont résistantes à l'apoptose induite par TRAIL. Une analyse par Western-blot et cytométrie en flux a révélé que DR5 est fortement et uniformément exprimé à la membrane de toutes les lignées de sarcome d'Ewing alors que DR4 est plus fortement exprimé par les 3 lignées sensibles (A673, TC-71 et RD-ES) que dans les 4 autres. Dans la lignée sensible TC-71, l'inhibition de l'expression de DR4 par la technologie shRNA s'est associée à une perte de sensibilité de ces cellules malgré la présence de DR5, validant ainsi l'implication de DR4 dans la sensibilité à TRAIL. Afin de sensibiliser la lignée résistante SK-N-MC à l'apoptose induite par TRAIL, nous avons voulu surexprimer DR4 dans cette lignée par technologie lentivirale. Au cours du clonage de l'ADNc de DR4, un nouveau transcrit a été identifié puis cloné et séquencé. Il résulte d'un épissage alternatif et est traduit en une protéine de 310 acides aminés qui correspond à la protéine complète aDR4 (468 aa) mais tronquée des acides aminés 11 à 168 présents dans la partie extracellulaire de DR4 impliquée dans la liaison à TRAIL. D'après des études de modélisation moléculaire, le contact de ce nouvel isoforme court de DR4 (bDR4) avec TRAIL semble largement maintenu malgré cette perte d'aminoacides. La surexpression de bDR4 dans la lignée résistante SK-N-MC restaure la sensibilité à TRAIL (comme cela a été montré par test de viabilité XTT et marquage Apo2.7). Une autre stratégie de sensibilisation à TRAIL a consisté à inhiber l'expression de c-FLIP dans 2 lignées cellulaires résistantes, SK-N-MC et EW24, à l'aide d'un shRNA. Une sensibilisation à TRAIL par cette stratégie a été observée grâce à des tests de viabilité et caspase-3.

EVIDENCE OF A FUNCTIONAL, NEW SHORT ISOFORM OF DEATH RECEPTOR 4 IN EWING'S SARCOMA CELL LINES THAT MAY BE INVOLVED IN TRAIL SENSITIVITY/RESISTANCE MECHANISMS

Gaëlle Picarda[1,2], Sylvanie Surget[3], Stéphane Téletchéa[1,2], Martine Berreur[1,2], Franck Tirode[4,5], Catherine Pellat-Deceunynck[3], Dominique Heymann[1,2], Valérie Trichet[1,2], Françoise Rédini[1,2]

From INSERM, UMR 957[1], Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822 Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités[2]; INSERM UMR 892, IRT-UN, Université de Nantes[3], Nantes; Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05[4] ; INSERM, U830, Unité de Génétique et Biologie des Cancers, Paris[5], France

Running head: a functional alternative transcript of Death Receptor 4 in Ewing sarcoma

Correspondance : Dr Françoise Rédini, UMR_S957, Laboratoire de physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France. Phone : +33 (0)2 40 41 29 93 ; fax : +33 (0)2 40 41 28 60 ; e-mail : francoise.redini@univ-nantes.fr

Ewing's sarcoma (ES) is a high-grade neoplasm typically arising in the bones of children and adolescents. Survival rate decreases from greater than 50% to only 20% after 5 years for patients not responding to treatment or presenting metastases at diagnosis. Among new therapeutic approaches, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), which has strong antitumoral activity, is a promising candidate. To address TRAIL sensitivity, 7 human ES cell lines were used. Cell viability experiments (XTT assay) showed that 4 out of the 7 ES cell lines were resistant to TRAIL induced cell death. Western-blotting and flow cytometry analyses revealed that DR5 was uniformly expressed by all ES cell lines whereas DR4 levels were higher in two sensitive cell lines (RD-ES and TC71) than in the 5 others. In TRAIL-sensitive TC71 cells, knockdown of *TNFRSF10A /DR4* by shRNA was associated with a loss of sensitivity to TRAIL in spite of DR5 presence. Interestingly, we identified a new transcript variant that results from an alternative splicing and encodes a 310 amino acid protein which corresponds to the 468 aa of DR4 original isoform but truncated of aa 11-168 within the extracellular TRAIL-binding domain. According to modelling studies, the contact of this new DR4 isoform (bDR4) with TRAIL appeared largely preserved. The overexpression of bDR4 in a TRAIL-resistant cell line restored TRAIL sensitivity. TRAIL re-sensitization was also observed after *c-FLIP* knockdown by shRNA in two TRAIL-resistant cell lines as shown by XTT assay and caspase-3 assay.

Bone sarcomas are rare malignancies diagnosed in fewer than 700 individuals per year in the United States. Ewing's sarcoma (ES) is the second most frequent primary bone tumors in children and adolescents. It is a high-grade neoplasm, representing 2% of childhood cancers with a peak incidence at age 15 (1-3) and characterized by a rapid tumor growth and extensive bone destruction that can result in bone pain and pathological fracture (4). Ewing's tumors show a typical chromosomal translocation in >90% of cases linking the EWS gene on chromosome 22q12 to a member of the ETS transcription gene family, most commonly to FLI-1 on 11q24 (5,6), leading to an aberrant transcription factor that promotes tumorigenicity (7-9). Current treatment consists of several rounds of multidrug cytostatic therapy combined with surgery and radiotherapy for local control. With the use of alkylating agents, long-term survival can be achieved in >50% of patients with localized disease, whereas patients with clinically detectable metastases at diagnosis or who are not responding to therapy have a significantly poorer prognosis, with long-term survival decreasing to 15-25%, especially for patients with bone metastases (10). As the survival rates for metastatic and relapsed osteosarcoma (OS) or ES patients have not changed in the past 30 years despite the use of intensive chemotherapy (11), new therapeutic approaches are therefore needed.

Among new strategies, Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL or APO-2L) is a promising candidate. TRAIL is a member of the TNF superfamily that exerts a strong anti-tumor activity in a wide range of cancer cell lines while being minimally cytotoxic to most normal cells and tissues (12).

TRAIL binds five known receptors: two death receptors acting as activating receptors [DR4 (TRAIL-R1) and DR5 (TRAIL-R2)] and three decoy receptors [DcR1 (TRAIL-R4), DcR2 (TRAIL-R5) and secreted osteoprotegerin (OPG, a member of the TNF receptor superfamily: TNFRSF11B)](13). The TRAIL decoy receptors are unable to trigger a death signal because they lack a functional death domain (14). TRAIL activates the extrinsic apoptotic pathway by inducing Fas associated death domain (FADD) protein recruitment to the Death Domain (DD), leading to caspase 8 activation and caspase 3 cleavage (15). In addition, it has been shown that TRAIL can induce the mitochondrial intrinsic apoptotic pathway through caspase 8 activation followed by NFκB and Bid recruitment (16). Recombinant human (rh)TRAIL is being clinically evaluated for the treatment of both solid tumors and hematological malignancies. A phase I trial with rhTRAIL is completed, showing no dose-limiting toxicities or clearly attributable toxicities to TRAIL (17). No anti-rhTRAIL antibodies have been detected. Clinical trials are also currently in progress testing fully-humanized activating monoclonal antibodies directed against DR4 or DR5. Several Phase 1 and 2 studies targeting DR4 (Mapatumumab, TRM-1) or DR5 (Lexatumumab) are carried out in patients with solid malignancies, associated or not to chemotherapy (18-22). Despite limited timespan, these studies show promising results on tumor progression. Kontny and coll. reported that 80% of ES tumors express DR4 while all express DR5 (23). In another study, it has been shown that 72% of ES tumor samples express both DR4 and DR5 (out of 32 samples), 25% express one receptor and only 3% express none (24). These results suggest a high proportion of TRAIL sensitivity in ES tumors.

We have previously reported that TRAIL is indeed a good candidate for Ewing's sarcoma therapy as it inhibited cell progression and increased animal survival in a xenograft model of Ewing's sarcoma induced by TRAIL-sensitive cell lines (25). However, half of the Ewing's sarcoma cell lines were resistant to TRAIL (4/8) suggesting that TRAIL or agonist antibodies cannot be proposed to all patients. Data from the literature have reported that TRAIL resistance occurs in numerous cancer cell lines, which can be attributed to dysfunctions in the TRAIL signaling pathway (14,26). Among the major causes of TRAIL resistance, one is linked to the absence of activating DR4 and/or DR5 death receptors expressed on the surface of tumor cells leading to an imbalance of the ratio death/decoy receptors (27). Initiation of death receptors DR4 and/or DR5 triggered apoptosis by formation of the death inducing signaling complex (DISC) after recruitment of FADD which binds procaspase-8 leading to caspase-8 activation. However, the presence of internal regulators of apoptotic machinery including cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP), a structural analogue of pro-caspase 8 which inhibits caspase-8 activation, is another important determinant (28).

The aim of the present study is to analyse the molecular mechanisms underlying TRAIL resistance in Ewing's sarcoma cell lines. For this purpose, seven human cell lines were studied, all expressing the *EWS-FLI-1* fusion gene but differing in their mutation status for p53, p16, p14... The main finding of this study is the existence of a functional truncated form of DR4 in Ewing's sarcoma cells, restoring TRAIL sensitivity when re-expressed in resistant cell lines. The other main finding is the specific TRAIL sensitivity linked to DR4 expression (as both short and long forms) in Ewing's sarcoma, independant of the predominant DR5 expression. We also demonstrated that the down-regulation of *c-FLIP* expression in resistant Ewing's sarcoma cells represents another way to re-sensitize these cells to TRAIL.

Experimental procedures

Ewing'sarcoma cell lines- Eight human Ewing's sarcoma cell lines were used: A673, TC-32, SK-ES-1, SK-N-MC, RD-ES, EW24 and TC71. The cell lines A673, TC-32, SK-ES-1, and RD-ES were cultured in DMEM (BioWhittaker) with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone) and SK-N-MC, EW24 and TC71 cells were cultured in RPMI (BioWhittaker) with 10% FBS. In addition, EW7 and TC71cells require type I collagen to grow.

Cells (2.93 HEK293) derived from human fetal kidney used in *in vitro* cell transfection assays (29) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 2 mM l-glutamine.

Mitochondrial activity - The mitochondrial activity was determined by a colorimetric assay using sodium 3′ [1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro-)benzene sulfonic acid hydrate (XTT) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Two thousand cells per well were plated into 96-well plates and cultured for 72 hours in culture medium with two treatements with 0, 50 or 100 ng/ml of

TRAIL (R&D systems). After the culture period, XTT reagent was added to each well and incubated for 5 hours at 37°C; absorbance was then read at 490 nm using a 96-multiwell microplate reader.

Caspase activity - Subconfluent Ewing's sarcoma cells cultured in 24-well plates were treated with 50 ng/mL TRAIL for 1 to 6 h, washed, and lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer [150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris (pH 7.4), 1% NP40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mmol/L Na_3VO_4, 0.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mmol/L NaF, 10 μg/mL leupeptin, and 10 μg/mL aprotinin] for 30 min. The cells were then scraped off and the lysates were cleared of debris by centrifugation at 12,000 *g* for 15 min, after which total protein was quantified using the bicinchoninic acid + copper II sulfate assay (Pierce Chemical). Caspase-3 activity was assessed in 10 μL of cell lysate with the CaspACE assay kit (Promega) following the manufacturer's recommendations. UV treated cells were used as positive control for caspase activity.

Flow cytometry - Cell death was determined by Apo2.7-PE staining as described previously (30). Briefly, cells were harvested with PBS containing EDTA, washed and stained with anti-APO2.7-PE mAb (Beckman Coulter). Fluorescence was analyzed on a FACsCalibur cytometer (BD Biosciences). To determine cell surface expression of DR4 or DR5, cells were stained with PE-conjugated anti-DR4 or DR5 (eBioscience) or PE-conjugated mouse as an isotype control (Beckman Coulter). A minimum of 10 000 cells was analyzed on a FACSCalibur flowcytometer (BD Biosciences). Cell viability was determined with PE-conjugated Apo2.7 labeling and analyzed by flow cytometry.

Cell transfection - Transfections with pcMV-SPORT6-DR4 (imaGenes GmbH, Berlin) were performed thanks to polyethyleneimine (PEI, kindly provided by Dr B. Pitard, UMR915, Nantes, France). PEI/DNA complexes were prepared by equivolumetric mixing polyethyleneimine (charge ratio, ±4) in water with plasmid DNA solution at the desired concentration (4 μg per well) in 150 mmol/L NaCl. Transfections were done at 70% to 80% of confluence in each well, by adding 200 μL of complex formulations in 0.5 mL of culture DMEM deprived of FBS. After 6 h at 37°C, the transfection medium was replaced by 1 mL of DMEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (complete medium).

RT-PCR analysis - 48 hours after transfection, total RNA was extracted from cells using TRIzol (Tiangen, Beijing, China) following the protocol suggested by the manufacturer. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) after total RNA extraction using Trizol reagent (Invitrogen) was then performed. First, RNA was reverse transcribed using 400 units MMLV-RT (Invitrogen). Then, 2 μL RT reaction mixture was subjected to PCR using upstream (5′-CACCATGGCGCCACCACCAGCTAGAGTAC ATCTA-3′) and downstream (5′-TTAACTCCTAACACCTAAGAGGAAACCTCT GG -3′) primers (30 pmol each) of DR4 and Taq polymerase (1.25 units; Eurobio).

Quantitative RT-PCR analysis - shRNA gene silencing was assessed in subconfluent Ewing's sarcoma cells cultured in six-well plates. c-FLIP and DR4 mRNA expression was determined by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) after total RNA extraction using Trizol reagent (Invitrogen). Briefly, 10 ng of cDNA were amplified using the IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) for the DR4, c-FLIP and DR5 gene. Sense and antisense primers used are as follow (DR4: forward: GGAGGCACAGTGTCTGCTG reverse: CAGCACCATTTGCTGGAAC; c-FLIP: forward: CAGGAACCCTCACCTTGTTT reverse**:** CAGATTTATCCAAATCCTCACCA; DR5: forward: AGAGCCAACAGGTGTCAACAT, reverse: GCCTCCTCCTCTGAGACCTT). Each sample was analyzed twice and quantified with the analysis software of the iCycler iQ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad).

Western blotting - Cells were lysed with a lysis buffer (150 mM NaCl, 5 % Tris, pH 7.4, 1 % Nonidet P-40, 0.25 % Na deoxycholate, 1 mM Na_3VO_4, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μg/ml leupeptin, and 10 μg/ml aprotinin). After 30 min on ice, lysates were cleared by centrifugation at 10 000g for 10 min at 4°C. Total protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid (BCA, Sigma, St Quentin-Fallavier, France) based method. Twenty micrograms of total cell lysate proteins was run on a Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and then electrophoretically transferred to Immobilon-P membrane (Millipore Corporation, Billerica, MA). The membrane was blotted with rabbit antibodies to human c-FLIP (Cell sigalling, MO), rabbit anti-human Caspase-8 (Santa Cruz biotechnology), goat anti-human DR4 (R&D systems), rabbit anti-human DR5 (Cell signaling) and rabbit anti-human actin was used as loading control (Sigma) in PBS, 0.05 % Tween and 3 % bovine serum albumin. The membrane was washed and probed with the

secondary antibody (goat and rabbit respectively) coupled to horseradish peroxidase. Antibody binding was visualized with the Enhanced ChemoLuminescence (ECL) system (SuperSignal West Dura kit; ThermoScientific, Rockford, USA). In order to visualize bDR4, we changed the lysis buffer reagents (10 mM Tris-HCL pH=7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mg/mL aprotinin, 1% Triton X100). Then, after 40 minutes on ice, lysates were cleared by centrifugation at 10,000g for 30 min at 4°C. Heighty micrograms of Cleared lysates were then separated by SDS-PAGE (10% acrylamide) and electrotransferred to Immobilon-P membrane (Millipore Corporation, Billerica, MA). Western blot analysis was performed as before by standard techniques with this time a different ECL detection kit (Pierce Perbio Science France, Brebières, France).

shRNA silencing - Stably modified Ewing's sarcoma cells were obtained by lentiviral cell transduction essentially as described previously (31). Oligonucleotides were designed and cloned into pSUPER to produce the short hairpin RNA shDR4 and shc-FLIP directed respectively against human DR4 and c-FLIP genes. The targeted sequences were GGAGCAGGGACAAGTTAC (start position 1055, NM_003879.4) for c-FLIP and GCACGCTGCTTCTTGGATT (start position 36, NM_003844.3) for DR4. The cloned oligonucleotides were controlled by sequencing (Genome Express, Meylan, France) before subcloning them with the upstream H1 promoter into the vector pFG12 (32). As a control, a vector pFG12 was developed to produce shRNA targeting LacZ gene as done by Qin *et al.* (2003). The resulting constructs allowed the expression of both GFP and target-specific shRNA. They were used for lentivirus production following the protocols provided with the ViraPower Lentiviral Expression System (Invitrogen). A multiplicity of infection of 10 was used to transduce Ewing's sarcoma cells. Seven days after transduction, GFP^+ Ewing's sarcoma cells were sorted out using FACS.

Short DR4 overexpression - Total extract RNA from RD-ES Ewing's sarcoma cell line was reversed transcribed using MMLV-RT. Then, 0.5 µg of cDNA was amplified by PCR thanks to 1 Unit of Platimium® Taq High Fidelity according to the manufacturer recommendation using the following DR4 primers: forward: CACCATGGCGCCACCACCAGCTAGAGTAC ATCTA; reverse: TTAACTCCTAACACCTAAGAGGAAACCTCT GG. Then 0.5 µl of the PCR mixture containing the truncated form of DR4 was cloned into the pLENTI TOPO® plasmid according to the manufacturer protocol of the pLenti6/V5 Directional TOPO® Cloning Kit. The SK-N-MC cell line stably expressing the DR4 truncated form was obtained by transduction with 20 to 150 µl lentiviral particules and selection with 3 µg/ml blasticidine (Sigma).

Modeling DR4 isoforms and TRAIL interaction - The sequence corresponding to the extracellular domain of aDR4 (amino acids 120 to 236 of NP_003835.3) was aligned in Discovery Studio 2.5.5 with its corresponding DR5 domain sequence (69 to 185 of NP_003833.4) and adjusted manually to ensure that the cystein-rich domains were correctly positioned (33). DR5 and aDR4 extracellular domains share 63% identity and 70% similarity. The crystal structure of the DR5-TRAIL complex 1D4V (34) was used to perform the molecular modelling of aDR4 using the DR5 template. Out of the 6 disulfide bridges present on DR5 extracellular domain, only 4 could be matched and modeled for aDR4. The final models were built using Modeller 9v5 (35). All resulting models were assessed for violations using the Protein Health module of Discovery Studio 2.5.5 (Accelrys Inc, San Diego, CA) and corrected when necessary. The DR4-TRAIL complex was produced by molecular replacement of DR5 by the best model of aDR4 in the 1D4V structure. The root mean square difference (RMSD) on main-chain atoms was 0.86 Å between the aDR4 model and the DR5 structure.

Caspase activity - Subconfluent Ewing's sarcoma cells cultured in 24-well plates were treated with 50 ng/mL TRAIL for 1 to 6 h, washed, and lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer [150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris (pH 7.4), 1% NP40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mmol/L Na_3VO_4, 0.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mmol/L NaF, 10 µg/mL leupeptin, and 10 µg/mL aprotinin] for 30 min. The cells were then scraped off and the lysates were cleared of debris by centrifugation at 12,000 *g* for 15 min, after which total protein was quantified using the bicinchoninic acid + copper II sulfate assay (Pierce Chemical). Caspase-3 activity was assessed in 10 µL of cell lysate with the CaspACE assay kit (Promega) following the manufacturer's recommendations. Cells treated one minute with UV were used as positive control for caspase activity.

RESULTS

TRAIL resistance in Ewing's sarcoma cell lines is related to low DR4 levels despite high DR5 expression. DR5 and DR4 were detected by Western blotting on 7 ES cell lines. As shown in Figure 1A, levels of DR5 were similar in all cell lines whereas DR4 levels were higher in RD-ES and TC71 cells than in the 5 other ones. Flow cytometry analyses were performed to determine the presence of both DR4 and DR5 death receptors at the cell surface (Figure 1B). Levels of cell surface DR5 were about 3-fold higher than those detected for cell surface DR4 (range ratio 4.7-6.7 versus 1.2-2.8 respectively). Confirming the different levels of DR4 detection by western blot, flow cytometry analysis showed low cell surface DR4 levels for SK-N-MC cells, intermediate for A673 and high for TC71 (Figure 1B). The same experiment was performed on bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) and none of DR4 and DR5 was detected (data not shown).

Despite DR5 is the predominant TRAIL-activating receptor on ES cells, DR4 implication may be questioned. Indeed, 4 (SK-ES-1, SK-N-MC, EW24 and TC-32 cell lines) out of 7 ES cell lines were resistant to TRAIL induced cell death as shown by XTT cell viability assay (Figure 1C) and low levels of DR4 were observed in these resistant cells (Figure 1A). In contrast, RD-ES and TC71 cell lines with high DR4 levels are TRAIL-sensitive as their viability is reduced to 17.6 ± 2.9% and 34.8 $\pm$ 2.9% respectively after TRAIL treatment (Figure 1C). In the case of the A673 cell line, cell viability was reduced to 16.4 $\pm$ 0.7 % in TRAIL-treated cells which showed intermediate DR4 levels. In addition, no correlation could be demonstrated between decoy receptor (DcR1, DcR2 or OPG) and resistance/sensitivity in all ES cell lines studied (not shown).

Because all TRAIL-resistant cell lines tested express low levels of DR4, we wonder whether this death receptor may be involved in the regulation of TRAIL resistance in ES cells. To demonstrate this hypothesis, two strategies were envisaged: (i) to decrease DR4 expression in sensitive cells and (ii) to re- or over-express it in resistant cells.

DR4/TNFRSF10A knockdown in TRAIL-sensitive TC71 cell line induced TRAIL resistance despite DR5 expression. Sensitive TC71 cells were modified to stably produce either control shRNAs (shLacZ with no target in human cells) or targeting *DR4* mRNA (shDR4) and were named shLacZ or shDR4 TC71, respectively. As shown by real time PCR on reverse-transcribed RNAs, *DR4* expression was significantly reduced (2.6 fold compared to shLacZ transduced TC71 cells) in shDR4 TC71 cells as compared to TC71 or shLacZ TC71 (Figure 2A, left panel). However, a concomitant 2.1-fold increase of *DR5*/*TNFRSF10B* level in shDR4 TC71 cells was noticed, while *DR5* level was similar in shLacZ TC71 as compared to the parental TC71 cell line (Figure 2A, right panel). *DR4* knockdown was associated with a 50% decrease of DR4 protein level in shDR4 TC71 cells as detected by Western blotting (Figure 2B). Moreover, the DR4 reduction was associated with a loss of TRAIL sensitivity. As shown in Figure 2C, 104 $\pm$ 1.9 % viability was observed in shDR4 TC71 cells versus 39.7 ± 3.9 % and 67.2 ± 7 % respectively for the parental or shLacZ TC71 cell lines after 50 ng/ml TRAIL treatment, and 102.2 $\pm$ 15.4 % versus 19.5 $\pm$ 2.6 % and 28 $\pm$ 3.7 % respectively after 100 ng/ml TRAIL treatment. These results indicated that DR4 and DR5 functions may not be redundant. Indeed, even if the loss of DR4 seemed to be compensated by an augmentation of DR5 expression, it is not associated with restoration of TRAIL-sensitivity.

Identification of a new DR4 splice transcript encoding a DR4 isoform truncated in the TRAIL-binding domain. In order to re-sensitize TRAIL-resistant cell lines to TRAIL by overexpressing DR4, we performed *DR4* cDNA amplification for cloning into lentivirus vector. As expected, using primers encompassing the start codon and beyond the stop codon of the *DR4* sequence (accession number NM_003844), a 1400 bp fragment was obtained on reverse-transcribed RNAs of TC71 and RD-ES cells (Figure 3A). Surprinzingly, only a smaller fragment (900 bp) was obtained when these primers were used on reverse-transcribed RNAs from 293FT cells transfected with a *DR4*-expressing plasmid (pCMV-sport6-DR4). We suspected that this unexpected isoform could result from an alternative splice site of *DR4* transcript because i) the expected 1400 bp fragment was amplified with the same primers directly from pCMV-sport6-DR4 DNA plasmid and ii) an additional fragment of 900 bp was also noticed within RT-PCR products of TC71 and RD-ES RNAs (Figure 3A). The 900 bp *DR4* cDNA derived from RD-ES RNAs was cloned and sequenced. The comparison of both (900 and 1400 bp) sequences showed a 473 bp deletion at the beginning of *DR4* exon 1 to the end of exon 3, and then sequence identity beyond this deletion until the stop codon (Figure 3B). This deletion

including nucleotides 138 to 611 of NM_003844 *DR4* sequence identifies an alternative intron as it shows typical intron feet [gt-ag].

The 900 bp *DR4* cDNA was designed variant b (*bDR4*) as it could produce a protein shorter than the 1400 bp one designed variant a (*aDR4*). The *bDR4* transcript could potentially encode a 310 amino acid protein which corresponds to the 468 amino acid aDR4 but truncated of amino acids 11 to 168 within the extracellular TRAIL-binding domain. However, this truncated region shares 45% identity and 59% similarity with the corresponding DR5 region, whereas the remaining extracellular TRAIL-binding domain shares 76% identity and 84% similarity with the corresponding DR5 one (Figure 3C).

Based on DR5-TRAIL crystal structure and DR5-DR4 similarities, the interactions of aDR4 or bDR4 to TRAIL were simulated. The DR5-TRAIL binding interface is 1398 Å² wide, while the predicted aDR4-TRAIL one is 1196 Å². According to our modeling study, the contact of bDR4 with TRAIL appeared largely preserved with a relatively limited interface decrease (882 Å² for the bDR4-TRAIL binding interface). This difference is mainly related to the absence within bDR4 of Ala163, Pro166 and Thr168 which are involved in the predicted aDR4-TRAIL interaction (Figure 3D). However, the molecular dynamics simulation of the bDR4-TRAIL interface indicates that the bDR4-TRAIL binding is conserved even without these amino acids.

TRAIL sensitivity is induced by bDR4 overexpression in TRAIL-resistant SK-N-MC cell line. After *bDR4* cDNA cloning into lentivirus vector, SK-N-MC cells were transduced with different quantities of virus-containing supernatant (20, 50, 100 and 150 µL), then derived cell lines were designed bDR4-20,-50, -100 or -150 SK-N-MC, respectively. As shown on Figure 4A (left panel), these derived cells produced various levels of bDR4 which were correlated to the volumes of virus-containing supernatant. Using higher polyacrylamide gel electrophoresis resolution, both aDR4 and overexpressed bDR4 isofoms were identified in bDR4-150 SK-N-MC cells (Figure 4A, right panel). Additionally, bDR4 was detected as a minor isoform in TC71 and A673 cells, but also in the human multiple myeloma cell lines as shown for an example with the KMM1 cell line. The proportion of bDR4 relative to aDR4 appeared more abundant in A673 cells than in KMM1 cells. SK-N-MC cells transduced with the truncated isoform *bDR4* showed a gain of sensitivity to TRAIL induced apoptosis. Indeed, around 95% of viability was observed after TRAIL treatment for parental, bDR4-20 or bDR4-50 SK-N-MC cells versus 78.9 $\pm$ 2.5 % to 50.4 + 5.2 % for bDR4-100 and -150 SK-N-MC cells (Figure 4B). Apoptosis assessed by APO2.7-PE staining in flow cytometry showed a 2-fold increase in TRAIL-induced apoptosis for bDR4-100 SK-N-MC cells as compared to parental cells (Figure 4C).

These results indicated that TRAIL was able to induce apoptosis through the bDR4 truncated isoform while DR5 is not able to transduce TRAIL signaling.

c-FLIP knockdown induces TRAIL sensitivity in originally resistant SK-N-MC cell line. TRAIL-induced apoptosis pathway can be regulated by the competitive recruitment of procaspase-8 and c-FLIP, as respective caspase initiator and negative regulator. As shown in Figure 5A, procaspase-8 and c-FLIP levels are not correlated to sensitivity or resistance of ES cell lines. Indeed, pro-caspase 8 levels were higher in only one of the three TRAIL sensitive Ewing's sarcoma cell lines (RD-ES versus A673 and TC71) and in one TRAIL-resistant cell line as compared to the three others (TC-32 versus EW24, SK-N-MC, SK-ES-1). Additionally, similar levels of c-FLIP were detected in the four TRAIL-resistant cell lines (EW24, SK-N-MC, SK-ES-1 and TC-32) as compared to the three TRAIL-sensitive ones (RD-ES, A673 and TC71) (Figure 5A). However, the implication of c-FLIP in two TRAIL-resistant cell lines (EW24 and SK-N-MC) was tested by developing their shRNA mediated *c-FLIP* knockdown counterparts. As shown by real time PCR on reverse-transcribed RNAs, *c-FLIP* expression was significantly reduced (1.8 fold for SK-N-MC and 2.3 for EW24 compared to shLac transduced corresponding cell lines) cells after transduction with lentivirus expressing shRNA targeting *c-FLIP* (designed shc-FLIP) as compared to parental or shLacZ cell lines (Figure 5B). Such *c-FLIP* knockdown in EW24 or SK-N-MC cells led to a decrease of TRAIL- resistance: 59.1 $\pm$ 3.1 % and 18.7 $\pm$ 2.05 % of cell viability were respectively observed for shc-FLIP-EW24 or -SK-N-MC cells, as compared to 105 $\pm$ 6.5 % - 89 $\pm$ 6.2 % cell viability for parental and shLacZ-EW24 or -SK-N-MC cells (Figure 5C). Moreover, caspase-3 activity was increased following TRAIL treatment in *c-FLIP* knockdown cell lines but not in the parental or shLacZ counterparts. These results indicated that in spite of similar c-FLIP expression in resistant/sensitive cell lines, c-FLIP is implicated in TRAIL-resistance of Ewing'sarcoma cell lines.

DISCUSSION

Ewing's sarcoma (ES) family of tumors are a group of aggressive solid bone and soft tissue malignancies of children and young adults characterized by specific chromosomal translocations that gave raise to aberrant transcription factors. Over the last decades, the knowledge of the cellular and molecular biology of the ES has remarkably increased leading to the development of multidisciplinary therapeutic strategies. However, the prognosis and survival of patients with metastatic or recurrent disease remains very poor. Therefore, there is still a crucial need for better therapeutic approaches for the treatment of ES. Among new therapeutic options, TRAIL, a member of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily is a promising candidate as it induces apoptosis predominantly in cancer cells, while sparing normal cells. Moreover, combined treatment of TRAIL with chemotherapy or gamma-irradiation synergized to achieve antitumor activity in tumor cell lines and also in tumor models *in vivo*. Concerning Ewing's sarcoma, TRAIL induces cell apoptosis *in vitro* for sensitive cell lines and *in vivo* in corresponding experimental models (23-25). However, failure to undergo apoptosis in response to TRAIL treatment may result in resistant tumor cells. Understanding the molecular events that regulate TRAIL-induced apoptosis and their deregulation in resistant forms of cancer may provide new opportunities for cancer therapy. Several malignant tumors such as pancreatic tumors, neuroblastoma and malignant melanoma are resistant to TRAIL. Many resistance mechanisms developed by cancer cells have been already described in the signaling pathway of TRAIL, for example by diminution of the ratio death/decoy receptors or inhibition of TRAIL signaling pathway [c-FLIP over-expression, caspase-8 down-regulation, involvement of IAP (inhibitor of apoptosis proteins), MCL-1, BCL-2…] (36). Understanding these mechanisms is necessary to consider therapeutic use of TRAIL or agonists of its death receptors in cancers.

It has been demonstrated in Ewing's sarcoma that TRAIL resistance could be related to caspase-8 deficiency as a decrease of its expression is observed in 20% of ES patients (37). Therefore by increasing caspase-8 expression, interferon (IFN)-γ could sensitize ES cells to TRAIL induced apoptosis (23,28). In addition, no current correlation has been observed between TRAIL resistance in ES cell lines and death receptor or c-FLIP expression (37). However, as preliminary data from our group showed that half of human ES cell lines tested were resistant to TRAIL (25), we decided to focus on two potential regulation levels of TRAIL resistance in ES: the ratio death/decoy receptors and the balance c-FLIP/caspase-8 in seven human ES cell lines. These cell lines all express the *EWS-FLI1* fusion gene but differ in their p53, p16 or p14 mutation status, reproducing the variability observed in patients.

In the present study, we demonstrated that all ES cell lines expressed high levels of DR5, while DR4 was expressed only by 2 sensitive cell lines out of 3, the third one presenting intermediate levels. None of the 4 resistant cell lines express significant levels of DR4. Furthermore, no correlation could be established with decoy receptor expression and TRAIL-resistance (not shown). The correlation between TRAIL sensitivity and DR4 expression alone had never been described in ES. A lonely publication reported that 9 of 10 ES cell lines expressed both DR4 and DR5 (western-blotting), whereas a TRAIL-resistant cell line expressed only DR4 (24). The authors reported that DR4 was absent from the cell surface in the resistant cell line and two additional cell lines, and they suggest that it may be non functional. In the present study, we found DR4 functional in the sensitive cell lines, and its overexpression in TRAIL-resistant cells restored sensitivity. The study from Mitsiades *et al* concluded that TRAIL sensitivity is related to DR5 expression, the resistance of the cell line being overcame by restoration of DR5 levels by transfection (24). They concluded that TRAIL sensitivity of ES was mainly based on the presence of DR5/DR4 rather than the presence of decoy receptors or c-FLIP expression. We share the same conclusion, except that, in the present study, we demonstrated the pivotal role of DR4 rather than DR5 by two complementary approaches: firstly, DR4 knockdown in TRAIL-sensitive TC-71 cell line induced TRAIL resistance despite DR5 expression and secondly, DR4 overexpression in resistant cells restored their sensitivity. Therefore, overexpression of DR4 may represent an alternative strategy to restore TRAIL sensitivity in ES cells and models.

During DR4 cloning procedure, we evidenced a splice transcript of DR4 corresponding to a new isoform truncated in the TRAIL-binding domain. Transcriptional modification by alternative splicing is known to be involved in the regulation of programmed cell death (38). Thus, alternative splicing has also been

identified in genes of the TRAIL-system, including DR4 and DR5; however, the isoform presented here has never been reported. For example, two isoforms of the DR5/TRICK2/TRAIL-R2/KILLER differing by a 29 amino-acid extension in the extracellular domain are generated by alternative pre-mRNA splicing (39). The inserted sequence may represent a retained intron as it has flanking sequences that match consensus 5' and 3' splice sites. The authors hypothesized that the expression of these two isoforms of TRICK2/DR5 which have different spacings between the transmembrane domain and the TRAIL-binding domain, might regulate the response to TRAIL. In the present study, bDR4 was detected as a minor form in TC71 and A673 cells, but also in the human multiple myeloma cell line KMM1. The proportion of bDR4 relative to aDR4 appeared more abundant in the ES cell line A673 than in KMM1 cells, suggesting that the new *DR4* alternative splicing described here could be regulated by cell-specific factors and may not be an aberrant splicing which occurs proportionally to *DR4* total expression. Therefore, it seems that DR4 splicing is not influenced by the initial amount of DR4 transcript in ES or in other tumor cells. In our models, the sensitivity of ES cells to TRAIL is not related to the aDR4/bDR4 ratio; but rather to the presence of DR4, expressed as truncated or complete forms, even if DR5 is predominant. This result seems to be specific to ES as it never had been reported in other cancer systems.

In our study, we demonstrated that the truncated DR4 isoform is functional because its overexpression in TRAIL-resistant SK-N-MC cells induced a gain of sensitivity to TRAIL-induced cell death. This result implies potential trimerisation of bDR4 as homo-trimerisation or hetero-trimerisation with aDR4. The TNFR superfamily trimerisation mode is still under investigation, but it is now clear that different mechanisms co-exist in parallel. In the case of the TNF-R1, it is demonstrated that the presence of a Pre-Ligand-binding Associative Domain (PLAD) is essential to obtain the fully functional trimeric complex (40). This trimeric complex pre-exists before binding of the ligand TNF α or β. In the case of TRAIL membranous death receptors (DR4 and DR5), the N-terminal end does not possess this PLAD but rather adopts an "N-motif" structure (41). There are some evidences indicating that the complete receptor exists as a trimer prior to ligand binding (42). As observed in our study, the lack of this "N-motif" in the short form of DR4 is not a pre-requisite for the receptor activity. At this stage, we have no indication concerning the trimeric nature of the short form in the absence of TRAIL. Since both the truncated and the complete DR4 isoforms are able to transduce TRAIL signaling, it indicates that the short DR4 isoform does not prevent the DR4 trimerisation necessary for TRAIL binding. It is known that TRAIL binds with a high specificity to DR5 via its loop AA' since the removal of this loop nearly abolishes DR5-TRAIL recognition (34). This TRAIL loop is in direct interaction with the Cystein Rich Domain (CRD) 2 domain of DR5/DR4 but not with the CRD1 domain (34). Our modelling study indicates that the CRD2 domain involved in TRAIL binding is maintained in the bDR4 isoform. This suggests that most of the TRAIL-bDR4 binding specificity can be attributed to the CRD2 domain. This would explain why bDR4 is still able to sensitize cells to TRAIL activity.

Another interesting and novel result of this study relies to a second level of regulation of TRAIL resistance in ES, linked to c-FLIP downregulation. Indeed, even if no correlation could be evidenced between c-FLIP expression (or the ratio c-FLIP/caspase-8) and TRAIL sensitivity/resistance in ES cells, we demonstrated that *c-FLIP* knockdown induced sensitivity in originally TRAIL-resistant SK-N-MC cell line. It is well known that TRAIL-induced apoptosis pathway can be regulated by the competitive recruitment of procaspase-8 and c-FLIP, respectively as initiator or repressor of caspase-8 activity. Several publications have reported that inhibition of c-FLIP expression could represent an interesting strategy to sensitize TRAIL-resistant cells whatever the initial level of c-FLIP expression (43-45). Therefore, using a RNA interference strategy, we demonstrated that *c-FLIP* knockdown in TRAIL-resistant EW24 or SK-N-MC cells restored TRAIL-sensitivity associated with an increased caspase-3 activity. We therefore hypothesize that the involvement of c-FLIP in TRAIL-resistance in ES cells may be linked to its differential recruitment within the death-inducing signaling complex (DISC). In RD-ES, A673, and TC-71 TRAIL-sensitive cell lines, cells express higher levels of DR4 (including both truncated and complete DR4 isoforms) than in resistant cells, but always less than DR5 levels. The intracellular domain of death receptors DR5 or DR4 binds FADD via the death domain (DD) then FADD binds caspase-8 through death effector domain (DED) leading to the DISC formation and death signal transduction. The presence of c-FLIP

interferes with procaspase-8 through the DED domain, acting as a competitor and inhibiting the procaspase-8 cleavage thus caspase-8 activation. In sensitive ES cells, DR4 is expressed together with DR5, inducing a high DISC formation with procaspase-8 recruitment that cannot be competed by c-FLIP (Figure 6A). [It seems that the presence of DR4 in sensitive cells preferentially induces procaspase-8 recruitment rather than c-FLIP]. Because no significant difference have been observed in the procaspase-8/c-FLIP ratio between resistant and sensitive ES cells as analysed by western-blotting, other hypotheses could be proposed: (i) the relative availability of both protagonists (procaspase-8 or c-FLIP) is different in the cytoplasm near the DR4 or DR5/FADD/DED complex depending on the presence of lipid rafts, (ii) the relative affinity between FADD (linked to the intracellular domains of death receptors) to procaspase-8 or c-FLIP is different between DR4 and DR5, (iii) the procaspase-8 recruitment is more rapid or effective when DR4 is expressed than with DR5. These hypotheses have been partly confirmed when sensitive cells are treated with shDR4: the level of DR4 is decreased, so procaspase-8 is less recruited in DISC formation, and c-FLIP is therefore able to inhibit caspase-8 cleavage, then to induce TRAIL resistance.

TRAIL-resistant cell lines (TC-32, EW24, SK-ES-1, SK-N-MC) express low (or no) levels of DR4, but still DR5. The addition of TRAIL induced the DISC formation but in a lesser extend than in DR4-expressing sensitive cells (Figure 6B). c-FLIP is therefore able to inhibit caspase-8 cleavage in this complex. When resistant cells are treated with shc-FLIP, apoptosis is restored as the DISC complex could be activated. The other strategy developed to re-sensitize TRAIL-resistant ES cells is to overexpress DR4 (as truncated or complete isoform), restoring higher DISC formation by procaspase-8 binding to FADD, leading to apoptosis.

In conclusion, by using shDR4 in sensitive cells and overexpressing DR4 in TRAIL-resistant cells, the results presented in this study demonstrated that DR4 is involved in TRAIL sensitivity in ES. We also evidenced a new isoform of DR4 as a consequence of an alternative transcript lacking exons 1-3, which is still functional and induced apoptosis through TRAIL binding. Finally, we hypothesized that the resistance/sensitivity in Ewing's sarcoma cells is linked to the DISC formation regulated by c-FLIP, the DISC formation being related to the presence of DR4 (in sensitive cells) or not (resistant cells).

REFERENCES

1. Ewing, J. (1921) *Proc NY Pathol Soc* **21**, 17-2
2. Hense, H.W., Ahrens, S., Paulussen, M., *et al*. (1999) *Klin Pediatr* **211**, 271-5.
3. Stiller, C.A., Bielack, S.S., Jundt, G., and Steliarova-Foucher, E. (2006) *Eur J Cancer* **42**, 2124-2135.
4. Lau, Y.S., Adamopoulos, I.E., Sabokbar, A., Giele, H., Gibbons, C.L.M.H., and Athanasou, N.A. (2007) *Br J Cancer* **96**, 1716-1722.
5. Jaffe, R., Santamaria, M., Yunis, E.J. *et al*. (1984) *Am J Surg Pathol* **8**, 885-898.
6. Folpe, A.L., Chand, E.M., Goldblum, J.R., and Weiss, S.W. (2001) *Am J Surg Pathol* **25**, 1061-1066.
7. May, W.A., Gishizky, M.L., Lessnick, S.L. *et al*. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5752-5756.
8. Nakatani, F., Tanaka, K., Sakimura, R. *et al*. (2003) *J Biol Chem* **278**, 15105-15115.
9. Dauphinot, L., De Oliveira, C., Melot, T. *et al*. (2001) *Oncogene* **20**, 3258-3265.
10. Cohen, M.D., Bugaieski, E.M., Haliloglu, M., Faught, P., and Siddiqui, A.R. (1996) *Radiographic* **16**, 523-45.
11. Cotterill, S.J., Ahrens, S., Paulussen, M. *et al.* (2000) *J Clin Oncol* **18**, 3108-3114.
12. Bouralexis, S., Findlay, D.M., and Evdokiou, A. (2005) *Apoptosis* **10**, 35-51.
13. Holen, I., and Shipman, C.M. (2006). *Clin Sci (Lond)* **110**, 279-291.
14. Zhang, L., and Fang, B. (2005) *Cancer Gene Ther* **12**, 228-237.
15. Liabakk, N.B., and Espevik, T. (2004) *Vitam Horm* **12**, 65-79.
16. Kruyt, F.A. (2008) *Cancer Lett* **263**, 14-25.
17. Herbst, R., Mendolson, D., Ebbinghaus, S. *et al.* (2006) *P. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 3013-.
18. Tolcher, A.W., Mita, M., Meropol, N.J., *et al.* (2007) *J. Clin. Oncol*. **25**, 1390-1395.
19. Leong, S., Cohen, R.B., Gustafson, D.L., *et al*. (2009) *J. Clin. Oncol.* **27**, 4413-4421

20. Plummer, R., Attard, G., Pacey, S., *et al*. (2007) *Clin. Cancer Res*. **13**, 6187-6194.
21. Wakelee, H.A., Patnaik, A., Sikic, B.I., *et al*. (2010) *Ann. Oncol*. **21**, 376-381.
22. Adams, C., Totpal, K., Lawrence, D., *et al.* (2008) *Cell Death Differ*. **15**, 751-761.
23. Kontny, H.U., Hämmerle, K., Klein, R., Shayan, P., Mackall, C.L., and Niemeyer, C.M. (2001) *Cell Death Differ* **8**, 506-514.
24. Mitsiades, N., Poulaki, V., Mitsiades, C., and Tsokos, M. (2001) *Cancer Res* **61**, 2704-2712.
25. Picarda, G., Lamoureux, F., Geffroy, L., *et al* (2010) *Clin Cancer Res* **16**, 2363-2374.
26. Kurbanov, B.M., Fecker, L.F., Geilen, C.C., Sterry, W., and Eberle, J. (2007) *Oncogene* **26**, 3364-3377
27. Wang, S., and El-Deiry, W.S. (2003) *Oncogene* **22**, 8628-8633.
28. Zhang, X.D., Franco, A., Myers, K., Gray, C., Nguyen, T., and Hersey, P. (1999) *Cancer Res*. **59**, 2747-2753.
29. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977) *J Gen Virol.* **36**, 59-74
30. Menoret, E., Gomez-Bougie, P., Geffroy-Luseau, A., *et al ;* (2006) *Blood* **108**, 1346-1352.
31. Trichet, V., Benezech, C., Dousset, C., Gesnel, M.C., Bonneville, M., and Breathnach, R. (2006) *J Immunol.* **177**, 6129-6136.
32. Qin, X.F., An, D.S., Chen, I.S., and Baltimore, D. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 183-188
33. .Naismith, J.H., and Sprang, S.R. (1998) *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 74-79.
34. Mongkolsapaya, J., Grimes, J.M., Chen, N., *et al*. (1999) *Nat Struct Mol Biol* **6**, 1048-1053.
35. Sali, A., and Blundell, T.L. (1993) *J Mol Biol* **234**, 779-815.
36. Mahalingam, D., Szegezdi, E., Keane, M., Jong, S.D., and Samali, A. (2009) *Cancer Treat. Rev*. **35**, 280-288.
37. Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P.H., and Kirchhoff, S. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8247-8254.
38. Jiang, Z.H., and Wu, J.Y. (1999) *Proc Soc Exp Biol Med* **220**, 64-72.
39. Screaton, G.R., Mongkolsapaya J., Xu, X-N., Cowper A.E., McMichael A.J., and Bell, J.I. (1997) *Curr Biol* **7**, 693-696.
40. Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., and Lenardo, M.J. (2000) *Science* **288**, 2351-2354.
41. Wassenaar, T.A., Quax, W.J., and Mark, A.E. (2008) *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **70**, 333-343.
42. Lee, H.W., Lee, S.H., Lee, H.W., Ryu, Y.W., Kwon, M.H., and Kim, Y.S. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 1205-1212
43. Galligan, L., Longley, D.B., McEwan, M., Wilson, T.R., McLaughlin, K., and Johnston, P.G. (2005) *Mol Cancer Ther* **4**, 2026-2036.
44. Longley, D.B., Wilson, T.R., McEwan, M., *et al* (2006) *Oncogene* **25**, 838-848.
45. Wilson, T.R., McLaughlin, K.M., McEwan, M., *et al.* (2007) *Cancer Res.* **67**, 5754-5762
46. Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A, Clamp, M., Barton, G.J (2009) *Bioinformatics* **25**, 1189-1191

FOOTNOTES

We greatly appreciate the kind gift of A673, TC-32, SK-ES-1, SK-N-MC, and RD-ES Ewing's sarcoma cell lines by Dr Susan Burchill (Children's Hospital, Leeds, United Kingdom) and EW24 and TC71 cell lines by Dr. Olivier Delattre (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale U830, Paris, France).
The work was supported by the "Fédération Nationale Enfants et Santé", the "Société Française de lute contre les Cancers et les leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent".

The abbreviations used are: ES, Ewing's sarcoma; TRAIL, TNF Related Apoptosis Inducing Ligand; DD, Death Domain; DISC, Death Inducing Signaling Complex; TNF, Tumor Necrosis Factor; DR, death receptor; c-FLIP, cellular FLICE inhibitory protein; FADD, Fas associated death domain.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. TRAIL activator receptors (DR4, DR5) detection and TRAIL sensitivity in Ewing's sarcoma cell lines.
(A) DR5 and DR4 detection was assessed by Western blotting from total lysates of 7 ES cell lines. (B) DR5

and DR4 detection at the cell surface of A673, TC71 and SK-N-MC cells was analysed by flow cytometry (unshaded peaks), isotype control is shown as shaded peaks. Results are expressed as the relative Mean Fluorescence Intensity (MFI) corresponding to the ratio: MFI of the sample analysed for DR4 or DR5 Ab / MFI with the control isotype. (C) TRAIL sensitivity of the 7 ES cell lines was determined by XTT assay after 50 ng/mL TRAIL treatment for 72 hours.

Fig. 2. *DR4* knockdown in TRAIL-sensitive TC71 cell line. (A) *DR4* and *DR5* expression were assessed by real time PCR on reverse-transcribed RNAs of parental TC71 or counterparts shLacZ or shDR4 TC71 cells which were modified to produce either shRNAs targeting the bacterial transcript for beta-galactosidase (shLacZ) or shRNAs targeting *DR4* transcripts (shDR4). (B) DR4 detection was assessed by Western blotting of total cell lysates of parental TC71, shLacZ and shDR4 cells. (C) TRAIL sensitivity of the corresponding cell lines was determined by XTT assay after 50 ng/mL TRAIL treatment for 72 hours.

Fig. 3. New *DR4* alternative transcript and its predicted bDR4 protein. (A) PCR amplification of *DR4* cDNA either after reverse transcription of RNAs of TC71 and RD-ES Ewing'sarcoma cell lines, or in 293FT cells transfected with pCMV-sport6-DR4 (pDR4-293FT), or directly from 50 ng of pCMV-sport6-DR4 (pDR4). (B) *DR4* gene structure is displayed by boxes and triangles for exons and introns respectively whose sizes (bp) are indicated. Untranslated regions are shaded. *aDR4* cDNA (1400 bp; NM_003844) with numbered exons displayed by boxes is compared to *bDR4* (900 bp; BankIt1442931 bDR4 JF729355) cDNA. The alternative intron containing part of exon 1, exon 2 and part of exon 3 is displayed by a broken line and the two nucleotides at both sides of this intron are indicated. (C) The aDR4 and bDR4 sequences are aligned against the 69 to 185 amino acids of DR5, which correspond to the resolved DR5 crystal structure. Sequences were aligned using Jalview (46). Amino acids are highlighted using the Zappo color scheme (based on their physico-chemicals properties), the consensus is displayed as a sequence logo. Disulfide bridges are represented by red lines. (D) Diagrams of predicted TRAIL (cyan) binding to aDR4 (red) or bDR4 (purple) are shown. The amino acids Ala163, Pro166 and Thr168 which are present in the aDR4-TRAIL binding interface but absent of the bDR4-TRAIL one are indicated.

Fig. 4. *bDR4* overexpression in TRAIL-resistant SK-N-MC cell line. (A) bDR4 isoform was detected by Western blotting in SK-N-MC cells transduced with *bDR4*-expressing virus contained in 50, 100 or 150 µL of supernant (left panel). Both aDR4 and bDR4 were distinguished after high-resolution polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting in KMM1, TC71, A673 and bDR4-150 SK-N-MC cell lines (right panel). (B) TRAIL sensitivity was determined by XTT assay for transduced and parental SK-N-MC and A673 cell lines after 72-hour treatment with 50 ng/mL TRAIL. (C) Percentage of cell death induced by a 48-hour treatment with 100 ng/mL TRAIL was determined by flow cytometry analysis after Apo2.7-PE staining.

Fig. 5. *c-FLIP* knockdown in TRAIL-resistante EW24 and SK-N-MC cell lines. (A) c-FLIP and procaspase-8 were detected by Western blot of total cell lysates of 7 Ewing's sarcoma cell lines. Actin was used as loading control. (B) *c-FLP* expression was assessed by real time PCR on reverse-transcribed RNAs of EW24 and SK-N-MC cells unmodified or modified with lentivirus expressing shRNAs which target either beta-galactosidase or *c-FLIP* transcripts (shLacZ and shc-FLIP, respectively). (C) TRAIL sensitivity was determined by XTT assay for transduced and parental EW24 or SK-N-MC cell lines after 72-hour treatment with 50 ng/mL TRAIL. (D) Caspase-3 activity was determined by enzymatic assay after 1-6 hours incubation of EW24 (left panel) and SK-N-MC (right panel) cells in the presence of 50 ng/mL TRAIL. UV exposition during 1 minute was used as positive control.

Fig. 6. Hypothesis of TRAIL-resistance or sensitivity regulation by DISC formation and c-FLIP competiton in Ewing's sarcoma cells. (A) in TRAIL-sensitive cell lines, DR4 is expressed at high levels together with DR5, the intracellular domain of DR5 or DR4 binds FADD via the death domain (DD) then FADD binds caspase-8 through death effector domain (DED) inducing a high DISC formation that cannot be competed by c-FLIP (the presence of c-FLIP interferes with procaspase-8 through the DED domain, acting as a competitor and inhibiting the procaspase-8 cleavage thus caspase-8 activation). (B) TRAIL-resistant cell lines express low (or no) levels of DR4, but still DR5. The addition of TRAIL induced the DISC formation but in a lesser extend than in DR4-expressing sensitive cells, c-FLIP being therefore able to inhibit caspase-8 cleavage in this complex.

Figure 1

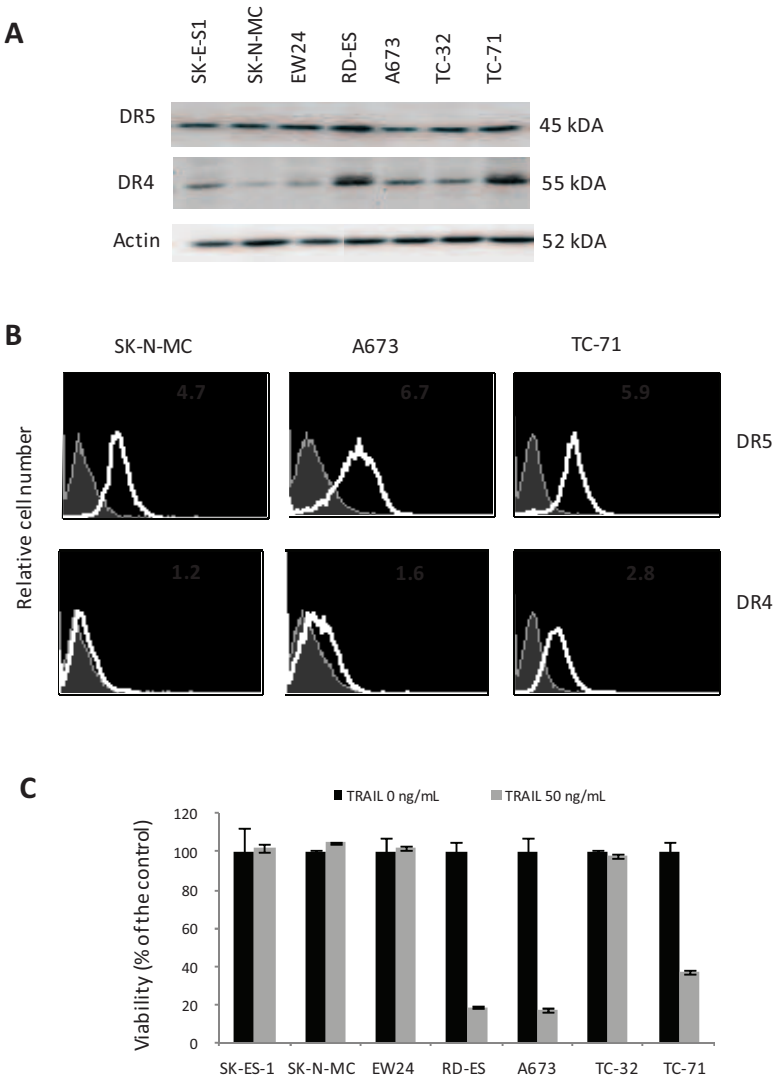

A
SK-E-S1
SK-N-MC
EW24
RD-ES
A673
TC-32
TC-71
DR5
45 kDA
DR4
55 kDA
Actin
52 kDA
B
SK-N-MC
A673
TC-71
4.7
6.7
5.9
DR5
Relative cell number
1.2
1.6
2.8
DR4
C
TRAIL 0 ng/mL
TRAIL 50 ng/mL
Viability (% of the control)
120
100
80
60
40
20
0
SK-ES-1
SK-N-MC
EW24
RD-ES
A673
TC-32
TC-71

Figure 2

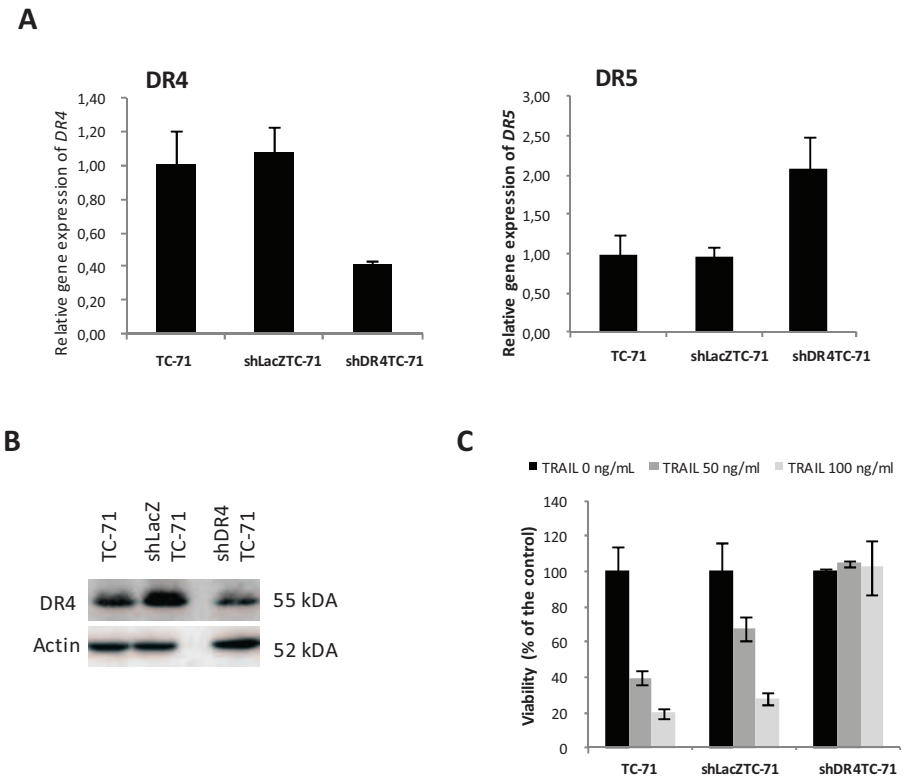

A
DR4
Relative gene expression of DR4
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
TC-71
shLacZTC-71
shDR4TC-71
DR5
Relative gene expression of DR5
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
TC-71
shLacZTC-71
shDR4TC-71
B
TC-71
shLacZ TC-71
shDR4 TC-71
DR4
55 kDA
Actin
52 kDA
C
TRAIL 0 ng/mL
TRAIL 50 ng/ml
TRAIL 100 ng/ml
Viability (% of the control)
140
120
100
80
60
40
20
0
TC-71
shLacZTC-71
shDR4TC-71

Figure 3

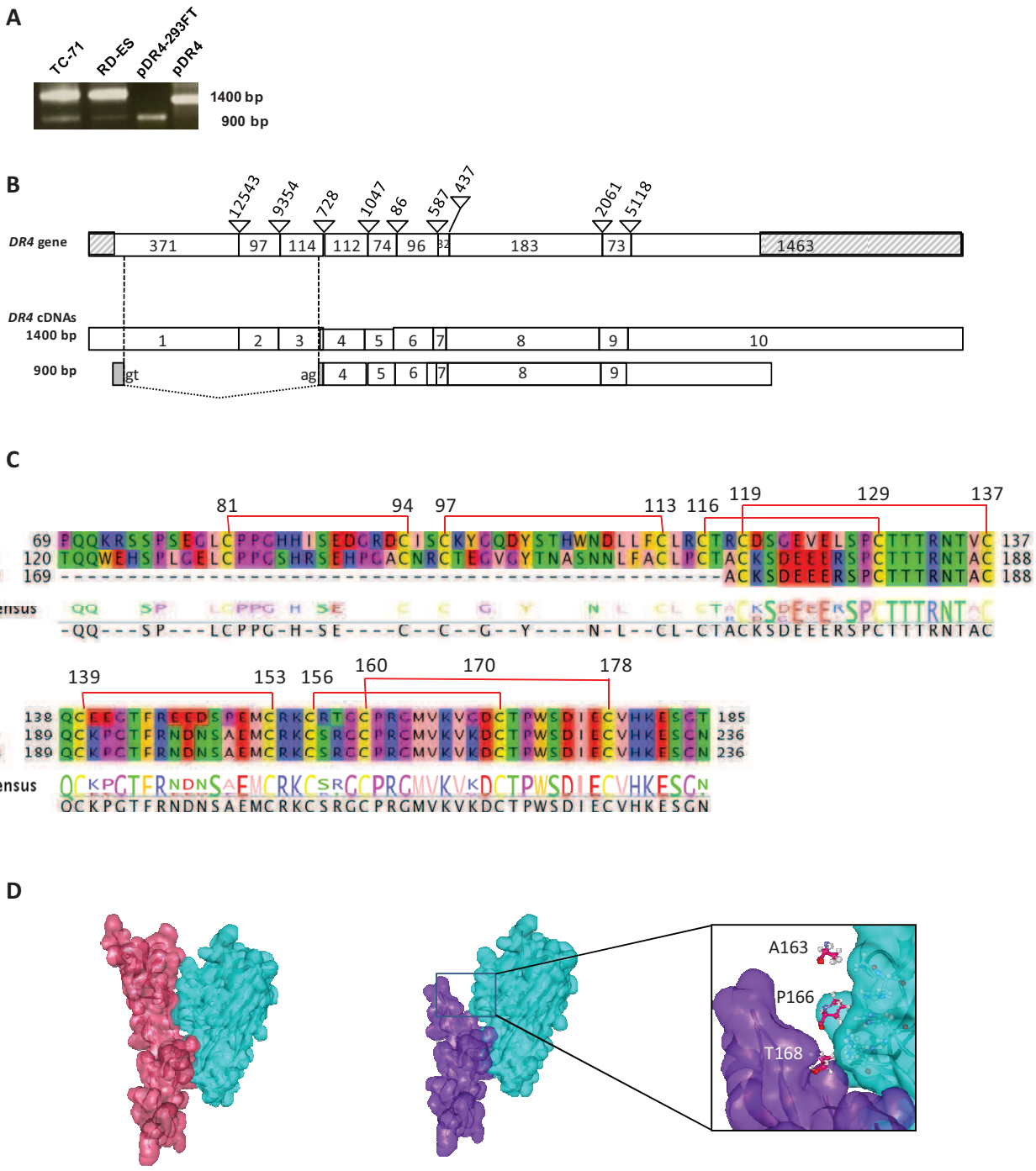

A
TC-71
RD-ES
pDR4-293FT
pDR4
1400 bp
900 bp
B
12543
9354
728
1047
86
587
437
2061
5118
DR4 gene
371
97
114
112
74
96
183
73
1463
DR4 cDNAs
1400 bp
900 bp
gt
ag
C
81
94
97
113
116
119
129
137
DR5
aDR4
bDR4
Consensus
139
153
156
160
170
178
D
A163
P166
T168

Figure 4

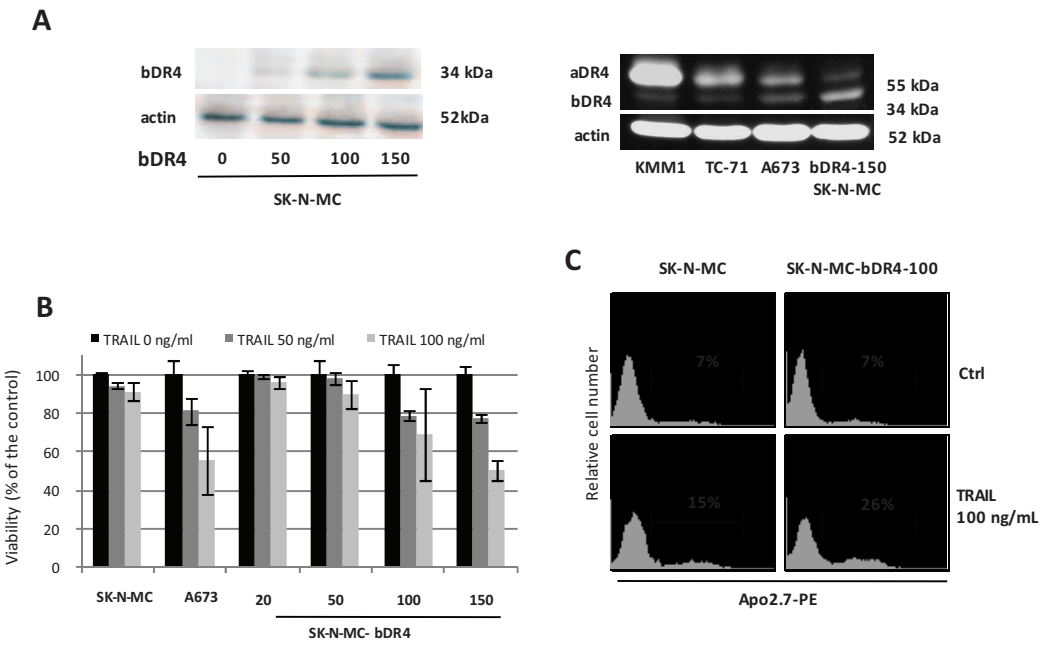

A
bDR4
34 kDa
actin
52kDa
bDR4 0 50 100 150
SK-N-MC
aDR4
bDR4
actin
55 kDa
34 kDa
52 kDa
KMM1 TC-71 A673 bDR4-150
SK-N-MC
B
TRAIL 0 ng/ml
TRAIL 50 ng/ml
TRAIL 100 ng/ml
Viability (% of the control)
100
80
60
40
20
0
SK-N-MC
A673
20
50
100
150
SK-N-MC- bDR4
C
SK-N-MC
SK-N-MC-bDR4-100
Relative cell number
7%
7%
15%
26%
Ctrl
TRAIL
100 ng/mL
Apo2.7-PE

Figure 5

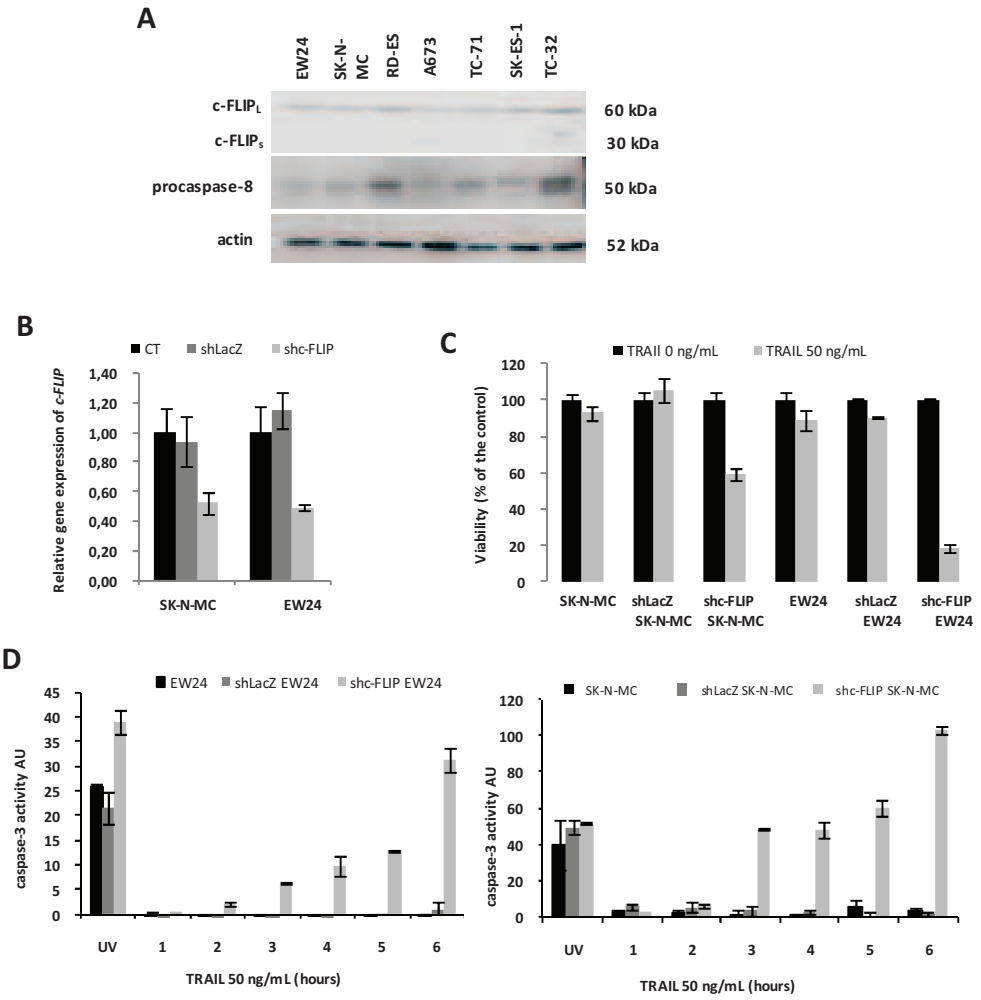
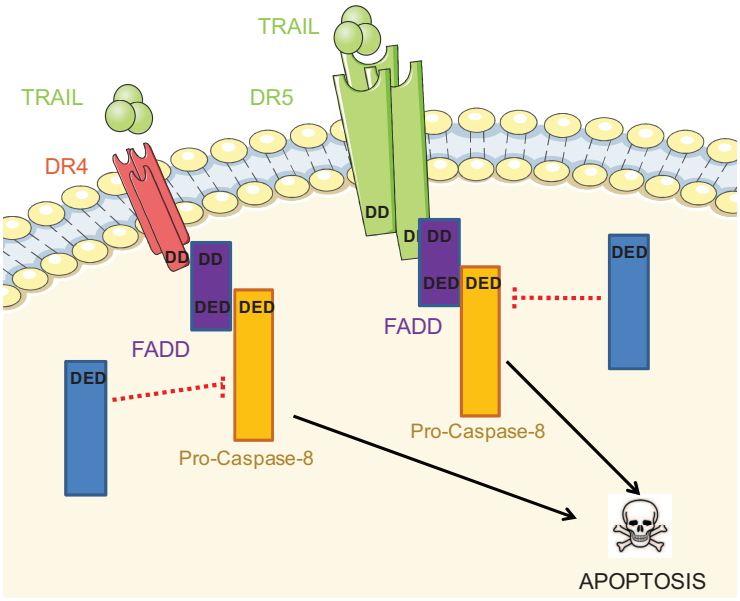
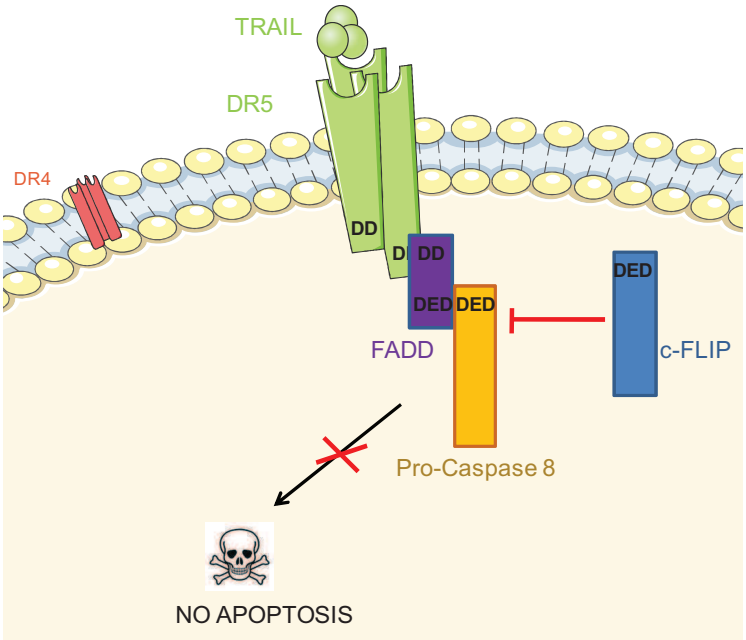

A
EW24
SK-N-MC
RD-ES
A673
TC-71
SK-ES-1
TC-32
c-FLIPL
c-FLIPs
procaspase-8
actin
60 kDa
30 kDa
50 kDa
52 kDa
B
CT
shLacZ
shc-FLIP
Relative gene expression of c-FLIP
SK-N-MC
EW24
C
TRAIl 0 ng/mL
TRAIL 50 ng/mL
Viability (% of the control)
SK-N-MC
shLacZ SK-N-MC
shc-FLIP SK-N-MC
EW24
shLacZ EW24
shc-FLIP EW24
D
EW24
shLacZ EW24
shc-FLIP EW24
caspase-3 activity AU
UV
TRAIL 50 ng/mL (hours)
SK-N-MC
shLacZ SK-N-MC
shc-FLIP SK-N-MC
caspase-3 activity AU
UV
TRAIL 50 ng/mL (hours)

Figure 6



Sensitive cell lines



Resistant cell lines

III. Complément de la discussion de l'article 2

Après avoir démontré l'intérêt thérapeutique de l'utilisation de TRAIL dans des modèles précliniques de sarcome d'Ewing induits à partir des lignées sensibles A673 et TC-71, nous avons choisi de nous intéresser aux mécanismes de la résistance à TRAIL. Ainsi, sur les 7 lignées étudiées, 4 se sont montrées résistantes. Cette résistance observée dans plus de 50% des lignées démontre l'intérêt de l'étude de ces phénomènes pour une application clinique ultérieure de TRAIL ou des agonistes de ses récepteurs de mort. D'après la bibliographie, de nombreux points de régulation existent dans la voie de signalisation de TRAIL. Ainsi, des phénomènes de résistance peuvent être induits au niveau de l'expression ou de l'activité des récepteurs de TRAIL, au niveau de la formation du complexe DISC ou encore grâce à des protéines inhibitrices de l'apoptose telles que les IAPs [229]. Notre étude des mécanismes de la résistance à TRAIL dans le sarcome d'Ewing s'est portée sur deux niveaux potentiellement impliqués dans ces phénomènes : La balance entre l'expression des récepteurs activateurs et leurres et l'inhibition de l'apoptose induite par c-FLIP au niveau du complexe DISC (Figure 33).

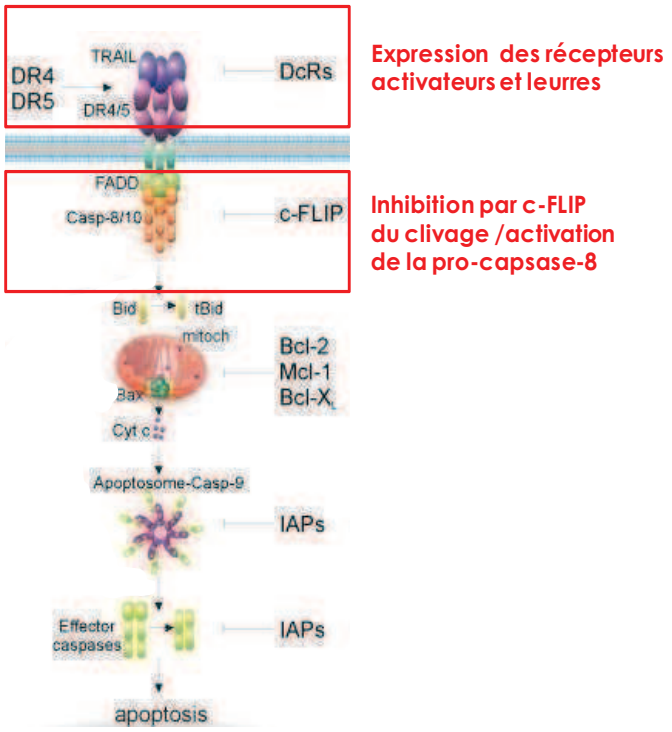


Figure 33 : Les différents points de régulation de la sensibilité à TRAIL dans sa voie de signalisation. Nous avons choisi de nous intéresser à la balance entre l'expression des récepteurs activateurs et des récepteurs leurres ainsi qu'à l'inhibition de la pro-caspase-8 par c-FLIP [Adapté de Mahalingam *et al.*, [198]].

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au premier niveau de régulation de la sensibilité à TRAIL, à savoir l'expression des récepteurs de morts (DR4 et DR5) et des récepteurs leurres (DcR1 et DcR2). Ainsi, l'expression de ces récepteurs a été étudiée aussi bien au niveau transcriptionnel (par PCR quantitative en temps réel) (Figure 34) qu'au niveau protéique (par Western Blot et cytométrie en Flux).

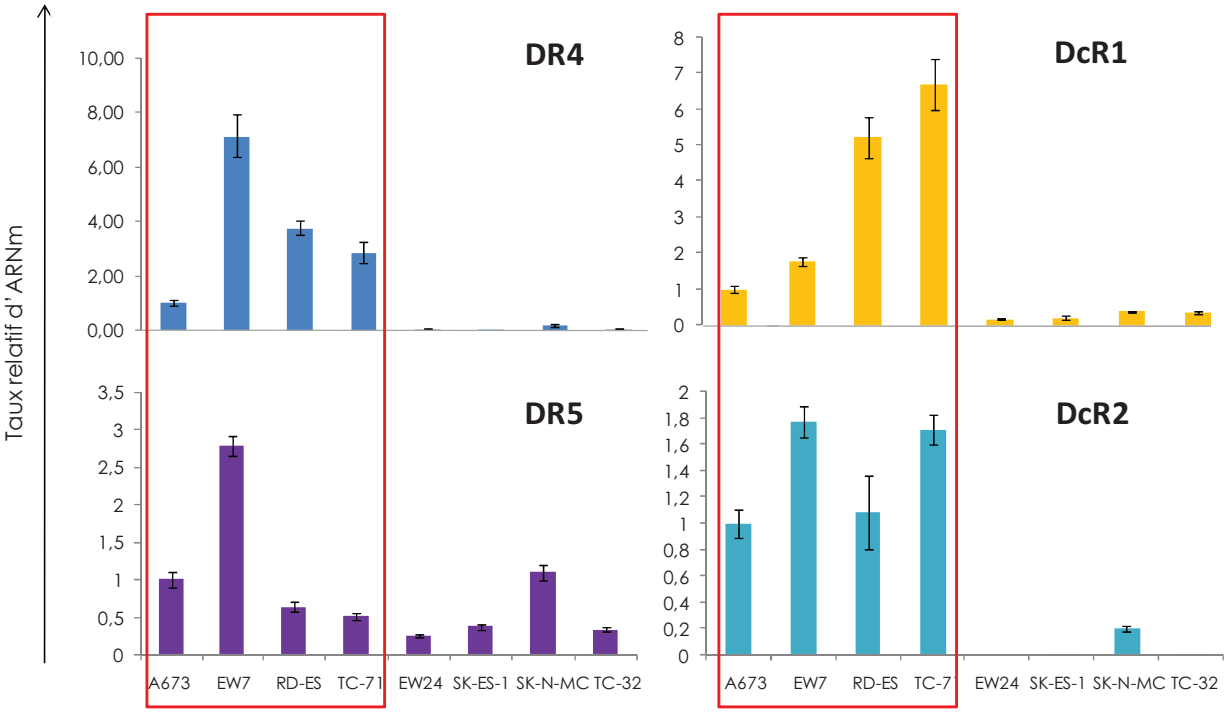


Figure 34 : Expression relative de l'ARNm des récepteurs de TRAIL DR4, DR5, DcR1 et DcR2. Cette expression a été déterminée par RT-PCR-quantitative en temps réel et rapportée aux gènes de référence HPRT et CyclineD1 dans les lignées sensibles (A673, EW7, RD-ES et TC-71) et dans les lignées résistantes (EW-24, SK-ES-1, SK-N-MC et TC-32).

Aucune corrélation n'a pu être observée entre l'expression des récepteurs DR5, DcR1 et DcR2 et la sensibilité des lignées cellulaires à TRAIL. Cependant, il semble qu'une quantité plus importante de transcrits de DcR1 et DcR2 soit présente dans les lignées sensibles que dans les lignées résistantes. Concernant DR4, une quantité plus importante de transcrit a été retrouvée dans les lignées sensibles comparativement aux résistantes. Peu d'équipes se sont intéressées à la résistance à TRAIL dans le sarcome d'Ewing et leurs résultats diffèrent des nôtres par certains points. Ainsi, selon l'équipe de Mitsiades, aucune corrélation n'a été retrouvée entre la sensibilité à TRAIL et l'expression de DR4, ni même des récepteurs leurres ou de c-FLIP [189]. Cependant, ils ont rapporté que la sensibilité à TRAIL serait liée à l'expression de DR5 et non pas de DR4, contrairement à nos observations.

Pour valider notre hypothèse sur l'implication de DR4 dans la sensibilité à TRAIL, nous avons inhibé l'expression du gène codant DR4 grâce à une stratégie shRNA dans la lignée sensible TC-71. *In vitro*, cette lignée est devenue résistante, confirmant ainsi le rôle de DR4 dans l'induction de l'apoptose en réponse au traitement par TRAIL. Pour confirmer ces résultats, nous avons ensuite voulu surexprimer stablement DR4 dans des lignées résistantes. Pour cela, nous avons souhaité cloner le gène dans un plasmide de type lentiviral. Lors de ce clonage un nouveau transcrit alternatif de DR4 a été mis en évidence. Un séquençage et une étude *in silico* nous ont permis de déterminer que le fragment de 900 paires de bases observé correspond à un transcrit non référencé de DR4, résultat d'un épissage alternatif du gène. Ainsi, ce transcrit alternatif donne naissance à une protéine tronquée que nous avons nommée bDR4 et à laquelle manque une partie du peptide signal, le premier domaine riche en cystéine et une partie du second (Figure 35). En revanche la partie intracellulaire de bDR4 est identique à celle de aDR4 (forme complète du récepteur), ce qui laisse penser qu'il serait capable de recruter FADD sur ses domaines de mort (DD), étape nécessaire à la formation du complexe DISC et à la transduction du signal de mort en réponse à TRAIL.

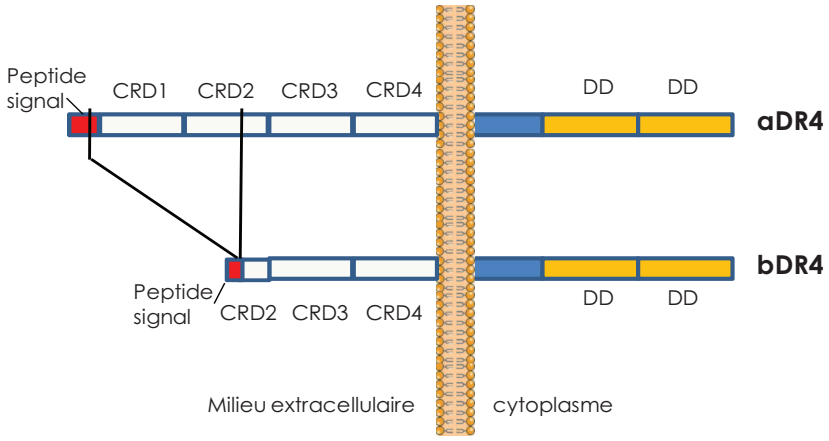


Figure 35 : Comparaison des structures de a et bDR4. Une partie du peptide signal, le premier domaine riche en cystéine [Cystéine rich domain 1 (CRD1)] et une partie du second (CRD2) sont absents du domaine extracellulaire de bDR4 comparativement à aDR4. (DD : Death Domain).

Plusieurs questions se sont posées quant aux fonctions du récepteur bDR4. La première question concerne son adressage à la membrane, une partie du peptide signal étant tronquée. La seconde concerne sa capacité à se trimériser. En effet, une partie du domaine extracellulaire comportant un motif N nécessaire à la trimerisation est tronquée [230]. Enfin, la dernière interrogation concerne sa capacité à lier TRAIL, le 1er domaine riche en cystéine impliqué dans cette liaison étant manquant.

Tout d'abord, la modélisation moléculaire de la protéine nous a permis de constater que seul trois acides aminés impliqués dans la liaison à TRAIL seraient manquants dans bDR4 comparativement à aDR4. Ceci suggère une forte probabilité pour que la liaison de bDR4 avec TRAIL puisse être maintenue. Dans un second temps, nous avons cloné l'ADNc codant bDR4 dans un plasmide de type lentiviral et l'avons surexprimé stablement dans la lignée résistante SK-N-MC. En réponse à un traitement par TRAIL, la lignée SK-N-MC transduite par bDR4 est devenu sensible d'une façon dépendante du taux d'expression de bDR4. Ces résultats suggèrent à la fois que bDR4 est adressé à la membrane, que la liaison avec TRAIL est maintenue et que ce récepteur est capable de se trimeriser et de transmettre le signal de mort induit par TRAIL. Cette trimerisation du récepteur pourrait correspondre à une homo-trimérisation de bDR4 ou une hétéro-trimerisation de aDR4 et bDR4, les mécanismes de la triméristation n'étant pas complètement élucidés.

Nous pouvons donc affirmer que bDR4 est fonctionnel et que sa surexpression est capable d'induire la sensibilisation à TRAIL d'une lignée initialement résistante. Cependant, nous ne sommes pas en mesure de décrire son implication dans les mécanismes de sensibilité à TRAIL, aucune corrélation n'ayant pu être établie entre le rapport aDR4/bDR4 et la sensibilité. D'autres études devront être menées pour approfondir la compréhension du rôle de bDR4 et de son implication dans la sensibilité des lignées cellulaires de sarcome d'Ewing. Dans notre étude, nous avons montré qu'un shRNA capable d'inhiber l'expression des deux formes de DR4 pouvait induire une résistance dans la lignée sensible TC-71. Il serait intéressant d'étudier les taux d'expression spécifiques de chacune des 2 formes dans les lignées sensibles puis leur implication respective par une inhibition spécifique de l'une ou l'autre forme grâce à des shRNA. Par ailleurs, des études devront être menées pour comparer les effets de la surexpression de chacune des deux formes sur différentes lignées résistantes de sarcome d'Ewing. Une comparaison de l'affinité des deux formes de DR4 pour TRAIL pourra aussi être réalisée et nous apporter des informations sur la fonction de cet épissage alternatif.

Grace à un Western Blot de haute résolution, nous avons pu observer l'expression de bDR4 dans plusieurs lignées de sarcome d'Ewing sensibles à TRAIL mais aussi dans la lignée de myélome multiple KMM1. Dans ces lignées, nous n'avons pas observé de corrélation entre l'expression de aDR4 et de bDR4. Cette observation laisse penser que l'épissage alternatif donnant naissance à bDR4 n'est pas aberrant ou dépendant de la quantité initiale de transcrit DR4 mais résulterait plus d'une régulation spécifique au sein des différentes lignées cellulaires. Par ailleurs, l'existence de cet épissage alternatif ayant été observée à l'origine dans les cellules HEK 2.93 puis par la suite dans la lignée de myélome multiple KMM1, cet isoforme n'est pas spécifique du sarcome d'Ewing. Il serait

donc intéressant d'étudier l'expression de bDR4 dans d'autres types de lignées tumorales, telles que des lignées d'ostéosarcome ou de chondrosarcome.

Par ailleurs, malgré l'absence de corrélation entre l'expression de DR5 et la sensibilité à TRAIL dans nos lignées de sarcome d'Ewing, son implication ou absence d'implication devra être confirmée. Dans ce but, l'expression de DR5 pourra être inhibée dans des lignées sensibles grâce à une stratégie shRNA. Cette stratégie nous permettra de déterminer si la perte de sensibilité de la lignée TC-71, observée en réponse à l'inhibition de l'expression de DR4 est bien due à ce dernier ou à une diminution de la quantité relative de récepteurs de mort présente à la membrane. Des études complémentaires réalisées avec des anticorps agonistes de DR4 ou de DR5 sur les lignées sensibles TC-71 et A673 nous ont en effet montré que les deux récepteurs de mort sont fonctionnels et capables d'induire l'apoptose des cellules tumorales (Figure 36).

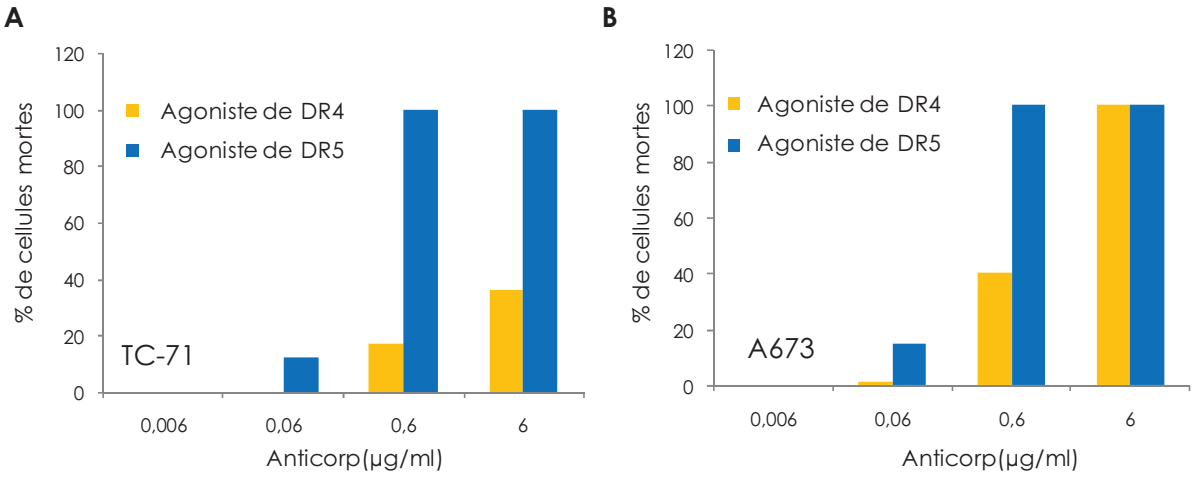


Figure 36 : Induction de l'apoptose par les anticorps agonistes de DR4 et DR5. Après 48h de traitements avec des concentrations de 0,6 à 6 µg/ml d'anticorps agoniste de DR4 d'une part et de DR5 d'autre part, l'apoptose induite sur les lignées sensibles TC-71 (A) et A673 (B) a été analysée par cytométrie en Flux à l'aide du marqueur Apo2.7.

Ainsi, le niveau d'expression des récepteurs de mort à la membrane semble être un point critique de la sensibilité à TRAIL dans le sarcome d'Ewing, même si la part réelle de DR5 par rapport à DR4 reste à déterminer. D'après la littérature, des agents tels que l'indirubin ou le LY303511 (inhibiteur de la PI3 kinase) ou encore de nombreux agents de chimiothérapie tels que la doxorubicine, l'etoposide ou le topecan sont capables de sensibiliser des lignées tumorales à l'apoptose induite par TRAIL *in vitro* en induisant une surexpression de DR4 et/ou de DR5 [231][232][233][234]. Ces observations laissent penser que, malgré une résistance à TRAIL dépendante de l'expression des récepteurs de mort *in vitro*, l'utilisation de TRAIL ou des agonistes de ses récepteurs en cliniques reste possible,

et peut aboutir à un effet anti-tumoral en association avec des agents de chimiothérapie conventionnels.

Dans un dernier temps, nous avons étudié un autre niveau de régulation de la sensibilité à TRAIL, à savoir la balance entre l'expression de la pro-caspase-8 et de c-FLIP (analogue compétiteur de la pro-caspase-8). En accord avec la littérature, dans les lignées cellulaires étudiées, aucune corrélation n'a pu être montrée entre leur expression et la sensibilité à TRAIL que ce soit au niveau transcrit ou protéique [191]. Cependant, toujours selon la bibliographie, l'inhibition de l'expression de c-FLIP par des techniques d'ARN interférence est capable de restaurer une sensibilité dans des lignées tumorales résistantes à TRAIL [218][220][221]. Pour transposer ces observations au sarcome d'Ewing, nous avons inhibé stablement l'expression de tous les isoformes de c-FLIP dans les lignées résistantes SK-N-MC et EW24 grâce à une stratégie shRNA. Une sensibilisation à l'apoptose induite par TRAIL avec une levée de l'inhibition de la caspase-8 au niveau du complexe DISC a été observée, comparativement aux lignées transduites par le shRNA contrôle ciblant la β-Galactosidase. c-FLIP semble donc avoir une implication dans la résistance à TRAIL observée dans les lignées cellulaires d'Ewing. Une étude a montré qu'un agent pharmacologique, le BAY 11-7085 est capable d'inhiber l'expression de c-$FLIP_L$ (isoforme de c-FLIP le plus exprimé dans nos lignées de sarcome d'Ewing d'après nos analyse par western Blot) et permet d'obtenir un effet anti-tumoral et anti-métastatique significatif dans un modèle préclinique de carcinome péritonéal [235]. De même, le Rocaglamide est un agent capable d'inhiber l'expression de c-FLIP et de lever la résistance à TRAIL dans des lignées de leucémie ou de lymphome [236]. Des agents de chimiothérapie sont également capables d'inhiber l'expression de c-FLIP, que ce soit au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel. C'est le cas en particulier du cisplatine qui induit une ubiquitylation de c-FLIP dépendante de p53 et aboutissant à sa dégradation dans des lignées mélanome [237]. D'autres agents de chimiothérapie comme la cyclohexamide, l'anisomycin, l'actinomycin et le D fluorouracil sont eux capables d'induire une inhibition de c-$FLIP_L$ et $_S$ dans différentes lignées de cancer [222]. Enfin, des inhibiteurs des Histone Désacétylase et de la topoisomérase sont aussi capables d'induire une inhibition de l'expression transcriptionnelle et protéique c-$FLIP_L$ dans le cancer de l'ovaire [238]. Transposés au sarcome d'Ewing et à nos observations sur l'implication de c-FLIP dans la résistance à TRAIL, l'utilisation de ce type d'agents pharmacologiques pourrait être envisagée comme adjuvante à des traitements par TRAIL ou par les agonistes de ses récepteurs de mort. Une levée de la résistance pourrait ainsi être observée et permettrait une utilisation de TRAIL pour toutes les tumeurs d'Ewing, sensibles à TRAIL ou non.

La sensibilisation de lignées initialement résistantes, obtenue par l'inhibition de c-FLIP, nous permet de penser que les mécanismes de résistance à TRAIL dans nos lignées de sarcome d'Ewing pourraient être dépendants d'une régulation de l'apoptose au niveau du complexe DISC. Notre hypothèse est donc que dans les lignées résistantes, la quantité de c-FLIP disponible est suffisante pour contrecarrer le signal apoptotique induit par TRAIL et qu'en réduisant son expression, cette inhibition peut être levée. Des études complémentaires réalisées avec des anticorps agonistes de DR4 ou de DR5 sur les lignées sensibles TC-71 et A673 nous ont montré que ces deux récepteurs de mort sont fonctionnels dans ces lignées et capables d'induire l'apoptose des cellules sous l'action de TRAIL.

Nous avons montré que l'inhibition de c-FLIP n'induit pas de modification significative de l'expression transcriptionnelle des récepteurs de mort et par ailleurs que l'inhibition de c-FLIP dans 2 lignées résistantes induit une sensibilisation. Ces résultats nous conduisent à penser que le récepteur DR5 est fonctionnel dans les lignées résistantes, DR4 n'étant pas ou très peu exprimé. Pour confirmer cette implication de DR5, il serait intéressant de tester les effets des agonistes de DR4 et DR5 dans les lignées où l'expression de c-FLIP a été inhibée.

En conclusion, TRAIL semble être un candidat prometteur pour des études cliniques dans le sarcome d'Ewing mais la compréhension des phénomènes de résistance reste primordiale. Ces phénomènes semblent être spécifiques de chaque type de cancer et dans le sarcome d'Ewing, nous avons pu mettre en évidence une implication de l'expression du récepteurs DR4 à la membrane ainsi que de l'inhibition de la signalisation par c-FLIP au niveau du complexe DISC. Cependant, ces résultats devront être confirmés dans des études précliniques car la sensibilité à TRAIL observée *in vitro* ne reflète pas systématiquement ce qui peut être observé *in vivo*. En effet, Des phénomènes tels que l'hypoxie peuvent induire des modifications dans la sensibilité à TRAIL de lignées tumorales *in vivo* [239][240].

PARTIE III :

Etude de l'efficacité thérapeutique de l'inhibition de la résorption osseuse dans le sarcome d'Ewing

I. Introduction

1) La triade OPG/RANK/RANKL et voies thérapeutiques associées

Au sein du microenvironnement osseux, le processus de remodelage est finement régulé par une triade moléculaire impliquant RANKL, son ligand RANK et son récepteur leurre l'OPG. La découverte de ces trois cytokines a révolutionné la connaissance des mécanismes moléculaires à la base de la régulation du remodelage osseux [241]. Ce système a été depuis bien caractérisé grâce à des modèles animaux qui ont permis de comprendre l'implication de chacun des protagonistes dans le contrôle de la biologie osseuse. La fixation de RANKL sur son récepteur RANK, présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques, est capable d'induire leur différenciation en ostéoclastes mais aussi de jouer un rôle dans leur activation et leur survie. L'OPG se comporte comme un récepteur leurre pour RANKL et inhibe son interaction avec RANK, agissant ainsi comme une cytokine anti-résorptive (Figure 37).

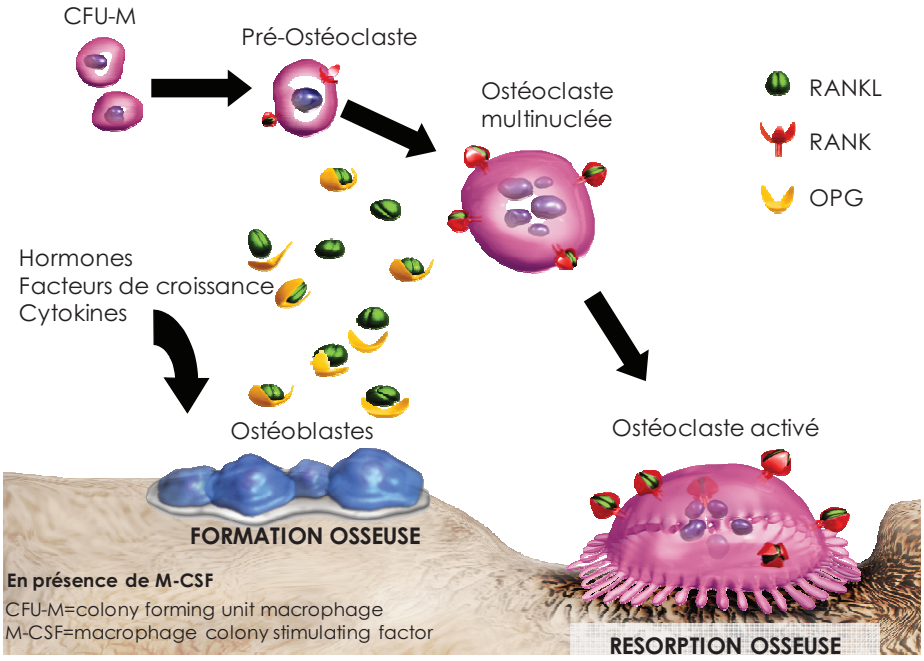


Figure 37 : Rôle de la triade OPG / RANK / RANKL dans la différenciation ostéoclastique. [D'après Amgen, adaptée de Boyle *et al.*, [242]]

a) RANKL

● **Structure et expression de RANKL**

RANKL (OPG ligand OPGL / osteoclast differenciation factor (ODF) / TRANCE) a été découvert simultanément par deux équipes au cours de travaux portant sur les régulateurs de l'apoptose [243][244]. RANKL est un membre de la superfamille du TNF dont la nomenclature officielle est TNFSF11 (11ème membre de la superfamille du TNF). Cette cytokine est une protéine transmembranaire de type II sans peptide signal, montrant une homologie d'environ 30% avec TRAIL et CD40 et d'environ 20% avec Fas-Ligand [245][246]. RANKL existe sous 3 isoformes chez l'Homme (RANKL 1, RANKL 2 et RANKL 3) et chez la souris (Rankl 1, Rankl 2 et Rankl 3), résultant de l'épissage alternatif du même gène [247][248](Figure 38).

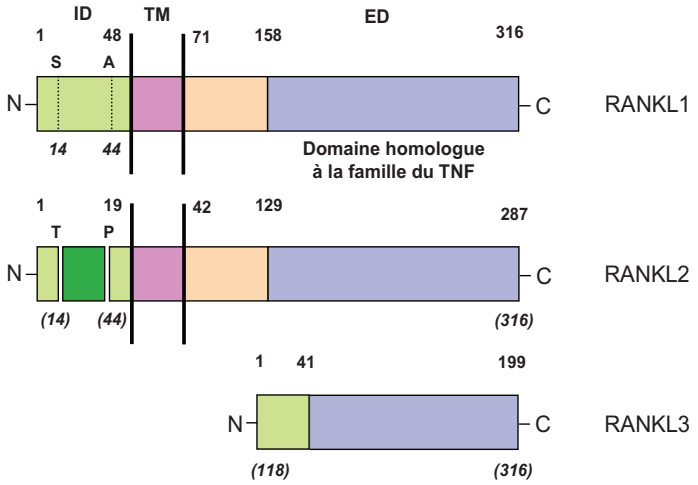


Figure 38 : Structure des isoformes de RANKL chez l'Homme. [Adapté de Theoleyre *et al.*, [249]]

Les différences entre ces isoformes se situent au niveau des domaines intracytoplasmiques et transmembranaires. Le domaine C-terminal extracellulaire est toujours homologue au TNF et permet l'activation de RANK. L'isoforme 1 est une protéine membranaire de 317 acides aminés chez l'Homme et 316 chez la souris, possédant un domaine intra-cytoplasmique complet qui lui permet d'interagir avec des protéines intracellulaires. L'isoforme 2 a une structure différente suivant l'espèce considérée : Rankl 2 (souris, 287 acides aminés) possède un court domaine intra-cytoplasmique alors que RANKL 2 (humain, 244 acides aminés) en est dépourvu. Enfin, l'isoforme 3, est une protéine soluble monomérique de 199 acides aminés chez la souris et 244 chez l'Homme, intra-cytoplasmique, non sécrétée et délétée dans sa partie N-terminale pour les acides aminés correspondant aux domaines intra-cytoplasmique et transmembranaire. Dans le milieu extracellulaire, RANKL peut également être retrouvé sous forme soluble après

clivage de la partie extracellulaire [250] par des protéases telles que TNF alpha converting enzyme (TACE) [251][252], Membrane-Type 1 Matrix Metalloprotéinase (MT1-MMP)[253] ou MMP-7 [254].

RANKL a tout d'abord été considéré comme exprimé par les lymphocytes T activés mais s'est avéré ensuite être sécrété par les ostéoblastes, avec un rôle crucial sur le développement des ostéoclastes et sur le stroma osseux. Il est aussi exprimé par un grand nombre de cellules et de tissus et est fortement présent au niveau du squelette (os, moelle osseuse, cartilage) [244], dans les organes lymphoïdes (ganglions, thymus, rate, foie fœtal) et dans le système vasculaire [255]. RANKL est exprimé dans différentes lignées de cellules stromales (ST2, MC3T3-E1), dans des ostéoblastes murins en culture primaire ainsi que dans les chondrocytes hypertrophiques murins [256]. Les ostéoblastes matures expriment peu RANKL, à l'inverse des cellules stromales qui l'expriment en quantité importante. Il est également exprimé en grande quantité dans les lymphocytes T, les cellules endothéliales et les glandes mammaires [257][258]. Enfin, une expression faible de RANKL a été mise en évidence dans le cerveau, le cœur, les poumons, les reins et le placenta [256]. De nombreux facteurs peuvent réguler l'expression de RANKL, soit en la stimulant (vitamine D3, IL-1, IL-6, IL-11, TNFα, OSM, PTH et les prostaglandines E2), soit en l'inhibant (TGFβ et l'IL-13) [245][259][260] [261].

● **<u>Implication de RANKL dans la biologie osseuse</u>**

Le principal rôle de RANKL dans la différenciation, l'activation et la survie des ostéoclastes a été montré grâce à des animaux transgéniques. Ainsi, une ostéopétrose sévère et une absence totale d'ostéoclastes ont été observées chez des souris dont le gène codant RANKL avait été invalidé. En conséquence, une augmentation de la densité minérale osseuse avec comblement de la cavité médullaire induisant une hématopoïèse extramédullaire compensatoire a été mise en évidence chez ces animaux [108][262](Figure 39). A l'inverse, les souris naïves traitées par du RANKL exogène ou transgénique pour la cytokine présentent une perte osseuse et une hypercalcémie proche d'une ostéoporose chez l'Homme [245][262][263](Figure 39). *In vitro*, la fixation de RANKL sur son récepteur RANK, présent à la surface des pré-ostéoclastes [264] est capable, en présence de M-CSF, d'induire leur différenciation en ostéoclastes matures [244]. RANKL est en outre un facteur de survie pour les ostéoclastes matures [265][266]. Ces observations soulignent le rôle important de cette cytokine dans la biologie osseuse et dans la balance entre résorption osseuse et aposition.

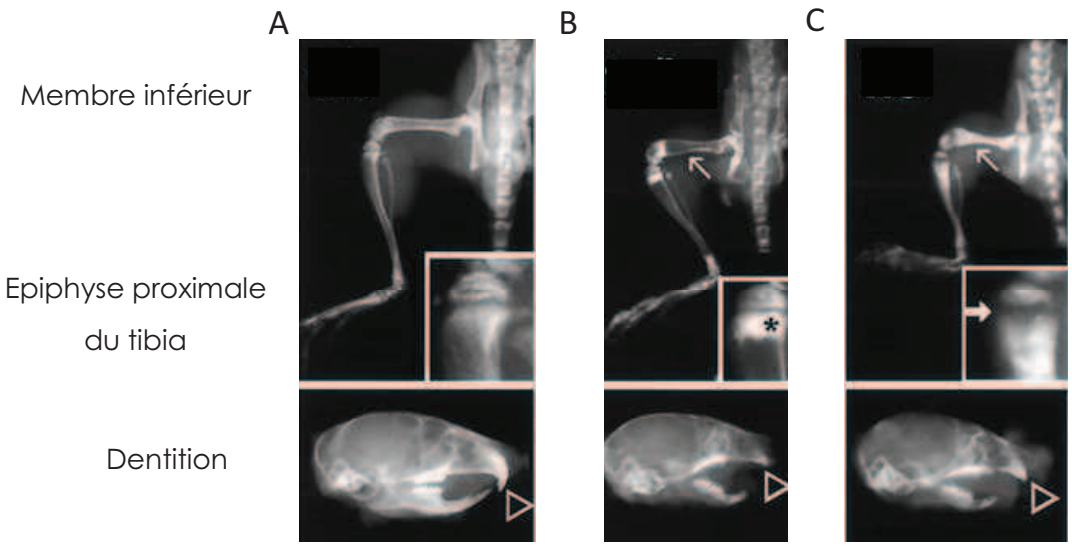


Figure 39 : Données radiographiques de souris sauvages (A), surexprimant la cytokine pro-résorptive RankI (B) ou inactivées pour le gène *RankI* (C). [Adapté de Kim *et al.*, [262]]

● **Autres fonction de RANKL**

Outre son rôle majeur dans la biologie osseuse, l'implication de RANKL dans d'autres processus a déjà été démontrée. Ainsi, les souris transgéniques invalidées pour RANKL présentent également un défaut de développement des glandes mammaires engendrant la mort des nouveau-nés, ce processus pouvant être contrebalancé par l'injection de RANKL exogène [263]. Ceci démontre une fonction essentielle dans le processus de lactation.

RANKL joue aussi un rôle important dans les fonctions immunitaires. Il semble être très fortement impliqué dans la régulation de l'organogenèse des organes lymphoïdes et dans la maturation des cellules du thymus [108]. Le rôle de RANKL dans le système immunitaire peut être étendu aux cellules dendritiques (il est capable de stimuler leur activation et leur survie) et aux monocytes (il agirait comme un facteur chimiotactique) [257][267].

Dans un contexte tumoral, de nombreux types de cellules tumorales sont capables de produire RANKL, c'est le cas entre autres de lignées de myélome multiple, de carcinome de la prostate et de neuroblastome [268][269][270]. De plus, certaines chémokines, cytokines, hormones et facteurs de croissance produits par les tumeurs sont capables de stimuler la production de RANKL indirectement via PTH-rP. Cette augmentation de l'expression de RANKL, grâce à ces facteurs, peut aussi s'accompagner d'une diminution de l'expression de l'OPG et donc d'un emballement

du cercle vicieux dans le contexte des tumeurs osseuses. Par ailleurs, concernant le sarcome d'Ewing, peu d'études se sont intéressées à l'implication de RANKL dans cette pathologie. Cependant, quelques travaux ont montré que des lignées cellulaires de sarcome d'Ewing ont un faible niveau d'expression de RANKL [271]. Enfin, certaines cellules cancéreuses expriment une forme fonctionnelle du récepteur RANK donnant à RANKL une implication pro-tumorale [272][273][274]. RANKL intervient également dans les processus métastatiques des cancers du sein, de la prostate et du rein [275][276][277][278]. Il facilite la migration de cellules cancéreuses à l'origine de leur dissémination dans l'organisme [274].

b) RANK

RANK (TNFRSF11A), le récepteur de RANKL, est un membre de la superfamille des récepteurs au TNF de 616 acides aminés. Protéine transmembranaire de type I, elle possède environ 40% d'homologies avec le CD40 [257]. Possédant un peptide signal, RANK est un récepteur membranaire qui se présente sous forme trimérique. Son domaine extracellulaire est composé de 4 domaines riches en cystéines et 2 sites de N-glycosylation [245](Figure 40).

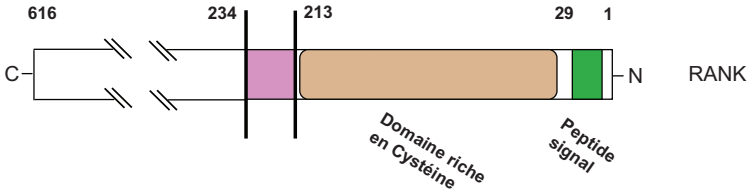


Figure 40 : Structure de RANK. [Adapté de Theoleyre *et al*.,[249]]

Au niveau osseux, RANK est présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques et des ostéoclastes matures. Il est également exprimé par les lymphocytes T et les cellules dendritiques. L'expression de RANK a été détectée dans différents tissus comme le muscle squelettique, la peau, le cerveau, les poumons et le foie [257][279][280]. Il a aussi été mis en évidence dans de nombreux systèmes cellulaires mais la production de la protéine est restreinte aux ostéoclastes, aux cellules lymphocytaires B et T, aux cellules dendritiques, aux cellules endothéliales et aux fibroblastes.

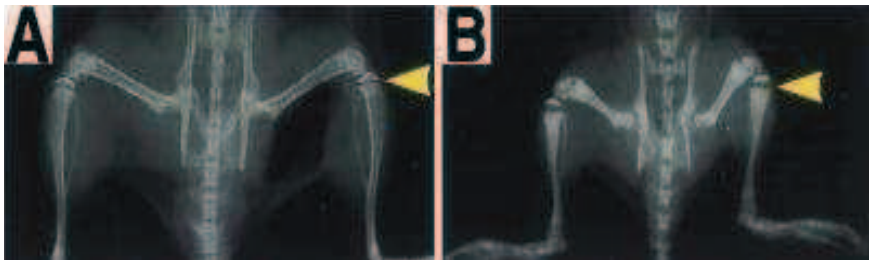


Figure 41 : Clichés radiographiques des membres inférieurs de souris sauvages (A) et invalidées pour le gène Rank. [Adapté de Li *et al.*, [281]]

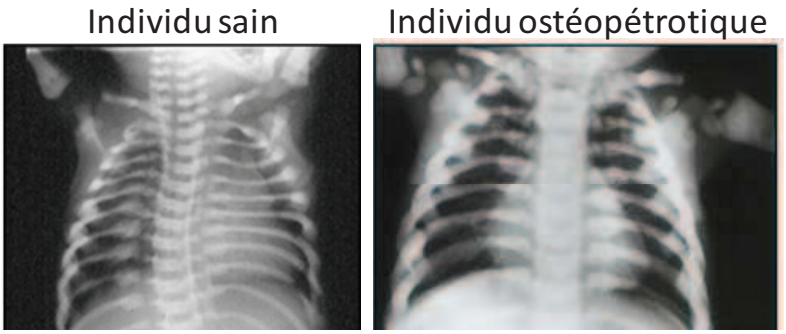


Figure 42 : Clichés radiographiques d'une cage thoracique chez un individu sain et un patient atteint d'ostéopétrose caractérisée par une mutation dans le gène codant le récepteur RANK. [Adapté de Guerrini *et al.*, [282]]

La fixation de RANKL avec une haute affinité (3 nM) sur RANK, présent à la membrane des pré-ostéoclastes, induit l'activation du récepteur, étape indispensable à l'ostéoclastogenèse. Cette activation engendre une cascade de signalisation via TRAF6, incluant l'activation de kinases telles que TAB2, Src, PI3K ou AKT et menant à l'activation d'effecteurs plus tardifs tels que p38, ERK, JNK ou encore NFKB. Cette cascade conduit notamment à la différenciation des précurseurs ostéoclastiques et à l'activation des ostéoclastes.

L'importance de RANK et de son interaction avec RANKL dans la biologie osseuse a aussi été démontrée grâce à des animaux transgéniques. Ainsi, des souris invalidées pour ce gène (RANK-/-) présentent une ostéopétrose sévère associée à un manque d'ostéoclastes matures, phénotypes similaire à celui des souris RANKL-/- [281](Figure 41). Ces souris présentent par ailleurs une absence d'organes lymphoïdes et un défaut de maturation des lympocytes B et T malgré un développement thymique normal.

Un phénotype similaire à celui observé chez les souris RANK-/- est retrouvé dans le cas de l'ostéopétrose chez l'Homme. Cette maladie est caractérisée par une perte de l'activité des ostéoclastes matures au cours de leur différenciation. Cette perte d'activité ostéoclastique est également retrouvée chez des patients présentant une ostéopétrose « génétique », associée à des mutations dans le gène codant RANK [282](Figure 42).

c) L'ostéoprotégérine (OPG)

● **<u>Structure et expression</u>**

L'OPG, initialement appelée Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF), Follicular Dendritic Cell Receptor 1 (FDCR-1), TNF Receptor related molecule 1 (TR-1) ou selon la nomenclature officielle, TNFRSF11B, est un membre de la superfamille des récepteurs au TNF identifié par deux groupes indépendants [241][283]. Sa principale différence avec les autres membres de cette famille repose sur son absence de domaine transmembranaire qui en fait une molécule soluble capable de lier différents ligands. Le gène humain codant l'OPG est localisé sur le chromosome 8q23-24 et contient 5 exons sur un domaine de 29 kb [284].

L'OPG est synthétisée sous la forme d'un pro-peptide de 401 acides aminés dont le peptide signal (21 acides aminés) est clivé, générant ainsi une protéine de 380 acides aminés. L'OPG, ne posséde pas de domaine cytoplasmique ni transmembranaire et est produite exclusivement sous forme d'une protéine soluble.

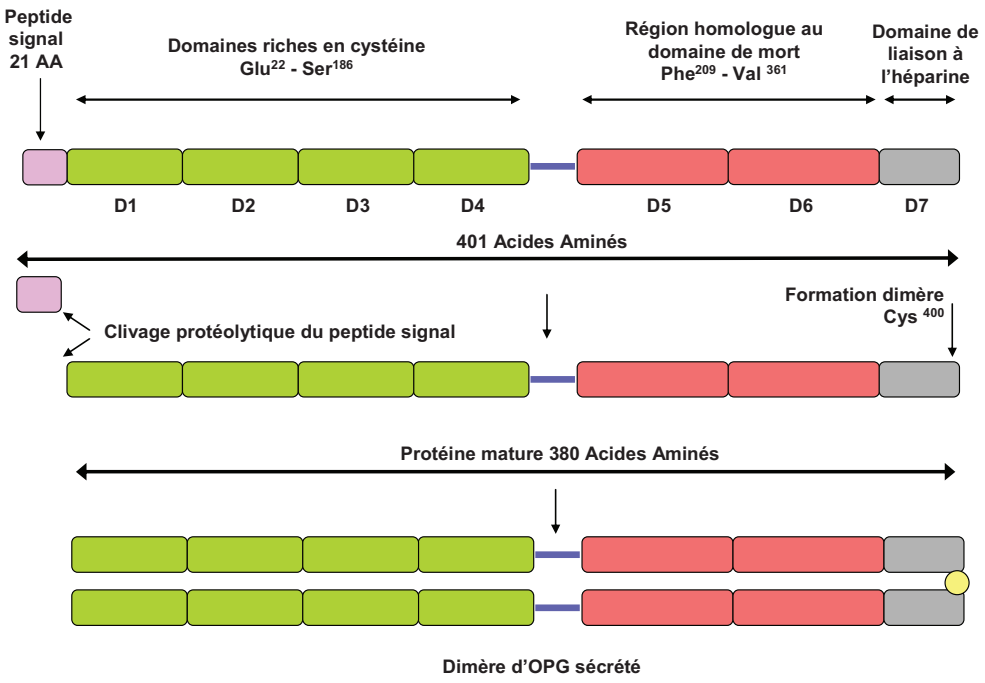


Figure 43 : Structure de l'OPG. [Adapté de Holen *et al.*, [285]]

Sa partie N-terminale possède 4 motifs riches en cystéine (D1-D4) impliqués dans l'inhibition de l'ostéoclastogenèse. Son extrémité C-terminale contient, quant à elle, 2 homologues de « death domain » (D5 et D6), dont la fonction précise est actuellement inconnue mais qui seraient impliqués dans sa dimérisation et dans la stabilité du complexe OPG/RANKL [286]. Par ailleurs, ces deux domaines de morts sont fonctionnels [284]. Toujours au niveau de la partie C-terminale, se trouvent également un domaine de liaison à l'Héparine (D7) et un résidu cystéine (Cys^{400}), nécessaire à son homodimérisation [284](Figure 42). Le domaine de liaison à l'héparine permet à l'OPG d'interagir avec des molécules de la famille de l'héparine et cette capacité à se lier à des structures glucidiques comme les GlycosAminoGlycanes (GAGs) est à l'origine de nombreuses activités complémentaires de l'OPG. De plus, une fois liée à l'héparine ou à d'autres GAGs, l'OPG ne serait plus capable d'interagir avec RANKL [287]. Des études menées chez l'animal ont permis de mettre en évidence que l'activité anti-tumorale de l'OPG dans les ostéosarcomes est modifiées par l'environnement tumoral osseux riches en GAGs et protéoglycanes [288]. Ces données suggèrent donc que l'héparine ainsi que les GAGs contrôlent l'activité de l'OPG.

Un autre ligand de l'OPG a été mis en évidence, il s'agit de TRAIL. La fixation de l'OPG à TRAIL se fait au niveau du domaine 11-194 et induit une inhibition de l'effet pro-apoptotique de cette cytokine qui en retour bloque l'activité anti-ostéoclastique de l'OPG [288][130]. Des études *in vitro* ont montré que des cellules de cancers du sein et de prostate produisent des quantités suffisantes d'OPG pour se protéger de l'effet pro-apoptotique de TRAIL [289][290]. Des résultats similaires ont été obtenus pour des lignées de carcinome du côlon [291] . Ces travaux suggèrent donc un rôle de facteur de survie de l'OPG dans certains cancers. Pourtant, dans des pathologies cancéreuses particulières (ostéosarcomes), l'OPG a montré, *in vivo*, une activité anti-tumorale puissante qui serait en fait provoquée indirectement par l'inhibition de RANKL et donc de la résorption osseuse [45]. L'OPG est synthétisée sous forme de monomère (55-62 kDa) qui se dimérise par des ponts disulfures pour être sécrétée principalement en tant que glycoprotéine homodimérique (110-120 kDa) avec 4 à 5 sites potentiels de N-glycosylation [245](Figure 43).

L'OPG est une protéine ubiquitaire, présente dans le tissu osseux, la peau, le foie, les poumons, le cœur, les reins, le placenta, les glandes mammaires et le cerveau [242][283]. Elle est exprimée de façon prédominante par les cellules stromales de la moelle osseuse, mais son expression par les lymphocytes B et les cellules dendritiques peut également être induite par le CD40 [292]. Enfin, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les monocytes, les ostéoblastes humains en culture primaire, les lignées ostéosarcomateuses telles que MG-63 et $SaOS_2$ ainsi que d'autres cellules tumorales de

carcinomes du sein ou de la prostate, expriment fortement l'OPG [245][289][293]. Un très grand nombre de facteurs peuvent réguler la synthèse et l'expression de l'OPG tels que la vitamine D3, les œstrogènes, le TNFα, le TGFβ et l'IL-1, qui ont un effet stimulateur [294][295]. La PTH et les prostaglandines E2 exercent au contraire un effet inhibiteur sur l'expression de l'OPG [296][297][281]. Les glucocorticoïdes exercent aux aussi un effet inhibiteur et sont de ce fait responsables de l'apparition d'ostéoporose chez les patients traités à long terme [245].

● **Role de l'OPG dans la biologie osseuse**

L'OPG agit comme un récepteur leurre pour RANKL et en inhibant l'interaction RANK/RANK, inhibe la différenciation et l'activation des ostéoclastes et de ce fait la résorption osseuse. Le rôle critique de l'OPG dans la biologie osseuse a été démontré grâce à des animaux transgéniques. Ainsi, des souris surexprimant l'OPG montrent une ostéopétrose sévère accompagnée d'une splénomégalie résultant d'une hématopoïese extramédulaire compensatoire ainsi qu'un défaut de développement thymique. A l'inverse, les souris invalidées pour le gène de l'*OPG* (*OPG* -/-) présentent une ostéoporose et une réduction de la densité minérale osseuse, accompagnée de fractures et d'une déformation de la colonne vertébrale à des âges plus tardifs [298](Figure 44). Ces phénomènes sont réversibles grâce à une injection intraveineuse d'OPG recombinante [280].

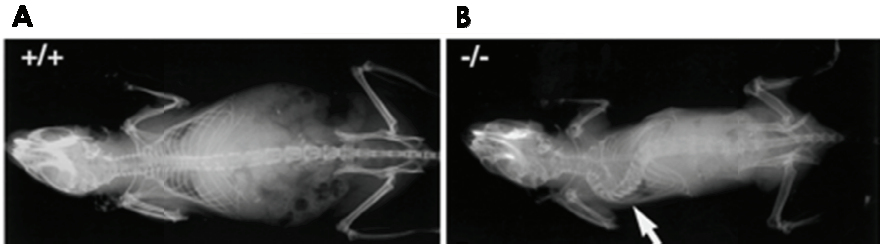


Figure 44 : Clichés radiographiques de souris naïves (A) et OPG -/- (B) âgées de 5 mois. [Adapté de Bucay *et al.*, [298]]

d) Intérêt de l'inhibition de RANKL dans le traitement des tumeurs osseuses

Le ratio entre l'expression de RANKL et celle de l'OPG est critique dans le contrôle de la balance entre résorption osseuse et apposition. Un déséquilibre de ce rapport en faveur de RANKL peut être responsable, chez l'homme, de pathologies ostéolytiques telles que l'ostéoporose ou la perte osseuse induite par la Thalassémie [299][300]. Un

dérèglement de ce rapport en faveur de RANKL est aussi responsable d'ostéolyse sévère dans un contexte tumoral [301]. Ainsi, surexprimer l'OPG pour restaurer cet équilibre RANKL/OPG semble être une approche prometteuse pour limiter l'ostéolyse associée au développement tumoral en site osseux. L'intérêt de l'utilisation de l'OPG sur la prévention des lésions ostéolytiques a déjà été démontré dans des modèles précliniques de métastases osseuses de myélome multiple ainsi que de cancers du sein et de la prostate [268][269][302]. Notre équipe a montré pour la première fois l'intérêt thérapeutique de l'OPG dans le traitement des tumeurs osseuses primitives. Ainsi, dans un modèle préclinique d'ostéosarcome murin, l'OPG, administrée par transfert de gène non viral est capable d'inhiber significativement le développement tumoral et l'ostéolyse associée et d'accroitre la survie des animaux traités par rapport aux souris contrôles non traitées [45]. Par ailleurs, un essai clinique a déjà démontré que l'OPG est bien tolérée et capable de limiter l'ostéoporose associée à la ménopause pendant une période soutenue d'au moins 22 jours après une unique injection d'OPG-Fc [303]. Un autre essai clinique de phase I a testé les effets de l'administration de l'OPG-Fc (AMGN-0007) sur les lésions ostéolytiques associées aux métastases de myélome multiple et de carcinome mammaire. Dans cette étude, une simple injection sous-cutanée d'OPG-Fc s'est montrée aussi efficace sur la prévention des lésions ostéolytiques que le pamidronate, bisphosphonate de seconde génération [304]. Malheureusement, cet essai clinique a du être arrêté en raison de la détection chez une des patientes, d'anticorps dirigés contre l'OPG-Fc, aboutissant à une inhibition à la fois de l'OPG-Fc injecté et de l'OPG endogène. De plus, malgré son efficacité clinique dans la prévention des lésions ostéolytiques, le problème majeur de l'utilisation de l'OPG dans un contexte tumoral est sa capacité à l'inhiber l'activité anti-tumorale de TRAIL. Cette propriété de l'OPG pourrait être responsable d'un effet protumoral par inhibition d'un mécanisme naturel impliqué dans la prévention des cancers [305].

2) Autres cibles thérapeutiques impliquées dans le remodelage osseux

Si la triade OPG/RANK/RANKL semble représenter les effecteurs pivots de la régulation du remodelage osseux et du développement de lésions osseuses associées au développement des tumeurs osseuses primitives, d'autres cytokines sont impliquées dans ce phénomène. C'est le cas du M-CSF qui est essentiel à la différenciation des ostéoclastes en réponse à la fixation de RANKL sur RANK mais aussi du TNF-a qui pourrait être à l'origine d'une voie alternative d'ostéoclastogénèse indépendante de RANKL.

a) M-CSF

Le M-CSF, appelé aussi Colony Stimulating Factor 1 (CSF1) a tout d'abord été identifié pour sa capacité à stimuler la croissance des macrophages [306]. Il joue aussi un rôle essentiel dans la biologie osseuse en stimulant la survie et la prolifération des ostéoclastes [109][307]. *In vitro*, l'association de RANKL et de M-CSF est capable d'induire la différenciation des précurseurs ostéoclastiques issus de moelle osseuse en ostéoclastes matures capables de résorber la matrice osseuse [308]. *In vivo*, ce rôle majeur du M-CSF dans l'ostéoclastogenèse a été mis en évidence chez les souris op/op dans lesquelles une mutation non-sens du M-CSF entraîne l'absence de M-CSF biologiquement actif. Ces souris présentent une ostéopétrose sévère due à un défaut d'ostéoclastes [309][310][311]. L'administration de M-CSF recombinant corrige le phénotype osseux et provoque l'apparition d'ostéoclastes capables de résorber la matrice osseuse [312]. Un autre modèle de souris, déficientes pour c-fms, le récepteur de M-CSF, montre le même phénotype ostéopétrotique associé à une déficience en ostéoclastes [313]. La surexpression de M-CSF semble aussi être impliquée dans des pathologies telles que l'ostéoporose et l'apparition de métastases osseuses associées au cancer du sein [314].

Le M-CSF est impliqué dans plusieurs étapes de la différenciation ostéoclastique. Aindi, Il est nécessaire à la prolifération, à la survie et à l'adhérence des précurseurs ostéoclastiques [315]. Il induit aussi la surexpression de RANK, nécessaire à leur différenciation, dans les précurseurs ostéoclastiques [316]. Dans des stades de différenciation plus tardifs, M-CSF active les voies Akt, c-Fos et ERK qui peuvent interagir avec la signalisation induite par l'interaction RANK/RANKL [317].

L'intérêt thérapeutique de l'inhibition de la voie du M-CSF a déjà été démontré grâce à 2 inhibiteurs chimiques de la voie des tyrosines kinases capables d'inhiber le récepteur c-fms, l'Imatinib Mesylate et le Dasatinib. Ces deux molécules sont capables de déréguler de la différenciation ostéoclastique *in vivo* [318][319] et le Desatinib a même des effets similaires à ceux de l'acide Zolédronique sur des animaux traités, avec une augmentation du volume trabéculaire dans les deux cas [319]. Par ailleurs, des études précliniques ont montré que l'inhibition de la voie du M-CSF est capable de réduire significativement la destruction osseuse associée au développement de métastases du mélanome [320] et même de diminuer le développement tumoral dans un modèle de métastases de leucémie myéloïde [321].

D'après ces résultats, l'inhibition de la voie du M-CSF pourrait représenter une approche prometteuse pour inhiber la resorption osseuse associée au développement du sarcome d'Ewing et même indirectement le développement tumoral par inhibition du cercle vicieux.

b) TNF-a : une voie alternative d'ostéoclastogénèse

Un autre mécanisme indépendant de RANKL, pourrait, du moins en partie, être responsable du développement des lésions ostéolytiques observées durant le développement des tumeurs osseuses primitives. Ce mécanisme impliquerait la cytokine TNF-a dont le rôle dans l'ostéoclastogenèse a déjà été montré. Ainsi, l'administration chez des souris d'un inhibiteur du TNF-a est capable d'induire une protection totale contre la perte osseuse consécutive à une ovariectomie [110]. Par ailleurs, *in vitro*, la formation d'ostéoclastes fonctionnels à partir de précurseurs circulants peut être induite par le TNF-a en présence de M-CSF mais en absence de RANKL par un mécanisme impliquant les deux récepteurs du TNF-a, TNFR1 et 2 [322][323][324][325]. En culture, les cellules de sarcome d'Ewing expriment le TNF-a et les macrophages associés aux tumeurs d'Ewing sont capables de se différencier *in vitro* en ostéoclastes matures en présence de M-CSF et TNF-a [271]. Ainsi, ce mécanisme indépendant de RANKL pourrait être impliqué dans l'ostéolyse associée au développement des tumeurs d'Ewing en site osseux et une stratégie anti-TNF-a pourrait induire une inhibition du cercle vicieux entre prolifération tumorale et résorption osseuse. Une limite potentielle de cette stratégie repose sur la capacité du TNF-a à induire l'apoptose des cellules tumorales et une stratégie anti-TNF-a pourrait de ce fait, induire un effet protumoral. Cependant, cet effet ne devrait pas être observé dans le sarcome d'Ewing, ces tumeurs étant résistantes à l'apoptose induite par le TNF-a [326][327]. Par ailleurs des stratégies anti-TNF-a utilisant des anticorps bloquants tels que le adalimumab, etanercept ou infliximab ont déjà été développées pour des pathologies inflammatoires telles que la spondylarthrite ankylosante, le psoriasis ou la polyarthrite rhumatoïde. Des essais cliniques ont permis de montrer que ces traitements présentent peu d'effets secondaires à court terme. Des effets secondaires tels que des lymphomes [328][329] ont cependant été observés pour des traitements à long terme mais dans le contexte du sarcome d'Ewing, un traitement potentiel local et sur une courte durée devrait permettre d'éviter ces risques.

II. Matériels et méthodes

1) Expérimentation in vitro

a) Culture cellulaire

● **Matériel utilisé :**

- Milieu de culture Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 à 2 mM de L-glutamine (Biowhittaker)
- Milieu de culture Dobelcco's Modified Eagle Meduim (DMEM) à 4.5 g/l de glucose, 2mM L- glutamine (Biowhittaker)
- Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Hyclone Perbio).
- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}, Biowhittaker).
- trypsine-EDTA [Trypsine : 0,5 g/L ; EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) : 0,2 g/L] (Biowhittaker)
- Antibiotiques : Pénicilline 100 U/ml et Streptomycine 100 µg/ml (Invitrogen)
- F25, F75 ou 175 cm^2 (FALCON™, Becton Dickinson Labware)
- Plaque de culture 96 puits (FALCON™)
- Collagène de type I (BD Biosciences)

● **Lignées cellulaires utilisées :**

Lignées humaines de sarcome d'Ewing :

Huit lignées de sarcome d'Ewing ont été utilisées, toutes d'origine humaine (Tableau 5): A673, EW24, TC-71, SK-N-MC, TC-32, SK-ES-1 et STA-ET-1 et RD-ES. Elles présentent toutes la translocation entre les chromosomes 11 et 22 conduisant à la formation de gènes de fusion EWS-ETS caractéristiques du sarcome d'Ewing (Tableau 4). Les lignées A673, SK-N-MC, TC-32, SK-ES-1 et RD-ES nous ont été gracieusement fournies par le Dr S. Burchill (Leeds, UK). Les lignées TC-71 et EW24 et STAET-1 nous ont été fournies par le Dr. Delattre (Institut Curie, Paris).

Les lignées A673, TC-32 et RD-ES sont cultivées en Milieu de culture DMEM supplémenté de 10% de SVF et 1% Pénicilline/Streptomycine et les lignées EW24, TC-71, SK-N-MC et STA-ET-1 en RPMI supplémenté de 10% de SVF et 1% de Pénicilline/Streptomycine. Pour les lignées TC-71 et STA-ET-1, les flasques sont

préalablement incubées 30 minutes avec une solution de PBS 1X contenant de l'acide acétique (0,02N) et du collagène de type I (50 µg/ml, BD Biosciences).

Lignées	Origine	Type EWS-FLI1	Statut p53	Origine
TC-71	humain	I	muté	Humérus Homme, 22 ans Sarcome d'Ewing
SK-N-MC		I	muté	Femme, 14 ans pPNET supraorbital
EW24		I	WT	
A673		I	muté	Muscle Femme, 15 ans Sarcome d'Ewing
TC-32		I	(WT)	pPNET
SK-ES-1		II	muté	Os Homme, 18 ans Sarcome d'Ewing
RD-ES		II	muté	Humérus Homme, 19 ans Sarcome d'Ewing
STA-ET-1		I	WT	

Tableau 4 : Caractéristiques des différentes lignées cellulaires de sarcome d'Ewing utilisées (pPNET : Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumor).

Monocytes humains CD14+ :

Les monocytes CD14+ sont purifiés du sang humain par centrifugation sur gradient de Ficoll (Sigma Aldrich) et par sélection avec des microbilles magnétiques CD14 (Miltenyi Biotec). Les cellules CD14+ sont cultivées en milieu α-MEM supplémenté de 10% de SVF et de hM-CSF (25ng/ml, R&D Systems).

Cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) :

Les CSM humaines sont purifiées de la moelle osseuse humaine par centrifugation sur gradient de Ficoll puis mises en culture à raison de 500000 cellules /cm^2 durant 4 jours en milieu DMEM complémenté avec 10% de SVF. Seules les cellules ayant adhérées sont conservées, permettant ainsi d'éliminer les cellules hématopoïétiques. Ces cellules adhérentes sont ensuite cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 10 % de SVF et de bFGF (1 ng/ml, R&D systems). Ces CSM sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques CD45 et CD34 et positives pour les marqueurs mésenchymateux CD105 et CD90

● **Entretien des cellules et expérimentation :**

Toutes les expérimentations sont réalisées en conditions stériles sous hôte à flux laminaire vertical (PSM Securiplus). Les cellules sont cultivées en flasques de 25, 75 ou 175 cm^2, dans du milieu DMEM ou dans du milieu RPMI. Elles sont ensemencées à la densité de $50x10^3$ cellules/cm^2. Les flasques sont ensuite placées dans une atmosphère saturée en humidité avec 5% de CO_2 à 37°C. A confluence, les cellules sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA. La trypsine est ensuite neutralisée en ajoutant du milieu de culture supplémenté par 10% de SVF. Une centrifugation à 1600 tours par minute pendant 5 minutes à température ambiante est réalisée et les cellules sont comptées. Le culot est repris dans du milieu complet et une fraction est réensemencée dans une nouvelle flasque.

Etude de la viabilité cellulaire par test XTT :

Mille cellules A673 et TC-71 sont ensemencées dans 100µl de milieu dans une plaque de culture 96 puits. Les cellules sont ensuite traitées avec des doses croissantes de TNF-a (50 à 200 ng/ml) durant 72H à raison de 1 traitement par jour. La mesure de la viabilité cellulaire est réalisée par un test colorimétrique de quantification non-radioactif basé sur le clivage du sel de Tétrazolium XTT (Cell proliferation Kit II, Roche). La mesure de la DO à 490 nm reflète la viabilité cellulaire par l'activité deshydrogénase mitochondriale. Après 72H de traitement, 50 µL de la solution XTT sont ajoutés dans chaque puits et le dosage du formazan est quantifiable par une mesure de la DO à 490 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la viabilité des puits contrôles.

Etude de l'ostéoclastogenèse par différenciation des cellules CD14+ :

Les cellules CD14+ sont ensemencées en plaque de culture 96 puit à raison de 45000 cellules / puits. Après 3 jours de culture, le milieu est remplacé par du milieu frais supplémenté de 10% de SVF et de hM-CSF (25ng/ml) et de hRANKL (100ng/ml, R&D Systems) ou de hTNF-a (50, 100 et 200 ng/ml, R&D Systems). Le milieu est changé tous les 4 jours. La formation d'ostéoclastes survient 13 jours après ensemencement et est observée après fixation et coloration TRAP (Leucocyte Acid Phosphatase Assay kit, Sigma Aldrich).

b) Autres expérimentations in vitro

● **Lysats protéiques :**

Tumoraux :

Les fragments tumoraux sont congelés à sec puis sont disposés dans 1 ml de RLB1X (Promega) contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases 1X (Roche) et broyés à l'aide d'un Thurax Yellow^{line} DI 25 Basic Homogenizer (IKA). La solution obtenue est centrifugée 10 minutes à 12000g, 4°C et le surnageant est congelé à -20°C.

Cellulaires :

Dix millions de cellules tumorales culotées dans un tube de 1 ,5 ml puis congelées à -20°C sont lysées dans 100 µL de RLB1X contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases 1X. Les tubes sont ensuite centrifugés 10 minutes à 12000g, 4°C et le surnageant est congelé à -20°C.

● **Dosage protéique :**

Le dosage protéique est réalisé à partir de lysats protéiques pour normaliser les résultats obtenus lors des dosages par Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Une gamme étalon d'albumine sérique bovine et 10 µL de lysat protéique (cellulaire ou de tumeur) dilués dans du tampon RLB1X sont déposés en duplicat dans les puits d'une plaque 96 puits. Deux cent µL de réactif BCA (Acide Bicinchoninique + sulfate de cuivre) (Bicinchoninic acid kit for protein détermination, Sigma Aldrich) sont ensuite déposés dans chaque puits. La plaque est disposée 1 heure à 37°C puis l'absorbance est lue à 570 nm à l'aide du Lecteur de micro-plaque (Victor2 wallac 1420 multilabel counter, PerkinElmer)

● **Dosage de RANKL, M-SCSF, TNF-a, hOPG et TRAIL humain par ELISA :**

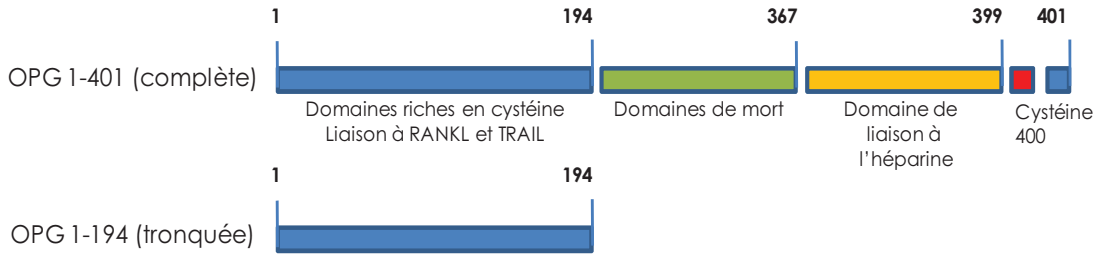
Les dosages de hM-CSF, hTNF-a, hOPG et hTRAIL sont réalisés à l'aide de kits ELISA (R&D Systems) selon les recommandations du fabriquant. Le dosage de hRANKL est réalisé grâce à un kit ELISA ampli-sRANKL (Biomedica) selon les recommandations du fabriquant.

2) Expérimentations in vivo

a) Plasmides utilisés

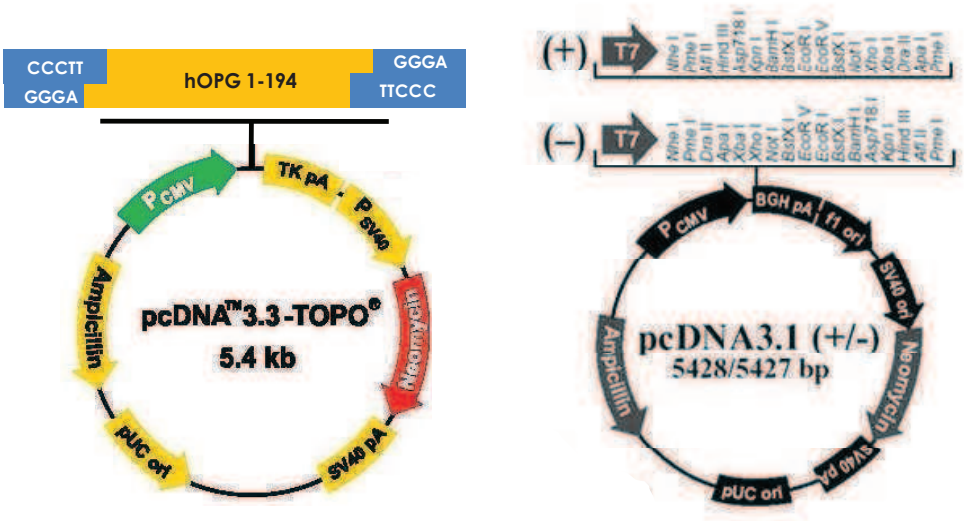
• **<u>Plasmides utilisés en association avec le F68 (Lutrol®) :</u>**

Pour les expérimentations *in vivo* utilisant le F68 (Lutrol®), des plasmides de squelette type pcDNA3 ont été utilisés. La forme tronquée de l'OPG humaine (1-194) a été utilisée pour ces expérimentations en raison de sa meilleure activité biologique comparativement à la forme complète 1-401 (Figure 45)[288].



<u>Figure 45 :</u> Structure des OPG humaines complète (1-401) et tronquée (1-194).

L'ADNc codant l'OPG 1-194 humaine a été cloné dans le plasmide pcDNA3.3 en aval d'un promoteur de type CMV grâce au kit pcDNA™3.3-TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen, Figure 46). Le plasmide vide pcDNA3.1 (Invitrogen) a été utilisé comme contrôle pour ces expériences en raison de sa structure et de sa taille, très poches de celle du plasmide pcDNA3.3 (Figure 46).



<u>Figure 46 :</u> Cartes des plasmides pcDNA3.3-hOPG et pcDNA3.1.

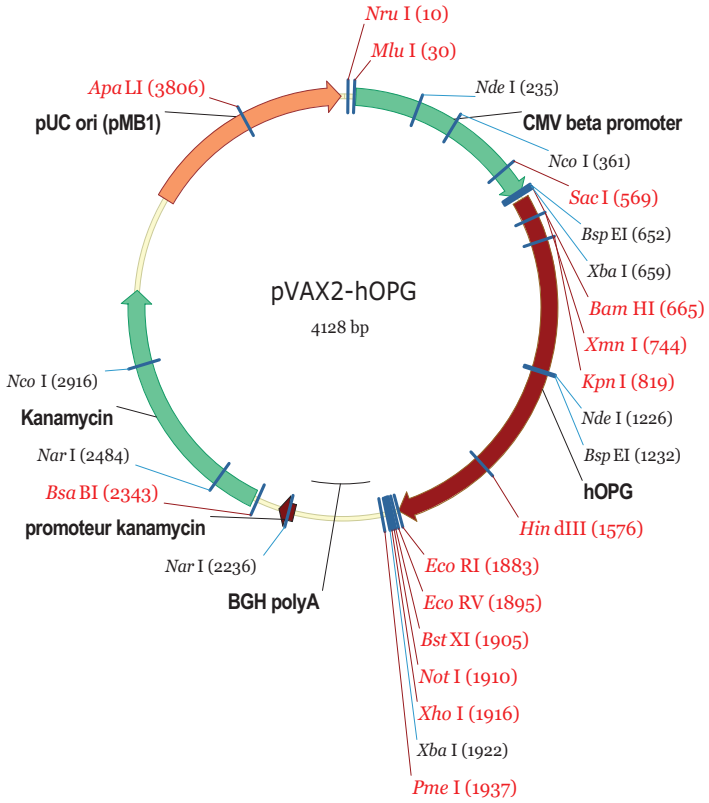


Figure 47 : Carte du plasmide pVAX2-hOPG.

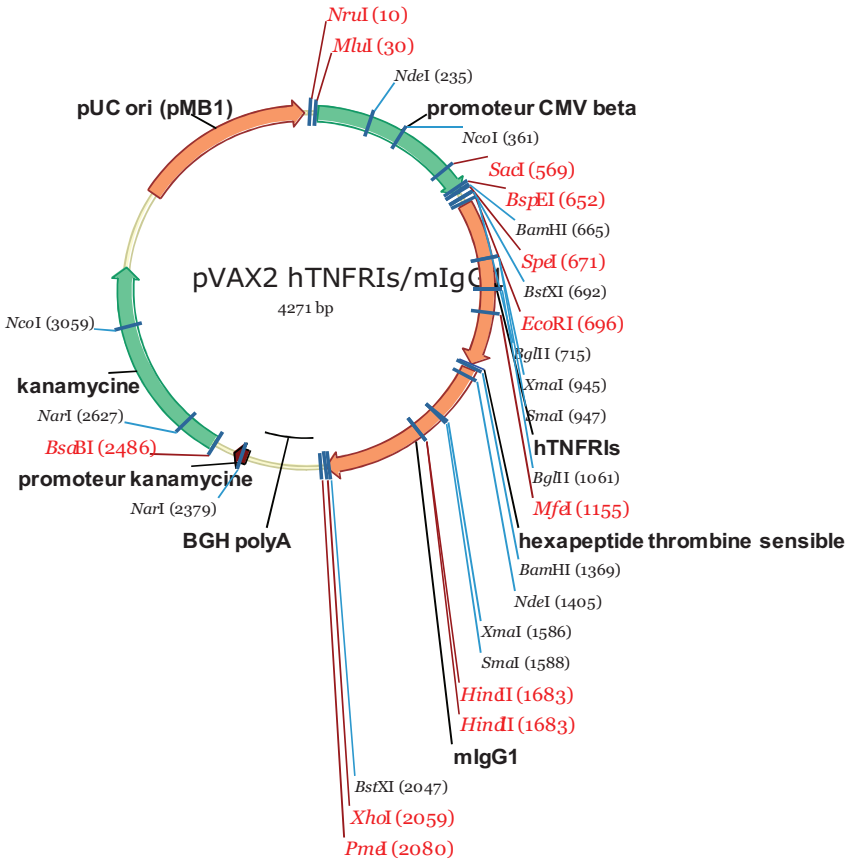


Figure 48 : Carte du plasmide pVAX2-hTNFR1.

● **Plasmides utilisés pour l'électrotransfert :**

Pour les expérimentations *in vivo* impliquant l'électrotransfert, des plasmides de squelette type pVAX2 ont été utilisés. Le plasmide pVAX2-hOPG contient l'ADNc codant l'OPG humaine 1-194, en aval d'un promoteur de type CytoMégaloVirus (CMV, Figure 47). Le plasmide pVAX2-hTNF-R1 contient l'ADNc codant le TNF-R1 derrière un promoteur de type CMV (Figure 48) et en amont de l'ADNc codant une IgG1 murine, accentuant sa stabilité dans le sérum et donc sa durée de vie. Ces deux plamsides ont été clonés par Pascal Bigey (UMR 8151, UMR-S 1022- Paris V). Le plasmide vide pVAX2 a été utilisé comme contrôle pour ces expériences.

Les modèles précliniques de sarcome d'Ewing sont induits par l'injection de cellules tumorales humaines dans la patte postérieure de souris femelles nude athymiques de 5 semaines (Janvier). Les souris sont hébergées dans des conditions exemptes de pathogènes à l'unité de Thérapeutique Expérimentale de la faculté de Médecine de Nantes en accord avec la réglementation du comité d'Ethique régional (CEEA PH). Deux approches ont été utilisées dans ces études, conduisant au développement d'un modèle intramusculaire (extra-osseux) et d'un modèle issu de la transplantation de fragments tumoraux.

b) Modèles tumoraux murins

● **Modèles de sarcome d'Ewing intramusculaires:**

Après anesthésie par inhalation d'une combinaison isoflurane (AErrane, Baxter S.A.S.) / air (1.5%, 1L/min), 2 millions de cellules tumorales A673 resuspendues dans 20 µl de PBS 1X sont injectées en percutané dans le muscle tibial antérieur droit de souris Nude. La tumeur, initialement extra-osseuse qui envahit secondairement l'os, devient cliniquement décelable en approximativement 10 jours.

● **Modèles de sarcome d'Ewing transplantés:**

Après anesthésie par inhalation d'une combinaison isoflurane / air, un fragment de tumeur TC-71 de 2x2x2 mm^3 (induit par injection intramusculaire de cellules tumorales) est transplanté dans la patte postérieure droite d'une souris Nude Athymiques. La tumeur devient cliniquement décelable en environ 10 à 15 jours. L'intérêt de ce modèle est un développement tumoral plus lent qu'avec les modèles intramusculaires ou intra-osseux mais présentant les mêmes lésions ostéolytiques.

c) Approches thérapeutiques par transfert de gène *in vivo*

● **Transfert de gène à l'aide du F68 (lutrol®) (réalisé en collaboration avec le Dr Bruno Pitard, U580, Nantes)**

La solution ADN plasmidique / F68 est préparée à une concentration finale de 1µg/µL de plasmide et 3% de F68 dans un volume final de 50µl de NaCl 150 mM. Les souris, anesthésiées par inhalation d'une combinaison isoflurane / air reçoivent deux injections intra-musculaires de 50µl chacune de cette solution au niveau du muscle tibial antérieur de chaque patte. Différents groupes de souris sont constitués suivant le plasmide d'intérêt. La première injection du complexe ADN plasmidique / F68 est réalisée une semaine avant l'implantation de la tumeur (afin d'atteindre le pic de production de la protéine par les cellules musculaires), suivie de 4 autres injections à 7 jours d'intervalle (Figure 49). L'expression systémique de la protéine est évaluée par dosage ELISA sur un prélèvement sanguin réalisé dans le sinus veineux rétro-orbital, 5 jours après injection du complexe ADN plasmidique / F68.

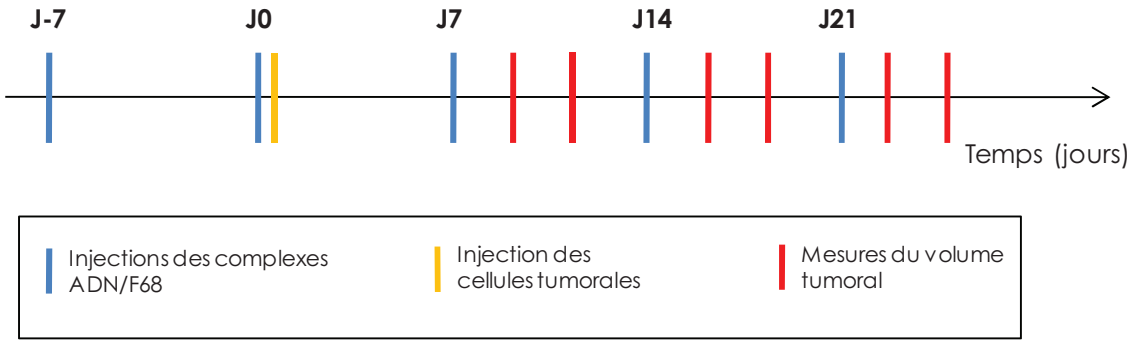


Figure 49 : Protocole de transfert de gène utilisant le F68 (Lutrol®).

● **Transfert de gène par électrotransfert (réalisé en collaboration avec les Dr Virginie Escriou et Pascal Bigey, UMR 8151, UMR-S 1022- Paris V)**

Après anesthésie par inhalation d'une combinaison isoflurane / air, 50 µg d'ADN plasmidique dilué dans un volume final de 50µl de PBS sont injectés dans le muscle tibial antérieur gauche de souris femelles Nude athymiques. La patte est enduite d'un gel conducteur (Eko-Gel, Egna) au niveau du muscle tibial antérieur gauche. Les impulsions électriques sont produites à l'aide du générateur (ECM 380 BTX, Genetronics) et appliquées au muscle, environ 30 secondes après injection de l'ADN à l'aide de deux électrodes plates en acier inoxydable, distantes d'environ 5 millimètres (largeur du

muscle de la souris). Les électrodes sont placées de part et d'autre de la patte de la souris (Figure 50). Les conditions standards d'électrotransfert utilisées sont de 8 impulsions de 180V/cm, d'une durée de 20 ms chacune et administrées à la fréquence de 5 Hertz.

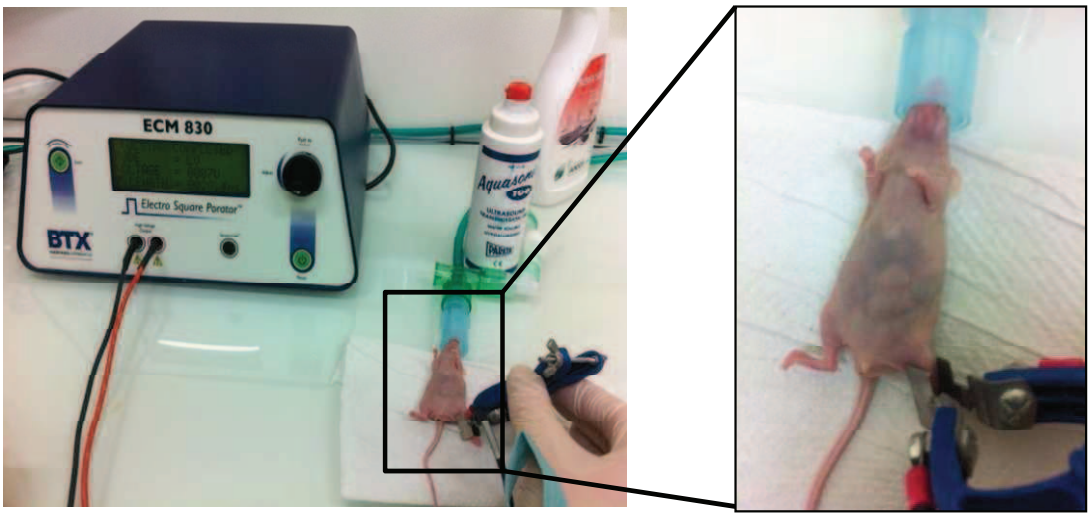


Figure 50 : Photo d'un électrotransfert réalisé sur une souris Nude.

L'expression systémique de la protéine est évaluée par dosage ELISA sur un prélèvement sanguin réalisé dans le sinus veineux rétro-orbital, 7 jours après l'électrotransfert pour l'OPG, 9 jours après pour le TNF-R1 (correspondant au pic de production respectif des deux protéines) et au moment de l'euthanasie des animaux.

d) Suivi clinique et prélèvements

- **Volume tumoral :**

Le volume tumoral est mesuré 2 fois par semaine avec un pied à coulisse selon 2 axes orthogonaux et calculé suivant la formule [(L x l^2) / 2], où « L » correspond au plus grand axe de la tumeur et « l » au plus petit axe. Les souris sont euthanasiées quand la tumeur représente environ 10% de leur poids ou quand leurs conditions physiques le nécessitent.

● **Prélèvements sanguins :**

Après anesthésie des souris par inhalation d'une combinaison isoflurane / air, les prélèvements sanguins sont réalisés au niveau du sinus veineux rétro-orbital et récupérés dans des tubes de 1,5 ml. Les tubes sont maintenus 1 heure à 4°C puis centrifugés 10 minutes à 3000g à 4°C. Le sérum est ensuite collecté puis congelé à -20°C.

● **Prélèvements des fragments tumoraux :**

Après anesthésie des souris par inhalation d'une combinaison isoflurane / air, elles sont euthanasiées par dislocation cervicale et des fragments de tumeurs sont prélevés dans le but de réaliser des lysats protéiques. Ces fragments sont disposés dans des tubes de 1,5 ml et congelés à sec dans de l'azote liquide. Le reste de la tumeur est fixé dans une solution de ParaFormAldéhyde PFA 4% dans le but de réaliser des études histologiques.

● **Analyses radiologiques :**

Des clichés radiographiques sont réalisés à l'aide d'un appareil radiographique (Faxitron® X-Ray) au cours de l'expérimentation (après anesthésie des animaux par un mélange rompun kétamine) et sur les pattes prélevées à l'euthanasie des animaux.

● **Analyses de la microarchitecture osseuse :**

Afin de comparer la microarchitecture osseuse entre les animaux traités et non traités, une analyse utilisant le micro-scanner Skyscan 1076 *in vivo* (Skyscan) est réalisée. Les tibias des souris ayant développé la tumeur (tibia gauche) et quelques pattes controlatérales, utilisées comme contrôles, sont scannées en utilisant les mêmes paramètres (taille du pixel 18 µm, 50 kV, filtre d'aluminium 0,5 mm, angle de rotation 0.6° et 5 min d'acquisition). La reconstruction des données et l'analyse est effectuée respectivement avec le logiciel NRecon et CTan (Skyscan). Le volume osseux rapporté au volume total trabéculaire (BV/TV) est ensuite déterminé dans la région d'intérêt (ROI) qui est composée de 1,5 cm sous la plaque de croissance. La visualisation des tibias en 3 dimensions est obtenue avec le logiciel ANT (Skyscan).

● **Analyses statistiques :**

Pour les expérimentations in vivo, le test ANOVA a été utilisé. Les différences de survie ont été déterminées par le test Log-RANK sur la courbe de survie de Kaplan Meier. Les résultats sont considérés comme significatifs quand $p \leq 0,05$.

3) Immunohistochimie

Après euthanasie des animaux, les prélèvements de tumeur sont fixés dans une solution de ParaFormAldéhyde (PFA) 4% à 4°C pendant au minimum 72h. Les échantillons sont ensuite cryoprotégés dans des solutions de sucrose 6% pendant 24H puis 30% pendant 48H tamponnées à 4°C en PBS 1X pH=7,4. Ils sont ensuite enrobés en Neg50 (Thermo Scientific), puis congelés dans l'isopentane (Sigma) refroidi à -80°C sur un lit de carboglace. Les blocs ainsi obtenus sont mis en cassette identifiée, puis stockés à -80°C.

Les blocs sont ensuite coupés à l'aide d'un cryotome (Microm Microtech). Les coupes d'une épaisseur de 40 µm (coupes flottantes) sont recueillies dans du PBS 1X, 0,1% thimerosal pH=7,4 et stockées à 4°C. Les coupes flottantes sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes dans une solution de PBS 1X. Une perméabilisation est ensuite réalisée par une incubation de 25 minutes dans du PBS 1X, 0,1% Triton 100X. Les coupes sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes dans une solution de PBS 1X puis Les marquages sont effectués.

● **Double marquage mCD68 / hTNF-α :**

Matériel :

Solution de blocage 1 : PBS 1X contenant 5% de sérum de chèvre (Dako) et 1% de BSA (Sigma)

Solution de blocage 2 : fragments Fab d'anticorps de chèvre dirigés contre la souris (Goat anti-mouse Fab, Jackson Laboratories) dilués au 1/10e dans le PBS 1X

Anticorps anti-CD68 murin : Anticorps Monoclonal de Rat dirigé contre le CD68 murin (Monoclonal Rat anti-mouse CD68, Abcam)

Anticorps secondaire 1 : Anticorps de chèvre dirigé contre les IgG (H+L) de rat (Polyclonal goat anti-Rat IgG (H+L), Life technologies, Invitrogen, AlexaFluor 488)

Anticorps anti-TNF-α humain : Anticorps monoclonal de souris dirigé contre TNF-α humain (Monoclonal Mouse anti-human TNF-α, Abcam)

Anticorps secondaire 2 : Anticorps de chèvre dirigé contre les IgG (H+L) de souris (Polyclonal goat anti-mouse IgG (H+L), Life technologies, Invitrogen, AlexaFluor 594)

Méthode :

Les sites aspécifiques sont tout d'abord bloqués par incubation des coupes pendant 25 minutes dans la solution de blocage 1. Les coupes sont ensuite incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire ciblant le CD68 murin dilué au 1/100e dans la solution de blocage 1. Elles sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes dans du PBS 1X puis incubées 45 minutes avec l'anticorps secondaire 1 dilué au 1/ 200e dans la solution de blocage 1. Trois rinçages de 5 minutes en PBS 1X sont ensuite réalisés puis un blocage des sites non spécifiques est effectué avec la solution de blocage 2 pendant 25 minutes. Trois rinçages de 5 minutes dans le PBS 1X sont ensuite réalisés et les coupes sont incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé contre le TNF-a humain dilué au 1/100e dans la solution de blocage 1. Après trois rinçages de 5 minutes au PBS 1X, les coupes sont incubées 45 minutes avec l'anticorps secondaire 2 dilué au 1/200e dans la solution de blocage 1. Enfin, Après trois rinçages de 5 minutes au PBS 1X, une contre-coloration nucléaire de 5 minutes est réalisée dans une solution de DAPI (Life technologies, Invitrogen) diluée au 1/50000e dans du PBS 1X. Les coupes sont montées entre lame et lamelle à l'aide de Moviol (Sigma) et conservées à 4°C à l'obscurité et analysée en microscopie confocale (plateau d'Imagerie MicroPicell IFR26 Biogenouest).

● **Triple marquage hTNF-a / hM-CSf / hRANKL**

Matériel :

Solution de blocage 1 : PBS 1X contenant 5% de sérum de chèvre (Dako) et 1% de BSA (Sigma)

Solution de blocage 2 : fragments Fab d'anticorps de chèvre dirigés contre la souris (Goat anti-mouse Fab, Jackson Laboratories) dilués au 1/10e dans le PBS 1X

Solution de blocage 3 : PBS 1X contenant 5% sérum de lapin (Jackson) et 1% BSA

Solution de blocage 4 : fragments Fab d'anticorps de lapin dirigés contre la chèvre (rabbit anti-goat Fab, Jackson Laboratories) dilués au 1/10e dans le PBS 1X

Anticorps anti-TNF-a humain : Anticorps monoclonal de souris dirigés contre le TNF-a humain (Monoclonal Mouse anti-human TNF-a, Abcam)

Anticorps secondaire 1 : Anticorps de chèvre dirigé contre les IgG (H+L) de souris (Polyclonal goat anti-mouse IgG (H+L), Life technologies, Invitrogen, AlexaFluor 594)

Anticorps anti-M-CSF humain : Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le M-CSF humain (Polyclonal rabbit anti human M-CSF, Abcam)

Anticorps secondaire 2 : Anticorps de chèvre dirigé contre les IgG (H+L) de lapin (Polyclonal goat anti-rabbit IgG (H+L), Life technologies, Invitrogen, AlexaFluor 647)

Anticorps anti-RANKL humain : Anticorps polyclonal de chèvre ciblant le RANKL humain (Polyclonal Goat anti-human RANKL, Abcam)

Anticorps secondaire 3 : Anticorps secondaire de lapin dirigé contre les IgG (H+L) de chèvre (Polyclonal rabbit anti-goat IgG (H+L), Life technologies, Invitrogen, AlexaFluor 488)

Méthode :

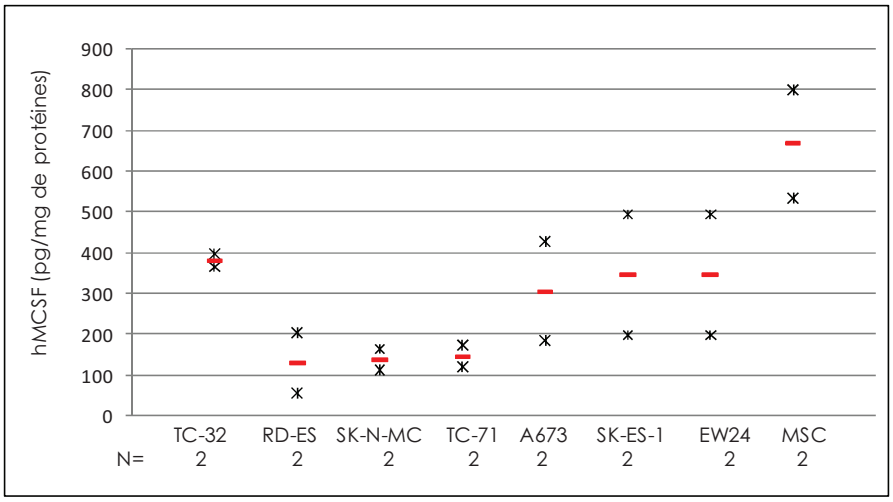
Les sites aspécifiques sont tout d'abord bloqués par incubation des coupes pendant 25 minutes dans la solution de blocage 1 puis 25 minutes avec dans la solution de blocage 2. Les coupes sont ensuite incubées une nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire ciblant le TNF-a humain dilué au 1/100^{e} dans la solution de blocage 1. Elles sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes en PBS 1X puis incubées 45 minutes avec l'anticorps secondaire 1 de dilué au 1/200^{e} dans la solution de blocage 1. Après trois rinçages de 5 minutes au PBS 1X, les coupes sont incubées 1 nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé contre le M-CSF humain dilué au 1/50^{e} dans la solution de blocage 1. Après trois rinçages de 5 minutes au PBS 1X, elles sont incubées 45 minutes avec l'anticorps secondaire 2 dilué au 1/200^{e} dans la solution de blocage 1. Les sites aspécifiques sont une fois de plus bloqués par incubation de 25 minutes dans la solution de blocage 3 puis par 25 minutes dans la solution de blocage 4. Les coupes sont ensuite incubées 1 nuit à 4°C l'anticorps primaire ciblant le RANKL humain dilué au 1/20^{e} dans la solution de blocage 3. Elles sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes dans une solution de PBS 1X puis incubées 45 minutes avec l'anticorps secondaire 3 dilué au 1/200^{e} dans la solution de blocage 3. Enfin, Après trois rinçages de 5 minutes au PBS 1X, une contre-coloration nucléaire de 5 minutes est réalisée dans une solution de DAPI (Life technologies, Invitrogen) diluée au 1/50000^{e} dans du PBS 1X. Les coupes sont montées entre lame et lamelle à l'aide de Moviol (Sigma) et conservées à 4°C à l'obscurité et analysée en microscopie confocale (plateau d'Imagerie MicroPicell IFR26 Biogenouest).

III. Résultats

1) Validation de l'intérêt du ciblage de RANKL, M-CSF et TNF-a humains dans le sarcome d'Ewing

Afin de justifier l'intérêt du ciblage thérapeutique de RANKL, M-CSF et TNF-a humains dans le sarcome d'Ewing, nous avons tout d'abord analysé l'expression de ces 3 cytokines dans les lignées cellulaires de sarcome d'Ewing étudiées ainsi que dans des CSM humaines en culture. Pour cela, des dosages ELISA ont été effectués sur des lysats protéiques de cellules en culture (Figure 51).

A



B

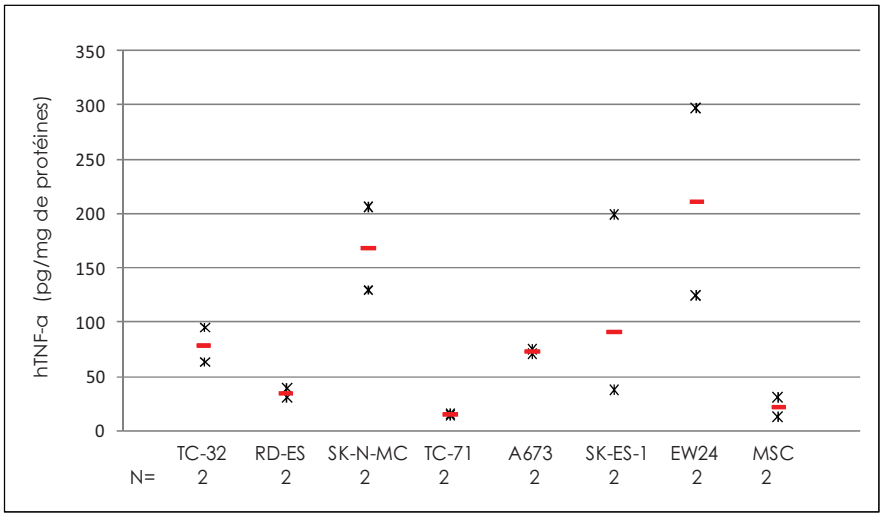


Figure 51 : Dosages de M-CSF (A) et TNF-a (B) humains réalisés par test ELISA. Les dosages ELISA ont été réalisés sur des lysats de cellules humaines de sarcome d'Ewing et de CSM humaines en culture et normalisés en fonction de la quantité de protéines présentes. (N = nombre d'échantillons tumoraux testés).

Nous n'avons pas été à même de nous procurer un kit de dosage ELISA permettant un dosage de RANKL humain reproductible et significatif dans les lysats cellulaires. Concernant M-CSF humain et TNF-a humain, une variation d'expression a pu être observée dans toutes les lignées cellulaires de sarcome d'Ewing. La concentration moyenne de M-CSF la plus élevée a été mesurée dans la lignée EW24 (382,5 pg/mg de protéines) et la plus basse dans la lignée RD-ES (131,7 pg/mg de protéines)(Figure 51 A). Une concentration de M-CSF de 668,9 pg/mg de protéines a été mesurée dans les lysats de CSM. Concernant TNF-a, les concentrations mesurées varient en moyenne de 14,4 pg/mg de protéines pour TC-71 à 211 pg/mg de protéines pour EW24 (Figure 51 B). Une concentration de M-CSF de 21,3 pg/mg de protéines a été mesurée dans les lysats de CSM. Concernant les 2 cytokines, Il ne semble pas y avoir de correlation directe entre leur taux expression dans les lignées de sarcome d'Ewing en culture et l'expression de EWS-FLI1 comparativement aux CSM.

Afin de déterminer si les mêmes variations d'expression de M-CSF et TNF-a peuvent être observées entre les lignées et les tumeurs, nous avons ensuite étudié leur expression dans des fragments de tumeurs induites par injection intramusculaire des lignées cellulaires de sarcome d'Ewing correspondantes. Les fragments de tumeurs ont été prélevés à l'euthanasie des animaux puis lysés, les protéines ont ensuite été dosées pour permettre une normalisation des tests ELISA (Figure 52).

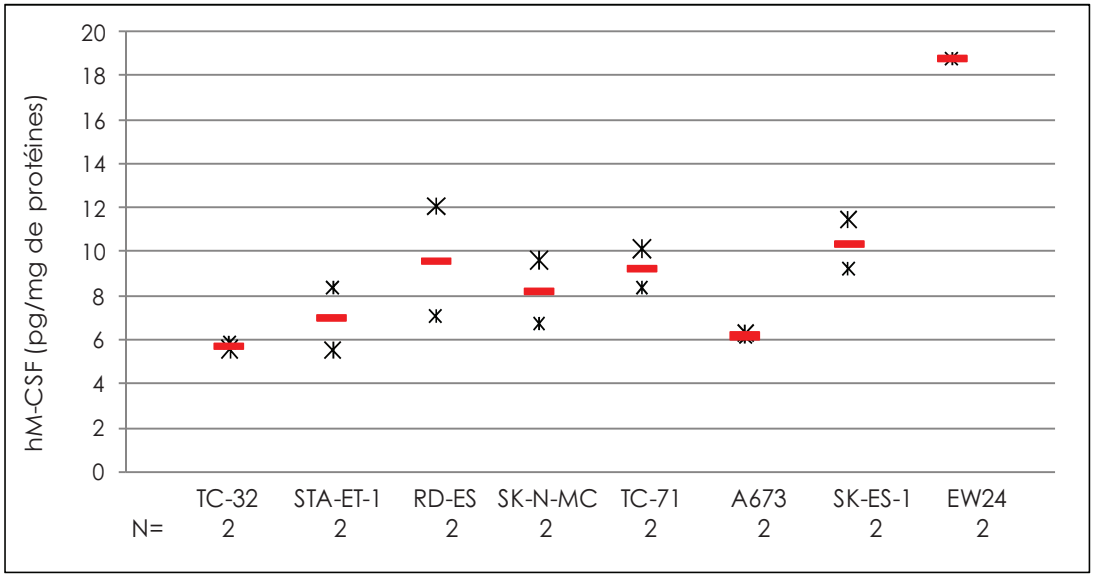


Figure 52 : Dosages de M-CSF humain réalisés par test ELISA. Les dosages ont été réalisés sur des lysats protéiques de fragments de tumeurs induites par injection intramusculaire de cellules de sarcome d'Ewing et normalisés en fonction de la quantité de protéines présentes. (N = nombre d'échantillons tumoraux testés).

Une fois encore, le kit de dosage de RANKL humain ne nous a pas permis d'obtenir des données reproductibles. En revanche, une expression de M-CSF variant en fonction des lignées a été observée. Cette expression s'élève en moyenne de 5,8 pg/mg de protéines pour la lignée TC-32 à 18,7 pg/mg de protéines pour la lignée EW24. En revanche, le TNF-a humain n'a pas pu être détecté dans les différentes tumeurs lors du dosage ELISA.

Nous avons ensuite voulu confirmer la présence des 3 cytokines au niveau tissulaire. Après congélation de tumeurs A673 et TC-71 induites par injection intramusculaire des cellules correspondantes, une approche complémentaire par immunohistofluorescence a été réalisée afin de visualiser la production de ces cytokines *in situ* dans les tumeurs. Un triple marquage immunohistofluorescent avec 3 anticorps spécifiques de ces cytokines a été réalisé sur des coupes de tumeurs de 40 µm et analysé en microscopie confocale (Figure 53).

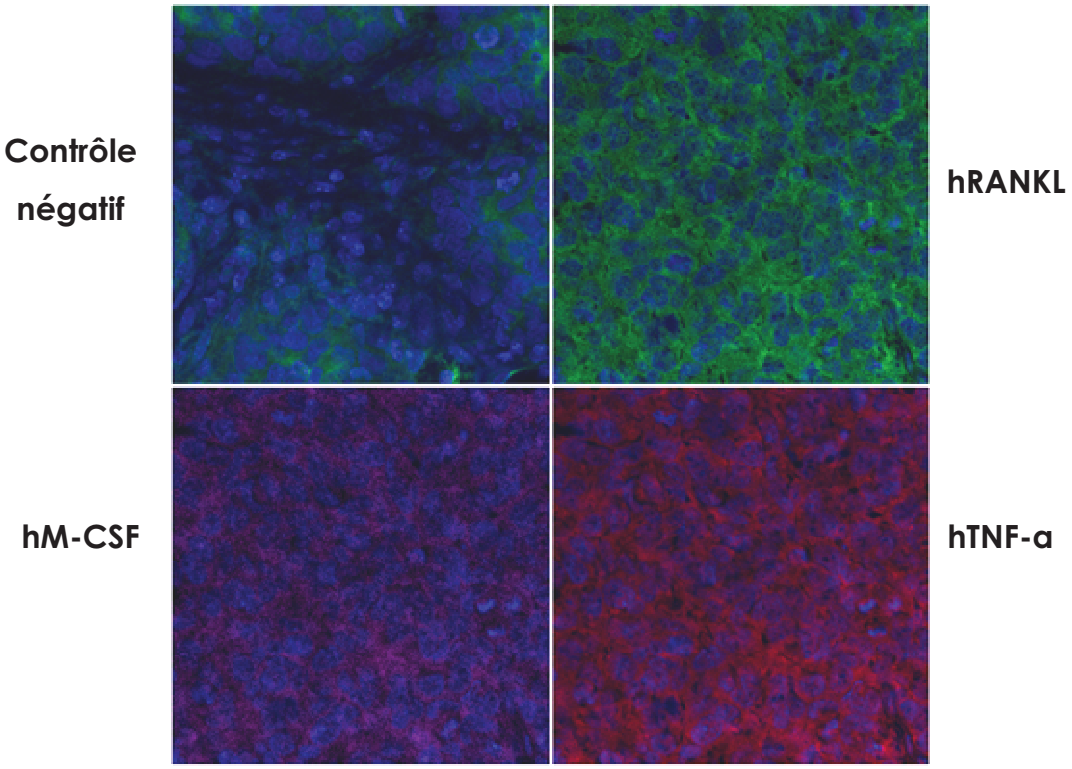


Figure 53 : Marquage immunohistofluorescent réalisé sur une coupe flottante de tumeur A673. Des coupes flottantes ont été réalisées sur une tumeur induite par injection intramusculaire de 2 millions de cellules de sarcome d'Ewing A673. Un immunomarquage a été réalisé avec des anticorps ciblant le M-CSF, RANKL et TNF-a humains et révélé par fluorescence en microscopie confocale. Les noyaux sont visualisés à l'aide d'une contre-coloration DAPI (G X400).

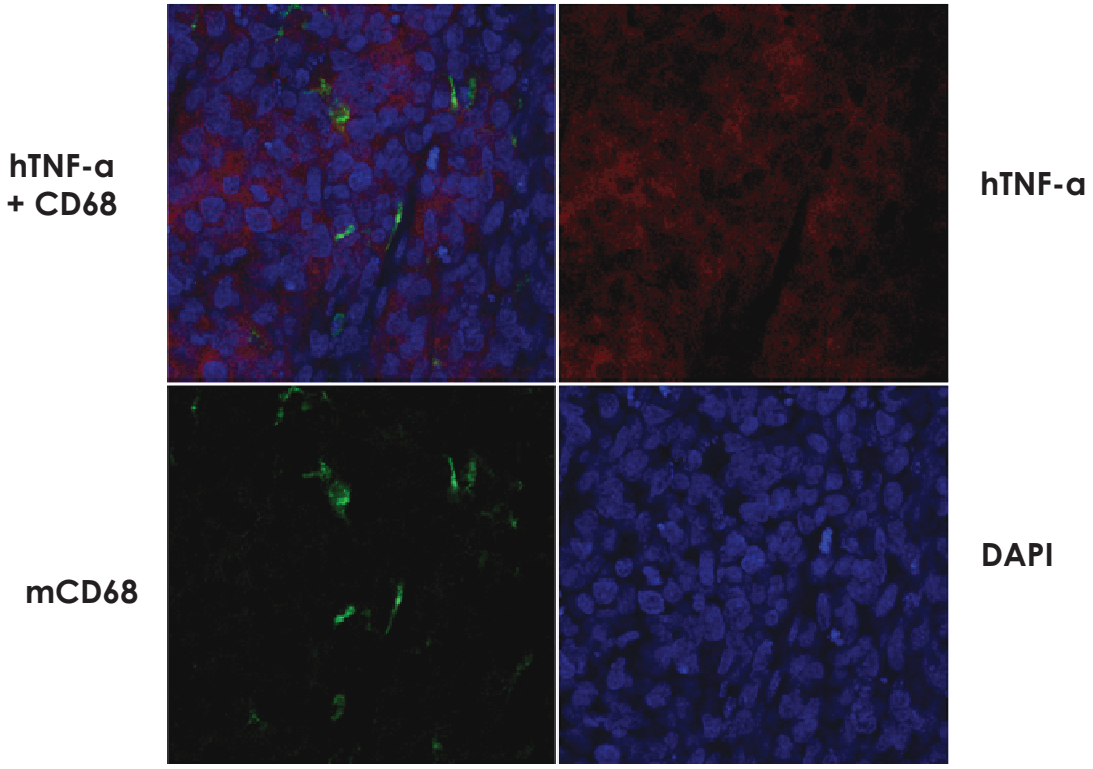


Figure 54 : Marquage Immunohistofluorescent réalisé sur une coupe flottante de tumeur A673. Des coupes flottantes ont été réalisées sur une tumeur induite par injection intramusculaire de 2 millions de cellules A673. Un immunomarquage a été réalisé avec des anticorps ciblant le TNF-a humain et le marqueur CD68 murin et révélé par fluorescence en microscopie confocale. Les noyaux sont visualisés à l'aide à une contre-coloration DAPI (G X400).

Une expression homogène de RANKL, TNF-a et M-CSF a pu être observée sur les coupes de tumeur A673, indiquant la présence de ces 3 cytokines humaines dans le sarcome d'Ewing. Les anticorps ciblant le M-CSF humain et le TNF-a humain ne présentent aucune réaction croisée avec le M-CSF murin et le TNF-a murin respectivement. Quant à l'anticorps ciblant RANKL humain, il présente potentiellement 30 % de réactions croisées avec le RANKL murin. Cependant, pour éviter d'éventuelles réactions croisées, tous les sites murins ont été bloqués avant le marquage et nous pouvons donc affirmer que la cytokine détectée est très majoritairement d'origine humaine. Les mêmes résultats ont été obtenus à partir des coupes réalisées sur les tumeurs induites par injection intramusculaire de cellules de sarcome d'Ewing TC-71. D'après ces observations, les cellules tumorales produisent donc les 3 cytokines, ce qui justifie notre stratégie thérapeutique.

D'après la littérature, les macrophages infiltrant les tumeurs d'Ewing seraient capables de se différencier en ostéoclastes en réponse au TNF-a et au M-CSF. Pour valider notre stratégie visant à bloquer cette différenciation en inhibant le TNF-a humain, nous avons souhaité vérifier la présence de ces macrophages sur les mêmes coupes de tumeur. Un double marquage immunohistofluorescent avec un anticorps spécifique du TNF-a humain et un anticorps spécifique du marqueur CD68 murin (caractéristique des macrophages) a été réalisé sur les mêmes coupes flottantes de tumeurs A673 et TC-71 et analysé en microscopie confocale (Figure 54).

Comme précédemment, une expression homogène du TNF-a a pu être observée sur les coupes de tumeurs. Par ailleurs, la présence de quelques macrophages infiltrant la tumeur et pouvant potentiellement se différencier en ostéoclastes résorbants a bien été observée sur ces mêmes coupes.

2) Approches thérapeutiques

Au vu des résultats précédents, il nous a semblé pertinent de proposer des stratégies thérapeutiques visant à bloquer ces 3 cytokines dans des modèles précliniques de sarcome d'Ewing. En raison des outils disponibles au laboratoire, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'inhibition de RANKL et du TNF-a.

a) Stratégie anti-hRANKL

L'effet thérapeutique de l'OPG humaine administrée par transfert de gène non viral a été évalué dans le modèle préclinique de sarcome d'Ewing TC-71 induit par transplantation de fragments tumoraux. L'injection du complexe vecteur synthétique F68 / ADN a été réalisée 7 jours (J-7) avant la transplantation d'un fragment de tumeur TC-71 en site paratibial puis tous les 7 jours durant 4 semaines (Figure 55). La première administration du plasmide pcDNA3.3-hOPG est réalisée 7 jours avant l'implantation de la tumeur en raison du temps nécessaire pour atteindre le pic de production de la protéine par les cellules musculaires.

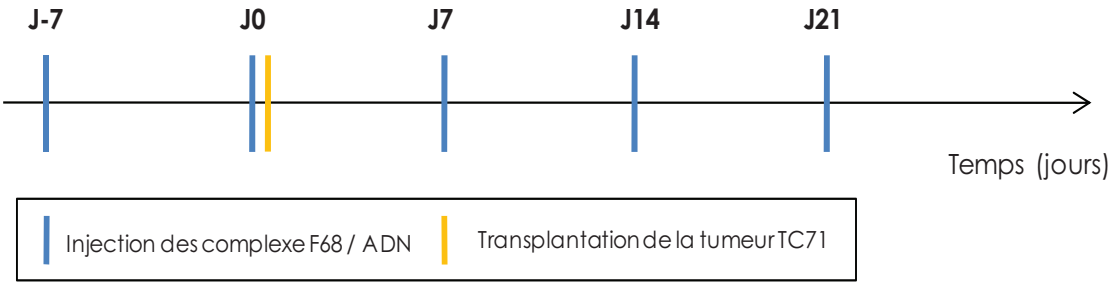


Figure 55 : Protocole d'aministration de l'OPG. Le protocole thérapeutique est consituté de 5 injections du complexe F68 / ADN codant pour la protéine hOPG à une semaine d'intervalle, la première injection ayant lieu 1 semaine avant la transplantation de la tumeur

Deux groupes de 6 souris ont été constitués, le premier groupe traité par le plasmide pcDNA3.3-hOPG et le second par le plasmide vide pcDNA3.1. Des expériences précédentes ont déjà validé une absence d'effet du plasmide vide sur le développement tumoral par rapport à un groupe contrôle non traité. La production de l'OPG humaine a été confirmée par dosage ELISA dans le sérum des souris ayant reçu le plasmide pcDNA3.3-hOPG. Des prélèvements de sang dans le sinus rétro-orbitaire ont été effectués le jour de la transplantation (J0), soit 7 jours après la première injection, au pic de production de la protéine (Figure 56).

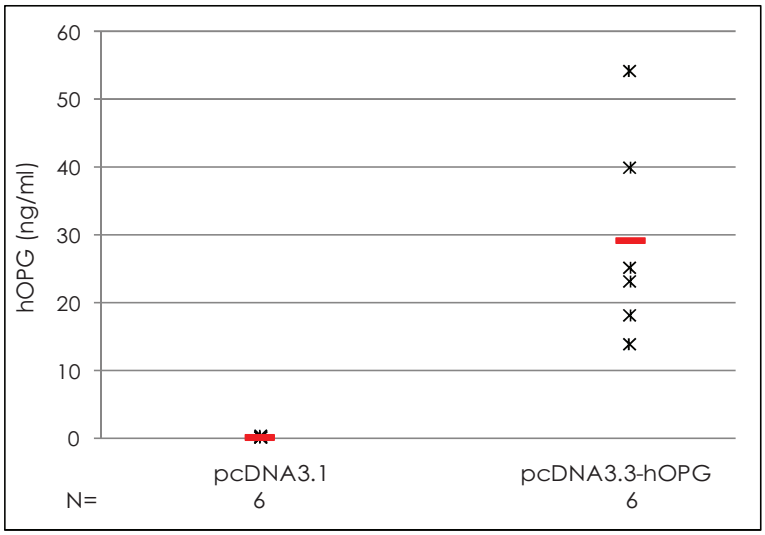


Figure 56 : Validation de la surexpression de l'OPG humaine dans le sérum des souris. L'OPG humaine a été détectée par dosage ELISA dans le sérum des souris traitées par le complexe F68 / pcDNA3.3-hOPG en comparaison avec celui de souris ayant reçu le complexe F68 / pcDNA3.1 (N = nombre d'échantillons sanguins testés).

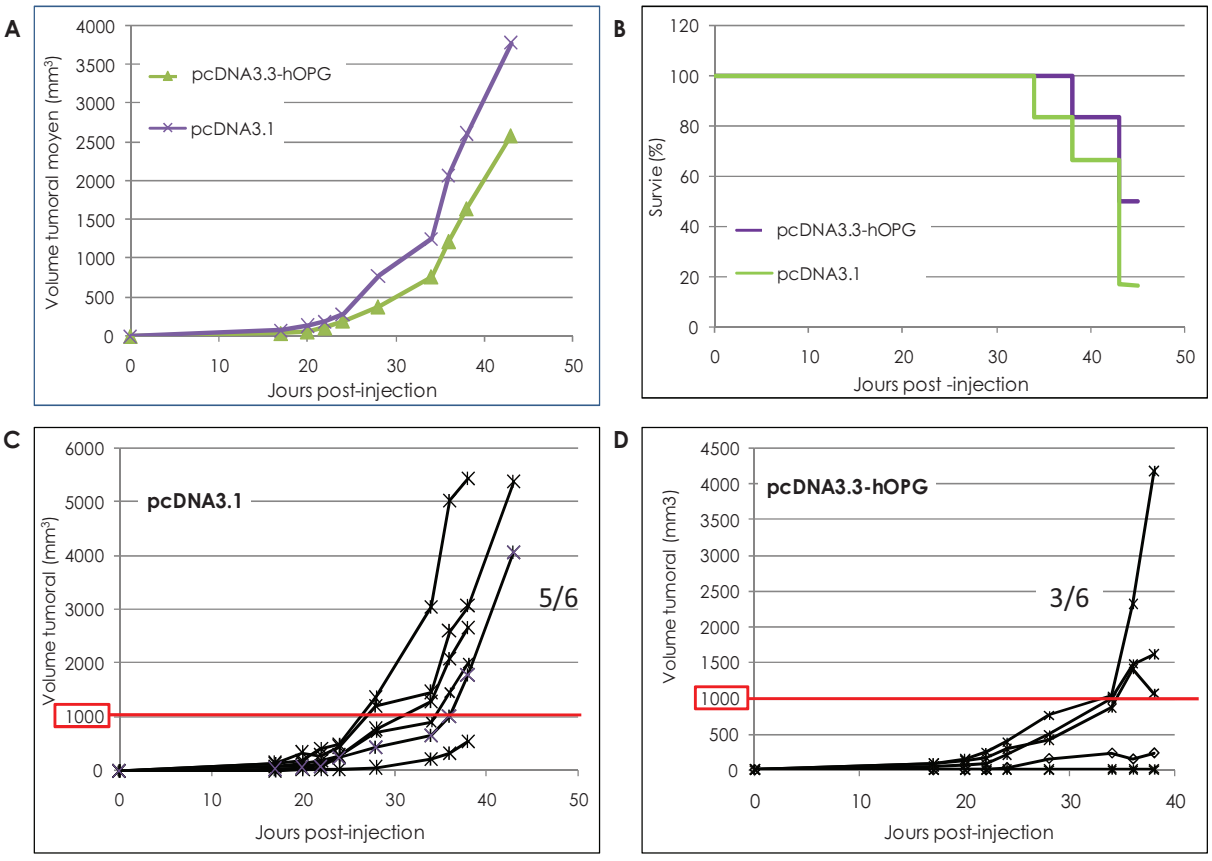


Figure 57 : Evolution des volumes tumoraux et de la survie en fonction du temps. Les tumeurs on été induites par transplantation de fragments de tumeurs TC-71 en site intramusculaire au niveau du tibia. Evolution du volume tumoral moyen (A) ; évolution de la survie des animaux (B) ; évolution du volume tumoral par individu dans le groupe ayant reçu le plasmide pcDNA3.1(C); évolution du volume tumoral par individu dans le groupe ayant reçu le plasmide pcDNA3.3-hOPG (D).

A J0 (7 jours après injection des complexes F68 / ADN), une expression de l'OPG humaine de 13,8 à 54,2 ng/ml de sérum a pu être détectée pour les souris injectées avec le plasmide pcDNA3.3-hOPG, avec une moyenne de 29,2 ng/ml. En revanche, aucune expression significative n'a été détectée dans le sérum des souris ayant reçu le plasmide vide pcDNA3.1 (Figure 56).

Les effets de ce traitement ont ensuite été évalués en termes d'incidence et de développement tumoral ainsi qu'en termes de survie des animaux. Le volume tumoral a été calculé tous les 2 jours, à partir de la mesure des 2 axes perpendiculaires de la tumeur (Figure 57). Nous pouvons observer une diminution non significative du volume tumoral moyen chez les souris traitées par l'OPG humaine comparativement au groupe ayant reçu le plasmide vide pcDNA3.1. En effet, un volume tumoral moyen de 2589,5 mm^3 a été calculé pour le groupe pcDNA3.3-hOPG contre 3784,6 mm^3 pour le groupe pcDNA3.1 (Figure 57 A), 43 jours après la transplantation de la tumeur. Une réduction non significative de l'incidence tumorale a aussi été observée dans le groupe pcDNA3.3-hOPG avec seulement 3 souris sur 6 dépassant un volume tumoral de 1000 mm^3 à J39 (Figure 57 D) contre 5 sur 6 dans le groupe pcDNA3.1 (Figure 57 C). De plus, dans le groupe traité par l'OPG nous pouvons constater que 3 souris n'ont pas développé de tumeur et qu'une seule tumeur se développe fortement. Par ailleurs, les résultats montrent une augmentation non significative de la survie dans le groupe traité par l'OPG comparativement aux animaux ayant reçu le plasmide vide (Figure 57 B).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet exercé par l'OPG sur les lésions ostéolytiques associées au développement de la tumeur (Figure 58).

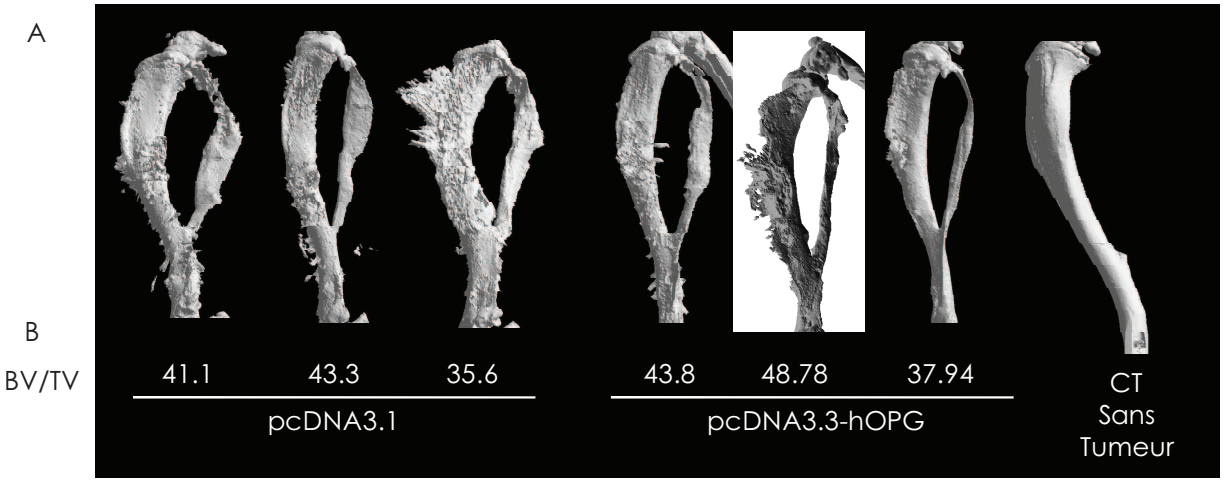


Figure 58 : Etude des paramètres de la microarchitecture osseuse par analyse micro-scanner. Reconstruction par micro-scanner de l'architecture osseuse des tibias (A) et volumes osseux rapportés au volume total trabéculaire (BV/TV, %) pour les souris des groupes pcDNA3.1 et pcDNA3.3-hOPG (B).

La reconstruction osseuse par micro-scanner permet de constater la présence de lésions de type ostéolytique ainsi que d'un remodelage osseux anarchique sur les tibias des souris des 2 groupes pcDNA3.3-hOPG et pcDNA3.1 comparativement au tibia d'une souris naïve (CT sans tumeur). Même si les valeurs de volume osseux spécifique rapporté au volume total trabéculaire (BV/TV) ont tendance à être plus élevées dans le groupe OPG avec une moyenne 43,5 ± 5,4 contre 40 ± 4 pour le groupe pcDNA3.1, la différence n'est pas significative. Cette absence d'effet significatif ne corrèle pas les effets anti-ostéolytiques marqués obtenus sur l'ostéosarcome en réponse au même traitement. Pour tenter de comprendre cette absence d'effets significatifs, la concentration d'OPG a été évaluée par dosage ELISA sur des lysats de fragments tumoraux pour valider l'augmentation de sa concentration dans l'environnement tumoral (Figure 59).

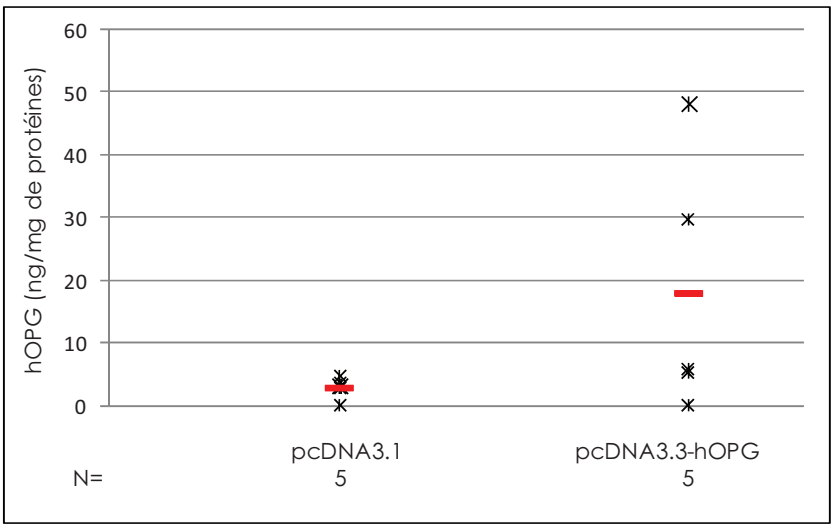


Figure 59 : Dosages de l'OPG humaine par test ELISA. Le dosage a été réalisé sur des fragments de tumeurs induites par transplantation d'un fragment de tumeur TC-71, traitées par pcDNA3.1 ou pcDNA3.3-hOPG et normalisé en fonction de la quantité de protéines présentes (N = nombre d'échantillons tumoraux testés).

Une concentration moyenne d'OPG humaine de 17,8 ng/mg de protéine a été mesurée dans les fragments issus de souris ayant reçu le plasmide pcDNA3.3-hOPG contre 2,9 ng/mg de protéines pour les fragments issus de souris ayant reçu le plasmide pcDNA3.1 (Figure 60). Ceci permet de valider la surexpression de l'OPG dans la tumeur. Cependant, l'effet exercé par l'OPG sur l'évolution tumorale et les lésions osseuses reste non significatif. Il aurait été intéressant de réaliser un dosage ELISA pour estimer la concentration de RANKL dans les lysats tumoraux comparativement à celle de l'OPG. Ainsi, cette absence d'effet significatif de l'OPG pourrait s'expliquer par une production insuffisante de la protéine en comparaison de la concentration de RANKL présente dans l'environnement tumoral. Partant de cette hypothèse et afin d'obtenir un effet plus

significatif de l'OPG, nous avons choisi de l'administrer par électrotransfert. En effet, cette technique permet théoriquement d'obtenir une production de protéine plus importante et pendant une durée plus longue.

Dans un premier temps, afin de comparer la production d'OPG humaine obtenue par électrotransfert à celle obtenue avec le Lutrol, 8 souris ont reçu 50 µg de plasmide pVAX2-hOPG puis un électrostransfert a été réalisé. Le sérum des souris a été prélevé 7 jours et 35 jours plus tard. Les taux d'OPG humaine ont été dosés par test ELISA et comparés aux taux obtenus dans le sérum des souris ayant reçu l'injection du complexe F68 / pcDNA3.3-hOPG 7 jours après cette injection (Figure 60).

A J7, l'expression moyenne de l'OPG humaine dans le sérum des souris ayant reçu l'injection du complexe F68 / pcDNA3.3-hOPG est de 29,2 ng/ml contre 771,8 ng/ml dans le sérum des souris ayant subit l'électrotransfert associé à l'injection du plasmide pVAX2-hOPG. La production moyenne d'OPG humaine induite par électrotransfert est donc en moyenne plus de 25 fois supérieure à celle obtenue grâce au vecteur synthétique F68. En revanche, l'OPG humaine n'a pas pu être détectée dans le sérum des souris ayant reçu les plasmsides vides pCDNA3.1 et pVAX2. Si après 14 jours, l'expression de l'OPG n'est plus détectable dans le sérum des souris ayant reçu l'injection du complexe F68 / hOPG, elle est toujours élevée 35 jours après électrotransfert, avec une valeur moyenne à 148,2 ng/ml pour les souris ayant reçu le plasmide pVAX2-hOPG (Figure 61).

L'électrotransfert induit donc une production d'OPG humaine beaucoup plus importante que celle obtenue avec le vecteur synthétique F68 (Lutrol®). Par ailleurs, cette production se maintient dans le temps pour une durée supérieure à 35 jours. Un seul électrotransfert, 7 jours avant l'induction de la tumeur, permet donc de maintenir une production dépassant celle du F68 pour la durée complète de l'expérimentation.

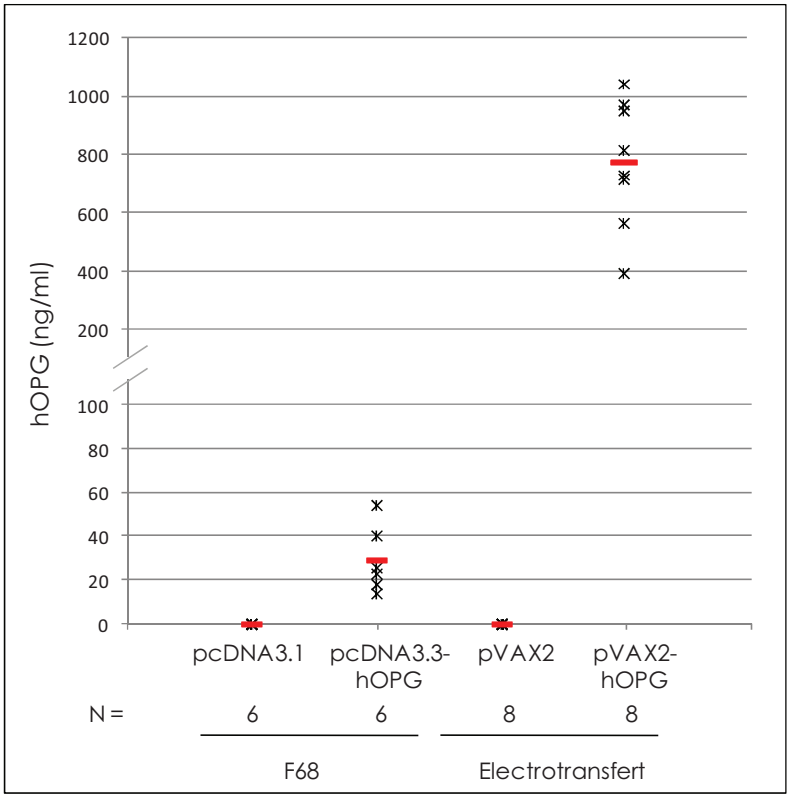


Figure 60 : Comparaison de l'efficacité du transfert de gène avec le vecteur synthétique F68 et l'électrotransfert. Comparaison du dosage de l'OPG humaine par ELISA dans le sérum des souris ayant reçu 50 µg des plasmides pcDNA3.1 et pcDNA3.3-hOPG associés au vecteur synthétique F68 (Lutrol®) et dans le sérum des souris ayant reçu 50 µg des plasmides pVAX2 et pVAX2-hOPG par électrotransfert. Ce dosage a été réalisé 7 jours après le transfert de gène (N = nombre d'échantillons sanguins testés).

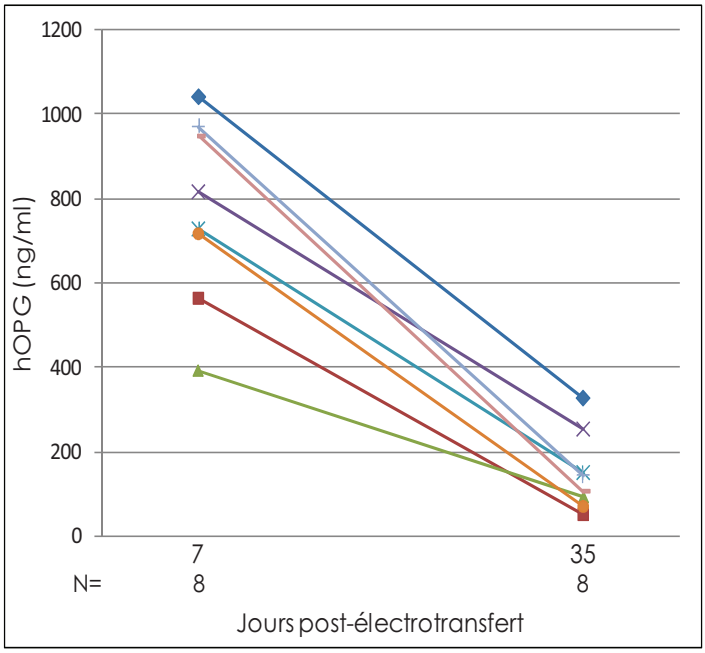


Figure 61 : Dosage de l'OPG humaine dans le sérum des souris ayant reçu les plasmides pVAX2 et pVAX2-hOPG. Les prélèvements ont été réalisés 7 jours et 35 après l'électrotransfert (N = nombre d'échantillons sanguins testés).

Ainsi, cette absence d'effet significatif de l'OPG pourrait s'expliquer par une production insuffisante de la protéine en comparaison de la concentration de RANKL présente dans l'environnement tumoral. Partant de cette hypothèse et afin d'obtenir un effet plus significatif de l'OPG, nous avons choisi de l'administrer par électrotransfert. En effet, cette technique permet théoriquement d'obtenir une production de protéine plus importante et pendant une durée plus longue.

Dans un premier temps, afin de comparer la production d'OPG humaine obtenue par électrotransfert à celle obtenue avec le Lutrol, 8 souris ont reçu 50 µg de plasmide pVAX2-hOPG puis un életrostransfert a été réalisé. Le sérum des souris a été prélevé 7 jours et 35 jours plus tard. Les taux d'OPG humaine ont été dosés par test ELISA et comparés au taux obtenus dans le sérum des souris ayant reçu l'injection du complexe F68 / pcDNA3.3-hOPG 7 jours après cette injection (Figure 60).

A J7, l'expression moyenne de l'OPG humaine dans le sérum des souris ayant reçu l'injection du complexe F68 / pcDNA3.3-hOPG est de 29,2 ng/ml contre 771,8 ng/ml dans le sérum des souris ayant subit l'électrotransfert associé à l'injection du plasmide pVAX2-hOPG. La production moyenne d'OPG humaine induite par électrotransfert est donc en moyenne plus de 25 fois supérieure à celle obtenue grâce au vecteur synthétique F68. En revanche, l'OPG humaine n'a pas pu être détectée dans le sérum des souris ayant reçu les plasmides vides pCDNA3.1 et pVAX2. Si après 14 jours, l'expression de l'OPG n'est plus détectable dans le sérum des souris ayant reçu l'injection du complexe F68 / hOPG, elle est toujours élevée, 35 jours après électrotransfert, avec une valeur moyenne à 148,2 ng/ml pour les souris ayant reçu le plasmide pVAX2-hOPG (Figure 61).

L'électrotransfert induit donc une production d'OPG humaine beaucoup plus importante que celle obtenue avec le vecteur synthétique F68 (Lutrol®). Par ailleurs, cette production se maintient dans le temps pour une durée supérieure à 35 jours. Un seul électrotransfert, 7 jours avant l'induction de la tumeur, permet donc de maintenir une production dépassant celle du F68 pour la durée complète de l'expérimentation.

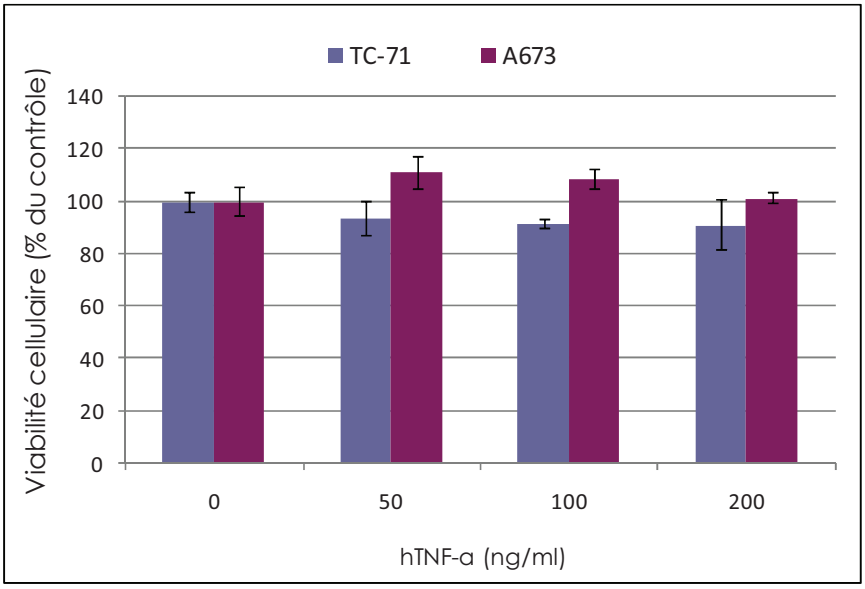


Figure 62 : Effets du TNF-a sur la viabilité des lignées de sarcome d'Ewing A673 et TC-71. Après 72h de traitement par 50, 100 et 200 ng/ml de TNF-a humain, la viabilité cellulaire a été analysée par test XTT.

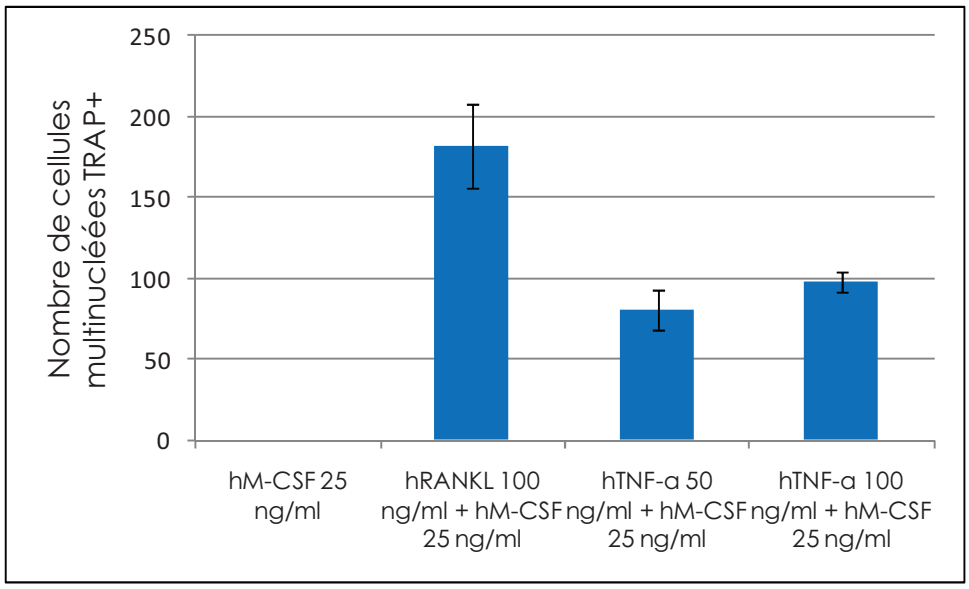


Figure 63 : Effets du TNF-a sur la différenciation ostéoclasitque des précurseus CD14+. Après 10 jours de traitement en plaque 96 puits par 25 ng/ml de hMCSF associé à 100 ng/ml de hRANKL ou à 50 et 100 ng/ml de hTNF-a, les cellules ont été fixées puis une coloration TRAP a été réalisée. Les cellules multinucléées positives pour la coloration TRAP ont ensuite été comptées.

b) Stratégie anti-TNF-a

La deuxième stratégie envisagée repose sur l'inhibition du TNF-a humain. Pour nous assurer d'une absence d'effet direct de cette stratégie sur les cellules tumorales, nous avons tout d'abord testé l'effet du TNF-a *in vitro* sur les deux lignées cellulaire de sarcome d'Ewing utilisées *in vivo*, A673 et TC-71. Les cellules ont été traitées durant 72h avec des doses croissantes de TNF-a humain (50 à 200 ng/ml). L'effet du TNF-a sur la prolifération cellulaire a été analysé par test XTT (Figure 62).

Sur les deux lignées étudiées, après 72h de traitement et quelque soit la concentration de TNF-a utilisée, aucun effet significatif n'a pu être observé sur la viabilité cellulaire.

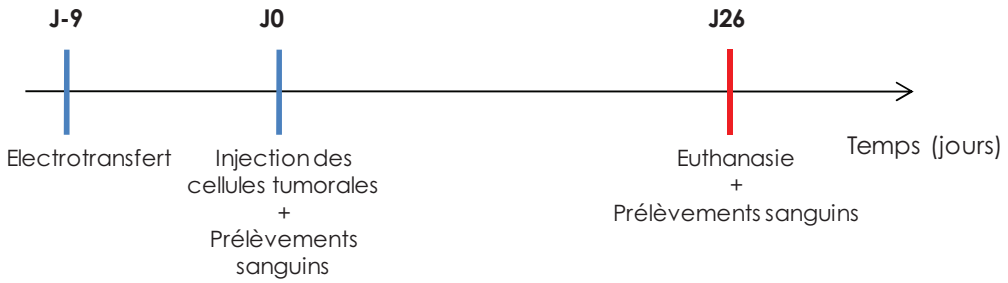
Nous avons ensuite voulu vérifier la capacité du TNF-a humain à induire la différenciation ostéoclastique des précurseurs monocytaires CD14+ extraits de sang humain. Pour cela, les cellules CD14+ ont été traitées par des doses croissantes de TNF-a humain (50 et 100 ng/ml), en présence de M-CSF humain (25 ng/ml) puis les cellules multinucléées ont été révélées à l'aide d'une coloration TRAP (Figure 63).

Nous pouvons constater que hRANKL (100 ng/ml), associé à 25 ng/ml de hM-CSF, induit une formation moyenne d'environ 182 cellules multinucléées positives pour le marquage TRAP par puits (31 cm^2), contre 80 et 100 respectivement pour 50 et 100 ng/ml de hTNF-a associé à 25 ng/ml de hM-CSF. En revanche, aucune cellule multinucléée TRAP positive n'a pu être observée dans les puits contrôles n'ayant reçu que 25 ng/ml de hM-CSF. Il semble ainsi que le TNF-a humain soit capable d'induire la différenciation des précurseurs ostéoclastiques mais d'une façon moins efficace que 100 ng/ml de RANKL humain.

L'effet thérapeutique du récepteur soluble du TNF-a humain, TNF-R1, administré par électrotransfert a été évalué dans un modèle de sarcome d'Ewing induit par l'injection de cellules humaines A673 en site intramusculaire. L'électrotransfert a été réalisé 9 jours (j-9) avant l'injection de 2 millions de cellules tumorales A673 en site paratibial (Figure 64 A). En effet, 9 jours est le temps nécessaire pour atteindre le pic de production de la protéine par les cellules musculaires. Deux groupes de 8 souris ont été constitués, le premier groupe recevant le plasmide pVAX2-hTNF-R1 et le second, le plasmide vide pVAX2. Des expériences préliminaires ont permis de confirmer l'absence d'effet du plasmide vide et de l'électrotransfert seul sur le développement tumoral. La production du TNF-R1 a été déterminée par dosage ELISA dans le sérum des souris ayant reçu l'électrotransfert.

Des prélèvements de sang dans le sinus rétro-orbitaire ont été effectués les jours de l'injection des cellules tumorales (J0) et de l'euthanasie (J26) (Figure 64 B). Cette expérience a été réalisée à 2 reprises et a donné des résultats similaires.

A



B

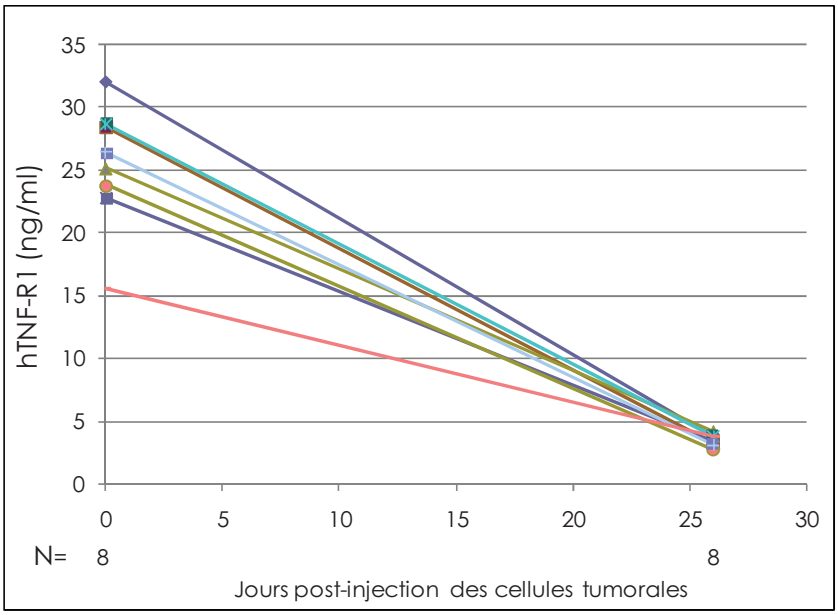


Figure 64 : Mesure de la production de TNF-R1 dans le sérum des souris ayant reçu le plasmide pVAX2-hTNF-R1 par électrotransfert. Le sang a été prélevé dans le sinus retro-orbitaire le jour de l'injection des cellules tumorales et 26 jours après, jour de l'euthanasie, puis la production de TNF-R1 a été estimée par dosage ELISA (N = nombre d'échantillons sanguins testés).

A J0 (9 jours après électrotransfert), une expression du TNF-R1 s'élevant de 15,6 à 32,3 ng/ml de sérum a pu être mesurée dans le sérum des souris ayant reçu le plasmide pVAX2-hTNF-R1, avec une moyenne de 25,3 ng/ml (Figure 64 B). A J26, (35 jours après électrotransfert), l'expression du TNF-a n'atteint plus que 3,5 ng/ml de sérum mais reste détectable chez toutes les souris. En revanche, aucune expression n'a été détectée dans le sérum des souris ayant reçu le plasmide vide pVAX2, que ce soit 9 ou 35 jours après l'électrotransfert. La production du TNF-R1 au pic de production (J9) est

cependant bien inférieure à celle obtenue au pic de production lors de l'électrotranfert avec l'OPG humaine (771,8 ng/ml en moyenne), ceci pourrait s'expliquer par la différence de taille entre les deux protéines produites ou leur stabilité dans la circulation sanguine.

Les effets de ce traitement ont ensuite été évalués en termes d'incidence et de développement tumoral ainsi qu'en termes de survie des animaux. Le volume tumoral des souris a été calculé tous les deux jours à partir des mesures des 2 axes perpendiculaires de la tumeur.

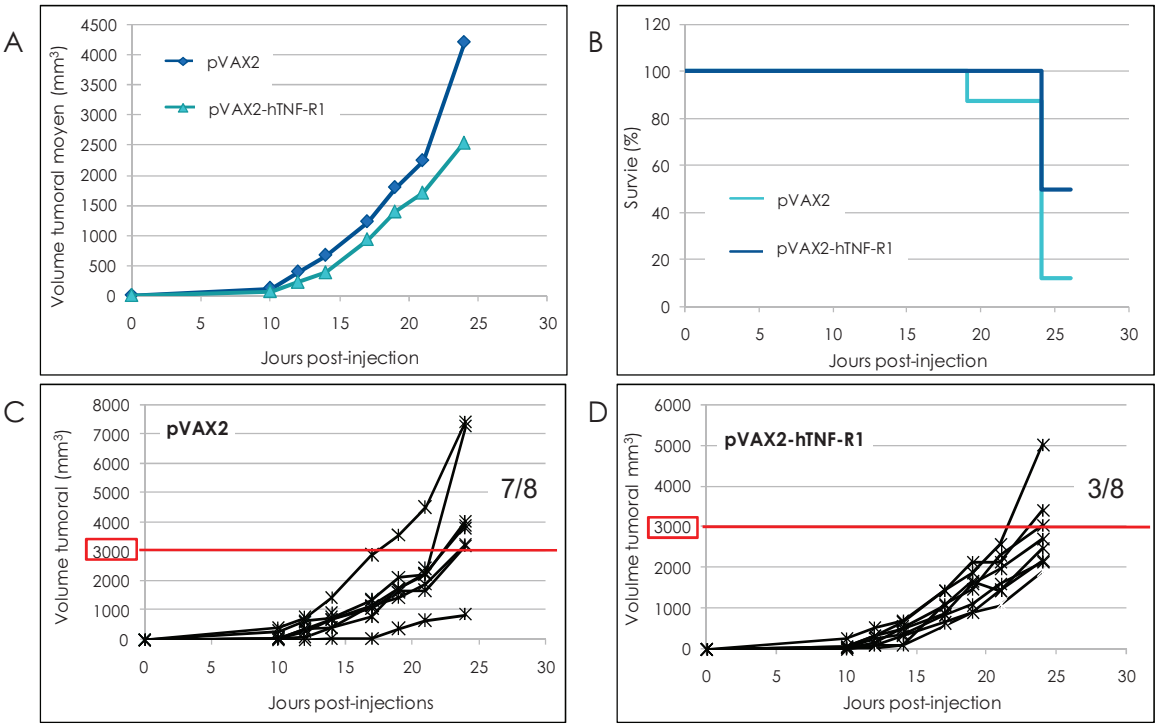
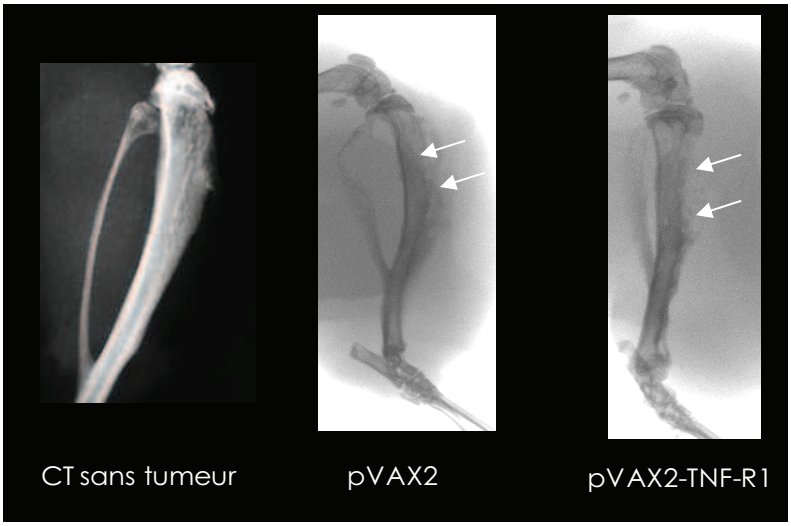


Figure 65 : Evolution des volumes tumoraux et de la survie en fonction du temps post-injection. Les tumeurs sont induites par injection de 2 millions de cellules de sarcome d'Ewing A673 en site intramusculaire au niveau du tibia. Evolution du volume tumoral moyen (A) ; évolution de la survie des animaux (B) ; évolution du volume tumoral par individu dans le groupe ayant été traité par le plasmide pVAX2 (C) ; évolution du volume tumoral par individu dans le groupe ayant été traité par le plasmide pVAX2-hTNF-R1 (D).

Nous pouvons constater une diminution non significative du volume tumoral moyen 24 jours après injection chez les souris traitées par le plasmide pVAX2-hTNFR1 comparativement au groupe ayant été traité par le plasmide vide pVAX2. En effet, le volume tumoral moyen à J24 est de 2543 mm^3 pour les souris du groupe pVAX2-hTNF-R1 contre 4210 mm^3 pour les souris du groupe pVAX2 (Figure 65 A). Une réduction non significative de l'incidence tumorale a été également observée à J26 dans le groupe ayant été traité par le plasmide pVAX2-hTNF-R1 avec seulement 3 souris sur 8 dépassant un volume tumoral de 3000 mm^3 (Figure 65 D) contre 7 sur 8 dans le groupe pVAX2

(Figure 65 C). En conséquence, les résultats montrent une augmentation non significative de la survie des animaux à J26 dans le groupe traité par le plasmide pVAX2-hTNFR1 comparativement au groupe traité par plasmide vide (Figure 65 B).



<u>Figure 66 :</u> Clichés radiographiques des tibias des souris traitées par le plasmide pVAX2-hTNFR1 et par le plasmide vide (pVAX2) comparativement à des souris contrôles naïves (CT sans tumeur).

L'analyse des clichés radiographiques réalisée après euthanasie des animaux n'a pas permis de constater de différence en termes de lésions ostéolytiques entre les souris ayant reçu le plasmide pVAX2-hTNFR1 comparativement aux souris ayant reçu le plasmide pVAX2 (Figure 66).

IV. Discussion-perspectives

Comme cela a été montré dans le cas du développement de métastases osseuses, la problématique biologique des ostéosarcomes repose sur l'existence d'un cercle vicieux entre prolifération tumorale et résorption osseuse. Les facteurs de croissances stockés dans la matrice osseuse (tels que IGF, TGF-β, BMP, PDGF et VEGF) et libérés au cours de l'ostéolyse stimulent en retour la croissance de la tumeur en site osseux. Ainsi, l'inhibition de la résorption osseuse représente une des stratégies adjuvantes les plus intéressantes pour le traitement des tumeurs osseuses primitives. RANKL, facteur clé de la différenciation, de l'activation et de la survie des ostéoclastes par son interaction avec son récepteur RANK, est largement impliqué dans la régulation du remodelage osseux. Au laboratoire, l'inhibition de RANKL a déjà été étudiée dans le cadre de l'ostéosarcome. Ainsi, dans le modèle murin d'ostéosarcome POS-1, nous avons montré que l'administration d'OPG par transfert de gène non viral est capable d'induire une inhibition significative du développement tumoral et des lésions ostéolytiques associées ainsi qu'une augmentation la survie des animaux traités [45]. Cette action sur le développement tumoral est indirecte et passe par l'inhibition de RANKL puisqu'aucun effet de l'OPG sur la viabilité des cellules tumorales POS-1 n'a pu être détecté *in vitro*. Par ailleurs, RANKL serait aussi impliqué dans la migration des cellules tumorales en site osseux. Il représenterait ainsi un facteur déclencheur de la migration des cellules tumorales et son inhibition par l'OPG pourrait alors réduire le développement de métastases osseuses [330][276]. Par ailleurs, l'intérêt thérapeutique de l'inhibition de la résorption osseuse grâce à l'utilisation de l'acide zolédronique a déjà été montré au sein du laboratoire dans le sarcome d'Ewing [86]. Ainsi, quand le sarcome d'Ewing se développe en site osseux, l'administration d'acide zolédronique est capable d'inhiber l'ostéolyse associée au développement tumoral et de réduire significativement le développement et l'incidence tumorale. Cependant, l'acide zolédronique exerce aussi un effet antitumoral direct et ses effets *in vivo* sont très probablement la résultante de cet effet antitumoral et de son activité anti-résoptive.

Afin d'évaluer l'effet direct d'une inhibition de la résorption osseuse sur le développement du sarcome d'Ewing, nous avons voulu transposer les résultats obtenus sur l'ostéosarcome avec l'inhibition de RANKL. Le sarcome d'Ewing est une pathologie très ostéolytique et nous avons montré par immunohistofluorescence la présence de RANKL humain dans l'environnement tumoral des modèles précliniques testés. La forme humaine de RANKL est donc produite directement par les cellules tumorales. Cette cytokine nous a donc semblé être une cible intéressante pour bloquer le cercle vicieux qui s'établit entre prolifération tumorale et résorption osseuse. En clinique, le moyen

privilégié pour bloquer la liaison RANKL/RANK est l'utilisation du Dénosumab® (AMG162), un anticorps monoclonal humanisé qui a déjà montré une grande efficacité dans la prévention des lésions ostéolytiques associées au développement du myélome multiple ou de métastases osseuses secondaires à un carcinome mammaire ou prostatique [331][332]. Cependant, le Dénosumab a été généré par immunisation de souris avec la forme complète de la protéine humaine RANKL et en conséquence, cet anticorps ne reconnait pas la forme murine de la protéine. Pour cette raison, le développement d'études précliniques a été limité à une unique étude réalisée sur le singe cynomolgus [333]. Afin de tester les effets de l'inhibition de RANKL dans le sarcome d'Ewing, nous avons reproduit les expérimentations réalisées dans le cadre de l'ostéosarcome, en testant l'effet thérapeutique de l'OPG humaine, administrée par transfert de gène grâce au vecteur synthétique F68, dans le modèle préclinique TC-71 induit par transplantation d'un fragment de tumeur d'Ewing. Une inhibition non significative du développement tumoral et des lésions ostéolytiques a pu être observée en réponse à ce traitement. Cependant, l'effet de l'OPG observé dans ce contexte est bien inférieur à celui obtenu dans les précédentes études sur l'ostéosarcome. Une des hypothèses avancées pourrait être liée à une quantité d'OPG produite insuffisante pour inhiber la totalité de RANK présent dans l'environnement tumoral osseux. En effet, le remodelage osseux associé au développement de la tumeur d'Ewing est très intense et une quantité de RANKL importante a pu être détectée par immunofluorescence. Ainsi, il est possible que la concentration de RANKL dans l'environnement tumoral soit plus importante dans le sarcome d'Ewing que dans l'ostéosarcome. D'autre part, l'absence d'effets significatifs de l'OPG pourrait s'expliquer par la présence de TRAIL dans nos différents modèles xénogéniques de tumeurs d'Ewing. Sa présence a été révélée par dosage ELISA dans des lysats protéiques dans toutes les tumeurs testées avec une concentration moyenne de 6 pg/mg de protéines pour les tumeurs induite par l'injection de cellules TC-71 par voie intramusculaire (Figure 67). Ainsi, l'OPG est capable d'inhiber l'apoptose des cellules tumorales induites par TRAIL, ce qui en fait un agent potentiellement pro-tumoral [288]. Comme nous l'avons précédemment observé, la tumeur TC-71 est sensible à TRAIL et son administration par transfert de gène non viral induit une réduction du développement tumoral [334].

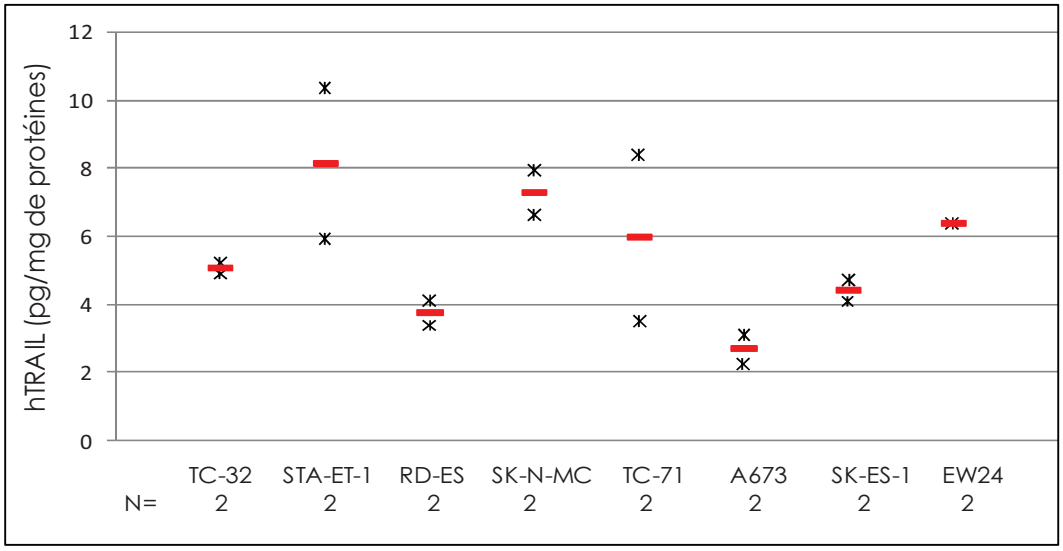


Figure 67 : Dosages de TRAIL humain par test ELISA. Les dosages ont été réalisés sur des lysats protéiques de fragments de tumeurs induites par injection intramusculaire de cellules de sarcome d'Ewing et normalisés en fonction de la quantité de protéines présentes (N = nombre d'échantillons tumoraux testés).

Ainsi, dans la tumeur TC-71, l'OPG pourrait promouvoir le développement tumoral parallèlement à une action anti-résorptive. Cependant, une quantité importante de RANKL a été détectée dans la tumeur et l'affinité de l'OPG pour RANKL (23 nM à 37°C) est deux fois supérieure à celle pour TRAIL (46 nM à 37°C). L'OPG doit donc exercer une inhibition plus importante sur l'activité de RANKL que sur celle de TRAIL [335] (Figure 68).

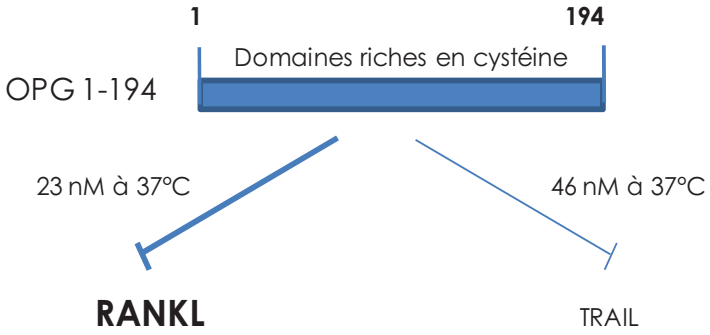


Figure 68 : Comparaison de l'affinité de l'OPG pour RANKL et TRAIL.

Ainsi, l'absence d'effet thérapeutique significatif exercé par l'OPG n'est probablement pas la résultante de l'inhibition de l'activité anti-tumorale de TRAIL. De plus, en raison de l'utilisation de la forme tronquée de l'OPG (1-194), l'absence d'effet thérapeutique ne peut être attribuée à la modulation de son activité biologique par les

protéoglycanes présents dans la matrice extracellulaire de l'environnement tumoral. En effet, cette forme tronquée est délétée pour le domaine de liaison à l'héparine impliqué dans cette modulation [305].

Pour accroitre la production d'OPG, nous avons utilisé une autre méthode de transfert de gène non viral, l'électrotransfert. Ainsi, l'électrotransfert permet, après une unique injection d'ADN, d'obtenir une forte production de la protéine d'intérêt pendant une durée de plus d'un mois, comparativement à environ une semaine avec le Lutrol. Afin d'obtenir une quantité suffisante de protéine pour toute la durée de l'expérimentation (environ 5 semaines), 1 seul électrotransfert est donc nécessaire à la place de 5 injections du complexe ADN/lutrol. Par ailleurs, la production obtenue grâce à l'électrotransfert est nettement supérieure à celle mesurée avec les vecteurs synthétiques.

Cependant, la dualité d'effet de l'OPG limite largement son utilisation clinique potentielle dans des pathologies d'origine tumorale. Pour palier les problèmes liés à l'inhibition de TRAIL, il serait intéressant de tester les effets thérapeutiques de RANK-Fc dans le sarcome d'Ewing. RANF-Fc correspond à la fusion du domaine extracellulaire de RANK avec une immunoglobuline G1 humaine et possède un double avantage par rapport à l'utilisation de l'OPG. Il possède d'une part une plus grande spécificité pour RANKL par rapport à l'OPG [336] et d'autre part, il n'a pas la capacité de lier TRAIL. L'intérêt thérapeutique de RANK-Fc a précédemment été démontré dans l'Ostéosarcome. Administré par transfert de gène non viral grâce au vecteur synthétique F68, RANK-Fc s'est montré capable de réduire significativement l'incidence, le développement tumoral et l'apparition de lésions ostéolytiques dans le modèle d'ostéosarcome POS-1. Des résultats similaires ont été obtenus au sein du laboratoire grâce à l'utilisation d'un vecteur adénoviral codant RANK-Fc dans un modèle d'ostéosarcome de rat ostéocondensant [337][338]. Ces effets anti-tumoraux de RANK-Fc, tout comme ceux de l'OPG sont indirects et passent par l'inhibition du cercle vicieux puisqu'aucun effet direct de RANK-Fc n'a pu être observé sur la prolifération tumorale *in vitro*. Le clonage de la forme humaine de RANK-Fc dans le vecteur pVAX2 (plus adapté pour l'électrotransfert) est actuellement en cours afin de pallier d'éventuels problèmes liés à la différence d'espèce dans le sarcome d'Ewing (collaboration avec Pascal Bigey et Virginie Escriou, UPCGI, Paris).

Selon la littérature, un autre mécanisme serait responsable, du moins en partie, de l'ostéolyse associée au développement du sarcome d'Ewing. En effet, les macrophages circulants isolés à partir de tumeurs d'Ewing sont capables de se différencier en ostéoclastes fonctionnels en présence de M-CSF et TNF-a [271]. Nous avons confirmé par des études *in vitro* la capacité du TNF-a à induire la différenciation

des monocytes issus de sang humain en ostéoclastes et montré par test ELISA et immunohistoflurescence, la présence de TNF-a et M-CSF dans la tumeur. Par ailleurs, la présence de macrophages et d'une quantité importante de TNF-a a été mise en évidence par immunohistoflurescence dans la tumeur induite par injection intramusculaire de cellules A673. Ces macrophages infiltrant la tumeur seraient, selon la littérature, capables de se différencier en ostéoclastes et de participer au développement de lésions ostéolytiques associées au développement du sarcome d'Ewing. En conséquence, l'inhibition du TNF-a représente une stratégie thérapeutique prometteuse pour bloquer le cercle vicieux qui s'établit entre prolifération tumorale et résorption osseuse et donc inhiber la croissance du sarcome d'Ewing. Cependant, le TNF-a représente un agent anti-tumoral actuellement testé en essai clinique dans des pathologies tumorales telles que le mélanome, l'adenocarcinome du pancréas ou encore dans des cancers colorectaux [339]. Son inhibition pourrait donc, outre son effet anti-résorptif, avoir un effet protumoral dans certaines tumeurs. Néanmoins, il a été montré que les tumeurs d'Ewing sont résistantes à l'apoptose induite par le TNF-a [326][327]. De plus, nous avons montré qu'un traitement par le TNF-a sur les lignées de sarcome d'Ewing TC-71 et A673 n'induit pas de variation significative de la viabilité cellulaire *in vitro* et n'exerce donc pas d'effet antitumoral.

Nous avons choisi de tester les effets de l'inhibition du TNF-a par l'administration du récepteur soluble TNF-R1 dans le sarcome d'Ewing. Le TNF-R-1 soluble va agir comme un antagoniste compétitif et inhiber la fixation du TNF-a sur ses récepteurs membranaires. L'effet thérapeutique de l'administration par électrotransfert du TNF-R1 a été évalué sur le développement de la tumeur A673 induite par injection intramusculaire des cellules correspondantes. La production de TNF-R1 induite par électrotransfert a été mesurée dans le sérum des souris par dosage ELISA au pic de production et s'est révélée être inférieure à celle obtenue pour l'OPG administré par la même technique. Cette différence de production pourrait s'expliquer par les différences de structure entre les deux protéines mais les mécanismes mis en jeu ne sont pas complètement élucidés. Ainsi, ils peuvent dépendre de la production et de la sécrétion de la protéine par les fibres musculaires ou encore de sa stabilité dans le sérum. En réponse à la production de TNF-R1, une diminution non significative du développement tumoral a pu être observée comparativement au groupe ayant reçu le plasmide vide pVAX2. Cet effet limité sur le développement tumoral pourrait s'expliquer par une production de TNF-R1 insuffisante comparativement à la quantité importante de TNF-a humain produite dans la tumeur d'Ewing révélée par immunohistofluorescence. D'après notre hypothèse, cette inhibition du développement tumoral serait liée à l'inhibition de la différenciation des macrophages infiltrant la tumeur en ostéoclastes fonctionnels.

Cependant, l'absence d'effet significatif observé sur les lésions ostéolytiques pose la question du mode d'action du TNF-R1. Ainsi, le TNF-a est largement impliqué dans les processus inflammatoires. D'après la littérature, TNF-a exerce un rôle protumoral majeur dans différents modèles tumoraux tels que le carcinome de la peau, colorectal ou dans des tumeurs du pancréas et son inhibition est capable d'induire un effet antitumoral significatif [340][341][342]. Les mecanismes d'actions protumoraux du TNF-a ne sont pas encore clairement élucidés mais seraient majoritairement dépendants du récepteur TNF-R1. La production de TNF-a par les cellules de l'hôte ou par les cellules tumorales elles-mêmes pourrait induire différents processus protumoraux tels que l'angiogenèse par le recrutement des monocytes [343], une défaillance de la surveillance immunitaire par la suppression des lymphocytes T [344] (ce qui ne concerne pas notre modèle induit chez la souris Nude athymique) ou une inhibition de la cytotoxicité des macrophages activés [345]. Ainsi, il est possible que l'inhibition du développement tumoral observée en réponse à l'administration du TNF-R1 ne soit pas dépendante du blocage du cercle vicieux mais liée à l'inhibition des effets du TNF-a sur l'inflammation. Pour comprendre l'implication de l'effet potentiel du TNF-R1 sur l'inflammation, il serait intéressant de comparer la présence de macrophages et d'autres acteurs de l'inflammation dans les tumeurs traitées ou non par le TNF-R1. Quelque soit l'origine de l'effet antitumoral observé, il serait intéressant d'optimiser l'électrotransfert afin d'augmenter la production du TNF-R1 pour accroitre cet effet.

Cependant, une stratégie anti-TNF-a ne pourra certainement pas être envisagée dans un contexte tumoral chez les patients en raison de son activité pro-apoptotique rapporté dans d'autres types de tumeurs. En effet, nous n'avons pas observé d'inhibition de prolifération *in vitro* en réponse au TNF-a dans nos lignées de sarcome d'Ewing testées mais chaque tumeur se comporte différemment. Ainsi, il est possible que chez certaines tumeurs d'Ewing, TNF-a soit capable d'induire un effet pro-apoptotique sur les cellules tumorales. De plus, toutes les lignées testées *in vitro* dans le laboratoire ou rapportées dans la littérature possèdent la translocation EWS-FLI1 et il serait intéressant de regarder les effets du TNF-a sur des lignées présentant d'autres translocations caractéristiques du sarcome d'Ewing (entre le gène EWS et un autre gène de la famille ETS). Par ailleurs, outre ses effets antitumoraux potentiels sur le sarcome d'Ewing, l'utilisation à long terme d'une stratégie anti-TNF-a reste utopique car elle pourrait induire l'apparition d'effets secondaires néfastes tels que l'apparition de lymphomes ou d'autres cancers [328][329]. La dualité des effets du TNF-a dans un contexte tumoral pose donc la question de la résultante protumorale et antitumorale de son inhibition et du rapport bénéfice / risque qu'elle pourrait induire (Figure 69).

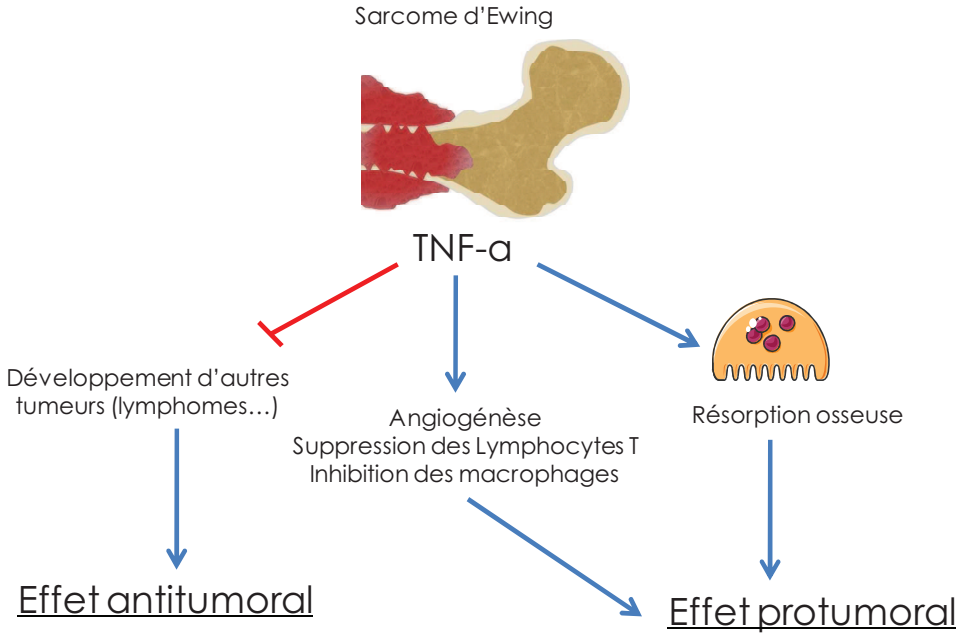


Figure 69 : Les effets protumoraux et antitumoraux potentiels du TNF-a dans le contexte du sarcome d'Ewing.

Une autre stratégie possible pour inhiber la résorption osseuse et ainsi bloquer le cercle vicieux serait d'inhiber l'activité du M-CSF. En effet, cette cytokine est impliquée dans l'ostéoclastogénèse dépendante à la fois du TNF-a et de RANKL. Une stratégie anti-MCSF permettrait donc un blocage en parallèle de ces 2 voies. Par ailleurs, d'après la littérature, l'inhibition de M-CSF est une voie prometteuse dans le traitement des lésions osseuses associées à des métastases de myélome et de leucémie myéloïde et a même montré des effets comparables à ceux de l'acide zolédronique en termes de protection osseuse dans des modèles précliniques [319][321]. La stratégie que nous avons choisie d'adopter pour tester l'inhibition du M-CSF dans des modèles précliniques de sarcome d'Ewing repose sur l'administration par électrotransfert de son récepteur soluble c-fms humain qui va agir comme un antagoniste compétitif. Le clonage du récepteur est actuellement en cours (collaboration avec Virginie Escriou et Pascal Bigey, UPCGI, Paris). D'après nos résultats et les très fortes lésions ostéolytiques observées lors du développement de sarcome d'Ewing, il semble probable que l'inhibition d'une seule des 2 voies de l'ostéoclastogenèse démontrées active dans le sarcome d'Ewing (dépendante de RANKL ou de TNF-a) ne soit pas suffisante pour bloquer complètement le cercle vicieux qui s'établit entre la prolifération tumorale et la résorption osseuse.

Il serait donc intéressant de tester les effets d'une stratégie combinant l'inhibition simultanée de ces 2 voies d'ostéoclastogenèse. Les plasmides codant les formes solubles de RANK, M-CSF et TNF-a pourront être administrés par électrotransfert en parallèle afin de tester leur effet combiné, testé dans des modèles précliniques induits chez la souris Nude (Figure 70).

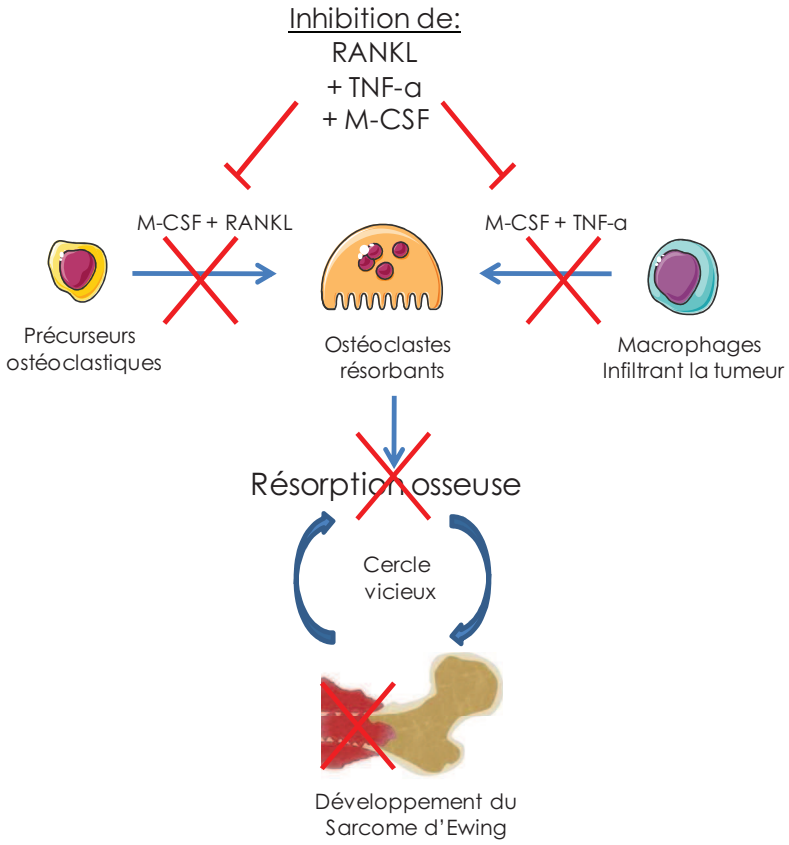


Figure 70 : Stratégie combinatoire dans le sarcome d'Ewing. L'administration concomitante des récepteurs solubles de RANKL, M-CSF et TNF-a permettrait une inhibition combinée des 2 voies de l'ostéoclastogenèse dépendantes du TNF-a et de RANKL et donc une inhibition de la résorption osseuse et du cercle vicieux.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le sarcome d'Ewing est la deuxième tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente après l'ostéosarcome. Durant ces 30 dernières années, l'avènement des chimiothérapies modernes et l'apparition de nouvelles techniques chirurgicales ont permis une réelle amélioration de la survie des patients présentant des sarcomes d'Ewing localisés à un site unique. Cependant, environ 15 % des patients présentent des métastases au moment du diagnostic et le pronostic vital pour ces patients ainsi que pour ceux dont la maladie persiste au traitement initial reste très réservé. Il existe donc une réelle nécessité de mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques pour la prise en charge de ces groupes de patients qui demeurent à haut risque. Le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans le développement tumoral et le devenir des cellules tumorales. Une meilleure connaissance des éléments qui composent ce microenvironnement tumoral apparaît donc indispensable pour améliorer l'efficacité des traitements et devient une cible thérapeutique à part entière.

Des études réalisées au sein du laboratoire ont permis de mettre en évidence l'existence d'un cercle vicieux entre la prolifération tumorale et la résorption osseuse lors du développement de l'ostéosarcome en site osseux. D'après ces travaux, il existe deux stratégies possibles pour inhiber la prolifération de l'ostéosarcome. La première est de cibler directement les cellules tumorales et la seconde de cibler la résorption osseuse pour prévenir la libération des facteurs de croissance emprisonnés dans la matrice osseuse. Ces études ont aussi montré qu'une inhibition de la résorption osseuse à l'aide de l'OPG ou de RANK-Fc, molécules anti-résorptives ciblant le principal acteur de l'ostéoclastogenèse RANKL, permettait une réduction significative de l'incidence et du développement tumoral. Un des objectifs de cette thèse a été de transposer au sarcome d'Ewing les résultats prometteurs obtenus dans le cadre de l'ostéosarcome. Dans un premier temps, nous avons reproduit le même protocole expérimental que celui utilisé pour l'administration de l'OPG dans l'ostéosarcome. L'OPG humaine a été administrée par transfert de gène non viral grâce à un vecteur synthétique (biopolymère non ionique) de la famille des Lutrol®, le F68. Une inhibition non significative du développement tumoral et de l'ostéolyse associée a pu être observée. Comme une quantité importante de RANKL a été mise en évidence par immunohistochimie dans notre modèle de xénogreffe, il est possible que la quantité d'OPG produite soit insuffisante. Afin d'obtenir une production d'OPG plus importante nous avons donc choisi de l'administrer par une approche d'électrotransfert. Les concentrations sériques mesurées grâce à cette technique sont nettement supérieures à celles obtenues avec le vecteur synthétique F68. Cependant, nous n'avons pas été à même d'observer un effet significatif de l'OPG sur le développement du sarcome d'Ewing.

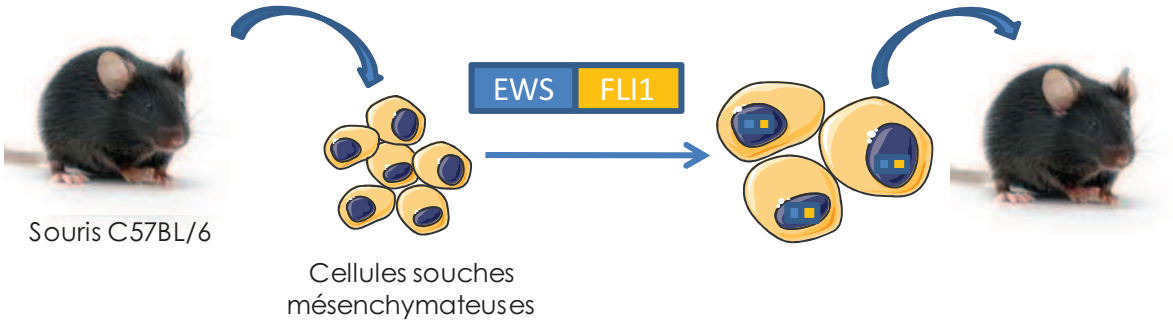


Figure 71 : Développement d'un modèle syngénique de sarcome d'Ewing. Les CSM de souris C57BL/6 sont isolées puis transduites par une construction lentivirale codant EWS-FLI1 humain. Des clones sont ensuite isolés et après validation de l'expression de EWS-FLI1, injectés dans le muscle paratibial des souris C57BL/6.

En effet, plusieurs expérimentations ont été menées sur différents modèles précliniques de sarcome d'Ewing induits par transplantation ou par injection intra-osseuse de cellules issues de deux lignées tumorales (A673 et TC-71) mais nous avons rencontré de nombreux problèmes techniques au cours de ces expérimentations. Ces difficultés concernent en particulier l'incidence, l'homogénénéité et la reproductibilité du développement tumoral et ne nous ont pas permis une analyse pertinente des résultats. Par ailleurs, ces tumeurs sont très agressives et se développent beaucoup plus rapidement chez les souris que chez l'homme, ce qui pose le problème du développement de stratégies curatives. Tout ceci met en évidence la difficulté d'obtenir des modèles précliniques pertinents dans le sarcome d'Ewing par rapport aux modèles d'ostéosarcome disponibles. Par ailleurs, une autre limite de nos modèles précliniques repose sur le fait que les inductions de tumeurs d'Ewing se font dans des systèmes xénogéniques. Ainsi, le sarcome d'Ewing est une pathologie humaine qui ne se développe pas chez la souris. Nos modèles murins reposent donc sur l'injection chez des souris Nude Athymiques de cellules tumorales humaines maintenues en culture. Les souris Nude sont caractérisées par la mutation « Nude » ce qui leur confère un thymus très rudimentaire ou inexistant [346]. Cette absence de Thymus induit une déficience en lymphocytes T fonctionnels ainsi qu'une production limitée d'anticorps en raison d'une absence de coopération entre les lymphocytes T et B. Les modèles tumoraux xénogéniques induits chez la souris Nude présentent donc comme principale limite de ne pas reproduire la fonction du système immunitaire dans le développement tumoral. Il serait donc intéressant de développer des modèles de sarcome d'Ewing syngéniques chez des souris immunocompétentes. C'est le travail entrepris par l'équipe de Franck TIRODE (Institut Curie, INSERM U830, Paris) en collaboration avec notre laboratoire. Le but du projet BORTES (financé par l'INCa) est de développer un modèle de sarcome d'Ewing syngénique chez la souris immunocompétente de fond génétique C57BL/6. Pour ce faire, des CSM de ces souris on été isolées puis transduites à l'aide d'une technologie lentivirale par la construction codant la protéine de fusion EWS-FLI1 humaine. Nous avons injecté ces cellules à des souris de la même souche après isolation de clones positifs et vérification de l'expression de EWS-FLI1 (Figure 68). Un phénomène inflammatoire a pu être observé à des temps précoces après l'injection des cellules transduites par EWS-FLI1 mais aucune tumeur ne s'est développée quelque soit le clone injecté. Cette observation pose ainsi la question de savoir si EWS-FLI1 est bien le seul événement nécessaire à la tumorogénicité des cellules d'Ewing ou si un événement secondaire est lui aussi nécessaire, comme cela a été suggéré dans une étude publiée par l'équipe de Stamenkovicz [347]. Afin de tenter de répondre à cette question, les clones modifiés ont été maintenus en culture pendant un nombre élevé de passages avant d'être réinjectés

aux souris. Ainsi, après 22 passages en culture, les clones modifiés ont acquis la capacité à proliférer en agar mou, les cellules devenant potentiellement tumorales. L'expérimentation est actuellement en cours mais aucune tumeur n'a pour le moment été détectée 3 mois après injection des cellules exprimant EWS-FLI1 aux souris. Une autre explication à cette absence de développement tumoral repose sur l'origine des cellules progénitrices des sarcomes d'Ewing qui n'est pas encore clairement établie. Ainsi, selon les théories actuelles, les cellules d'Ewing pourraient dériver de CSM ou de cellules primaires provenant de la crête neurale. Il est donc possible que le choix de transduire des CSM avec EWS-FLI1 ne soit pas pertinent si la seconde hypothèse s'avère exacte, une étude récente semblant confirmer cette hypothèse [24]. Malgré ces difficultés de réalisation, le développement de ce modèle syngénique représente une étape essentielle pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le sarcome d'Ewing, le système immunitaire jouant en effet un rôle certain sur le développement tumoral. Ceci met encore une fois en avant la nécessité de bien comprendre l'impact de l'environnement tumoral (environnement osseux, système immunitaire…) sur son développement.

D'autre part, il semble que dans le sarcome d'Ewing, plusieurs voies soient impliquées dans l'ostéoclastogenèse à l'origine de l'apparition des lésions ostéolytiques. Ainsi, comme nous l'avons montré, d'autres cibles thérapeutiques telles que le TNF-a ou le M-CSF peuvent être envisagées. Il parait assez peu envisageable dans un contexte thérapeutique, de proposer aux patients une combinaison de molécules inhibitrices telles que des anticorps monoclonaux ciblant plusieurs protéines différentes. En effet, les molécules ciblées comme RANKL, M-CSF ou le TNF-a sont impliquées dans plusieurs voies de signalisation différentes et leur inhibition simultanée pourrait induire une accumulation d'effets secondaires néfastes. Une compréhension claire des mécanismes impliqués dans l'apparition de ces lésions reste donc essentielle pour envisager une approche thérapeutique cohérente. Il serait aussi possible, au lieu d'inhiber l'ostéoclastogenèse, d'inhiber directement la dégradation de la matrice osseuse par les ostéoclastes. Ainsi, selon la littérature, l'inhibition de la Cathepsine K pourrait avoir un intérêt thérapeutique pour prévenir l'apparition des lésions ostéolytiques. En effet, la Cathepsine K joue un rôle majeur dans la dégradation du collagène de type I minéralisé lors de la dégradation osseuse [348]. De plus, dans un essai clinique de phase II, l'anticorps monoclonal odanacatib ciblant la Cathepsine K a montré une efficacité identique à celle de l'acide zolédronique dans la prévention de l'ostéolyse associée aux métastases osseuses issues de carcinome mammaire [349]. Cependant, deux autres essais cliniques ont été entrepris sur le traitement des métastases osseuses issues de carcinomes mammaire et prostatique mais ont été stoppés pour des considérations commerciales. Une autre

stratégie, permettant à la fois de cibler les cellules tumorales et la résorption osseuse repose sur l'utilisation de l'acide zolédronique. Nous avons montré au sein du laboratoire qu'une association de l'acide zolédronique avec un agent de chimiothérapie conventionnel, l'ifosfamide, permettait d'obtenir un effet synergique des deux molécules sur le développement du sarcome d'Ewing en plus d'une protection contre les lésions osseuses [96].

Le second objectif de cette thèse a été d'inhiber la prolifération du sarcome d'Ewing en ciblant directement les cellules tumorales par une stratégie innovante utilisant la cytokine pro-aptotique TRAIL. La capacité de TRAIL à cibler spécifiquement les cellules tumorales lui confère un avantage certain sur les chimiothérapies actuelles, hautement toxiques pour les tissus environnants et pouvant induire de nombreux effets secondaires tels que l'apparition de tumeurs chimio-induites. Nous avons démontré que TRAIL, administré par transfert de gène non viral grâce à un lipide cationique dans des modèles précliniques de sarcome d'Ewing, est capable d'induire une réduction significative du développement tumoral et des lésions ostéolytiques associées. L'utilisation de TRAIL en clinique pour le traitement des patients atteints de tumeurs d'Ewing semble donc une stratégie prometteuse. De plus, l'équipe de Mitsiades a montré par immunohistochimie que sur 32 biopsies de patients atteints de tumeurs d'Ewing, 72% expriment à la fois DR4 et DR5 et que 25% expriment un des deux récepteurs [189]. Seule une tumeur ne présentait aucun des deux récepteurs. Conformément au fait qu'une grande majorité des tumeurs d'Ewing expriment à la fois DR4 et DR5, il semblerait plus intéressant d'utiliser TRAIL dans des essais cliniques plutôt que le mapatumumab ou le lexatumumab qui ne ciblent respectivement que DR4 ou DR5. Cependant, l'utilisation de la forme recombinante de TRAIL dans des pathologies tumorales chez les patients est restée très limitée en raison d'une supposée toxicité hépatique. Depuis, il a été montré que cette toxicité était due au Tag exogène utilisé lors de la purification de la protéine recombinante et de nouveaux essais cliniques réalisés avec une forme recombinante non taguée de TRAIL ont montré une absence de toxicité.

Cependant, la limite majeure à l'utilisation de TRAIL en clinique résulte de l'apparition de phénomènes de résistance. Ainsi, nous avons pu observer que sur 7 lignées étudiées, 4 se sont montrées résistantes à l'apoptose induite par TRAIL. Nous nous sommes donc intéressés aux mécanismes mis en jeu dans ces phénomènes de résistance. D'après nos études, cette résistance impliquerait l'expression du récepteur de mort DR4 et celle de c-FLIP, un inhibiteur de la pro-caspase-8. La compréhension des mécanismes qui régulent la sensibilité à TRAIL est essentielle pour une application

clinique. Nos études se sont focalisées pour l'instant sur des expérimentations *in vitro* qu'il faudra bien sûr étendre à des études *in vivo*.

Une étape essentielle pour la poursuite des études sur la résistance à TRAIL sera donc de développer un modèle tumoral résistant à TRAIL *in vivo*. Ainsi, des facteurs environnementaux tels que l'hypoxie, l'expression de l'OPG, de protéases telles que MMP-3, MMP-2 et MMP-9 ou encore de cytokines telles que l'IL-8 peuvent influencer la sensibilité à TRAIL dans les tumeurs [350]. Il semble donc que les phénomènes de résistance ne peuvent pas être étudiés uniquement sur des lignées cellulaires *in vitro* mais plutôt dans un contexte tumoral complexe tel qu'il existe *in situ*. Nous devrons nous assurer que les lignées cellulaires qui présentent une résistance à TRAIL *in vitro* le seront toujours lors d'un développement tumoral après injection des cellules chez la souris Nude. De plus, il serait intéressant de comparer l'expression des récepteurs de TRAIL ainsi que des acteurs de sa voie de signalisation entre les lignées de sarcome d'Ewing en culture et les cellules extraites des tumeurs correspondantes. Ceci nous permettrait d'étudier l'effet direct du microenvironnement tumoral sur l'expression des acteurs de la sensibilité / résistance à TRAIL (c-FLIP, pro-caspase-8, récepteurs leurres, récepteurs de mort…). Par ailleurs, une étude plus complète de l'implication du nouveau récepteur court bDR4 dans la sensibilité à TRAIL des lignées de sarcome d'Ewing semble essentielle puisque sa surexpression est capable d'induire la sensibilisation d'une lignée initialement résistante. De plus, comme nous l'avons montré, son expression ne se limite pas au sarcome d'Ewing puisque au moins une lignée de myélome multiple l'exprime également. Nous poursuivrons donc ces études par la recherche de ce nouvel isoforme dans d'autres types de tumeurs osseuse primitives (ostéosarcome), mais aussi des carcinomes ou autres sarcomes. Son implication dans les phénomènes de résistance pourrait donc dépasser le cadre du sarcome d'Ewing et concerner d'autres types de pathologie cancéreuse. La corrélation entre son expression et la sensibilité à TRAIL devra donc être étudiée dans d'autres types de cancers osseux ou non.

Cependant, malgré la limite que peut représenter l'apparition de résistances, TRAIL représente un candidat très prometteur pour une utilisation adjuvante en clinique dans le cadre du sarcome d'Ewing. Ainsi, comme nous l'avons déjà évoqué, l'utilisation de TRAIL en association avec des agents de chimiothérapie conventionnels est capable d'induire une sensibilisation de la tumeur, ce qui permettrait de contourner ces problèmes de résistances.

ANNEXES

Annexe 1

Trends in Cancer Research

Review

Targeting the bone microenvironment as a promising therapeutic approach in Ewing's sarcoma

Picarda Gaëlle[1,2], Odri Guillaume[3], Corradini Nadège[4], Heymann Dominique[1,2], Tirode Franck[5,6], and Redini Françoise[1,2,*]

[1]INSERM, UMR 957, Nantes, [2]Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, [3]Service d'orthopédie, CHU Hôtel Dieu, Nantes, [4]Service d'onco-pédiatrie, Hôpital Mère - Enfant, Nantes, [5]Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, [6]INSERM, U830, Unité de Génétique et Biologie des Cancers, Paris, France

ABSTRACT

Ewing sarcoma represents the second most common bone tissue malignancy in adolescents and young adults. Considerable progress in both local therapy (surgery or radiation therapy) as well as systemic chemotherapy during the past 4 decades has raised the 5-year survival rate from around 10% to 55-65%. However, survival for the 25% of patients with metastatic disease at diagnosis remains poor: less than a quarter survive beyond 5 years. Moreover, a survival plateau seems to have been reached with conventional therapies, suggesting that novel approaches are needed especially for high-risk disease. Identification and well-designed testing of novel agents is crucial for this challenging group of patients. Ewing's sarcoma is defined as a bone tumor which may occur at any site within the skeleton but affects preferentially the trunk and the diaphysis of long bones. It arises less commonly in extraskeletal soft tissues (15%). Bone lesions from primary or secondary (metastases) tumors are characterized by extensive bone lesions, mainly due to osteolysis. Osteoclast activation and subsequent bone resorption is responsible for the clinical features of bone tumors including pain, vertebral collapse and spinal cord compression. Therefore, drugs which target the bone resorbing cells, i.e. osteoclasts, may represent promising agents in an adjuvant setting for the treatment of bone tumors. Two main drug families will be described more in detail in this review: the bisphosphonates (BPs) on one hand and drugs targeting the pro-resorbing cytokine Receptor activator of NF-kappa B Ligand (RANKL) [osteoprotegerin (OPG), RANK-Fc, RNAi targeting RANKL expression] on the other hand.

KEYWORDS: Ewing's sarcoma, bone resorption, bisphosphonates, RANKL

*Corresponding author: Dr. Françoise Redini,
UMR_s957 INSERM - EA 3822,
Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives,
Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil,
44035 Nantes cedex 1. France.
francoise.redini@univ-nantes.fr

INTRODUCTION

First described in 1921 by James Ewing [1], Ewing Sarcoma is the second most common malignant primary bone tumor in adolescents and adults with a frequency of 1-3 per million per year in the western hemisphere [2]. This primary neuroectodermal tumor (PNET) of mesenchymal origin develops mainly between the age of 10 and 20 years with a peak incidence at age 15 [3, 4].

Interethnic differences can be observed, as white and Hispanic young people are primarily affected but rarely people of Asian or African origins [5, 6]. Approximately 85% of Ewing sarcomas occur in bone and especially in the pelvis, chest wall, spine and the diaphyseal regions of long bones as femur, fibula and tibia [2]. The disease is characterized by a rapid tumor growth and extensive bone destruction with periostal reaction that can result in bone pain and pathological fracture [7]. Histologically, Ewing sarcoma is characterized by small, poorly differentiated round cells expressing a high level of the transmembrane glycoprotein CD99 believed to be involved in cell adhesion [8]. Until early 1990s, this glycoprotein was used as the only immunohistochemical diagnostic marker of Ewing sarcoma family tumor (ESFT) but was supplemented because of its lack of specificity, marking also other tissues and tumor types. The molecular initiating event of Ewing's tumor is a chromosomal translocation between the *EWS* gene on chromosome 22 and a gene of the erythroblast transformation sequence (ETS) family [9, 10, 11]. This translocation leads to the production of the oncogenic fusion gene *EWS-FLI1* (t(11;22)(q24;q12)) in 85% of the cases but also to *EWS-ERG* (t(21;12)(q22;q12)) in 10% and *EWS-ETV1,4* or *-FEV* in the remaining 5% of cases [12]. The protein encoded by this gene is an aberrant transcription factor that promotes tumorogenicity [13, 14]. The presence of this fusion gene, representing the Ewing sarcoma molecular signature is used as a specific diagnostic marker of the Ewing's tumor family thanks to fluorescence in-situ hybridization and RT-PCR [15].

The first suspicion of an Ewing sarcoma is generally established by radiology as the patients appear with intermittent osseous pain of variable intensity which can be mistaken with growth pain or provoked by sport [16]. Because of this late diagnosis, more than 20% of patients present metastases at diagnosis, decreasing their long term survival to 15-25% as compared to more than 70% for patient with localized tumor [17, 18]. The EUROpean Ewing tumor Working Initative of National Groups (EURO-E.W.I.N.G.) developed a therapeutic protocol (Euro-EWING99) consisting of neoadjuvant and adjuvant poly-chemotherapy associated to definitive surgery with limb salvage in the majority of cases. Radiotherapy and bone marrow transplants are occasionally proposed to patients. With the use of alkylating agents, long term survival achieved more than 65% for localized disease, but has not changed in the past 30 years for patients with clinically detectable metastases at diagnosis or with disease relapse [19]. According to this observation, new therapeutic options should be actively explored to both increase long term survival for high risk patients and decrease chemotherapy's side effects.

New therapeutic targets are currently in progress in clinical trials, and among them the association between chemotherapy agents with VEGF inhibitors [20, 21]. A phase II clinical trial is currently in progress testing the efficacy of an IGF-1R targeting antibody on sarcoma patients including Ewing sarcoma after a promising phase I clinical trial showing clinical benefits [21]. A better understanding of the Ewing's sarcoma biology allowed the researchers to focus on bone micro-environment as a promising therapeutic target in such tumors. Indeed, blocking the vicious cycle between bone resorption and tumor proliferation which occurs during tumor development in bone (involving osteoclasts, bone stromal cells/osteoblasts and cancer cells) may represent a therapeutic option [22]. It has been suggested that a disorder in the expression of the main cytokines involved in the regulation of bone remodeling, namely OPG (osteoprotegerin), RANK (receptor activator of nuclear factor κB) and RANKL (RANK ligand) is associated with bone tumor formation. Accordingly, an anti resorptive strategy could represent a promising approach to inhibit local Ewing sarcoma growth as it has been already demonstrated in osteosarcoma by the inhibition of the RANK/RANKL interaction [23, 24]. The aim of this review is to provide an update on actual Ewing sarcoma treatments and on new recent findings related to the modulation of bone remodeling as a new therapeutic target in Ewing sarcoma.

Current Ewing sarcoma treatments

1.1. Localized disease treatment

The first part of the treatment of the localized tumor consists in cytoreduction using neoadjuvant chemotherapy in order to eliminate micrometastases and to facilitate tumor surgical resection with wide negative margin. Then surgery is performed as often as possible with limb salvage in the majority of cases. Amputation is still occasionally realized when radiation or conservative surgery would not be efficient enough to totally eradicate the tumor [25]. Then patients receive adjuvant chemotherapy associated or not with radiotherapy, this latter being rarely used because of potential side effects such as secondary tumor developments or effects on bone growth.

In 1962, the first chemotherapeutic agent used in Ewing sarcoma was cyclophosphamide [26, 27]. Then, multimodality therapies were tested as for example in 1974 at the Memorial Sloan-Kettering Cancer center in New York with the combination of Vincristine, Actinomycin D, Cyclophosphamide and Doxorubicine (VACD). The combination benefits were confirmed by international multi-institutional collaborative trials [28, 29]. In the late 1980s, Ifosfamide and Etoposide were included with three or more of the VACD combinations, improving five years relapsefree survival for the patients without metastases from 54±4% for the standard therapy group to 69±3% for the group including Etoposide and Ifosfamide [30].

1.2. Recurrent and metastatic disease treatment

Before chemotherapy, relapsing Ewing sarcoma patients had a very limited life expectancy of several weeks or even months. First, several clinical trials proved the interest of a combination of cyclophosphamide (an alkylating agent) and Topotecan (a topoisomerase I inhibitor) associated when possible to surgery and radiation [31, 32, 33]. Currently, one of the most efficient and well tolerated combinations is composed of Temozolomide and Irimotecan, these 2 molecules exerting a synergistic effect and being able to by-pass cyclophosphamide and Topotecan resistance acting through different mechanisms [34].

1.3. Euro-EWING99

Since 1999, the still accruing EURO-EWING group involving the following SFCE, GCF, SIAK, EORTC, EICESS European groups and the American COG group tested the clinical benefits of a different chemotherapy combination involving Vincristine, Ifosfamide, Doxorubicin and Etoposide (VIDE). The protocol is composed of 6 sequences of VIDE treatment followed by surgery when possible. The histological response to chemotherapy is then evaluated and patients are divided into 3 arms according to the tumor localization at diagnosis, the volume for unresected tumors and the percentage of residual cells after treatment. The R1 arm concerns patients with localized disease with good response to chemotherapy (<10% of residual cells) or with a volume below 200ml. The R2 arm involves patients with lung metastases and patients with localized tumor with poor response to chemotherapy or with a tumor volume above 200ml. Finally, the last arm (R3) includes patients with bone, bone marrow or multifocal metastases. For the R1 group, adjuvant chemotherapy is randomized between 7 sequences of a combination of Vincristine and actinomycine with cyclophosphamide (VAC) or ifosfamide (VAI). For the R2 group adjuvant therapy is randomized between VAI and a stronger chemotherapy composed of busulfan and melphalan. For the R3 group giving the lower survival prognosis, treatment options consist in high dose of melphalan-melphalan, busulfan/melphalan with autologous stem-cell transplantation or in the worst case Phase II clinical trial.

1.4. Limit of current treatments

Thanks to these treatment improvements, the current survival rate for EURO-EWING patients reaches 70% for localized disease. Unfortunately, 5 years survival rate for patients with metastases detected at diagnosis remain around 25% and even around 7% when relapse occurs in the first two years after treatment. Accordingly, new therapeutic options should be tested and among them, inhibition of tumor associated bone resorption seems to be a promising axis showing preclinical encouraging results in bone tumoral pathology.

2. A new therapeutic research axis targets the vicious cycle between tumor proliferation and bone resorption

2.1 The vicious cycle

Skeletal complications remain the major issue of primary bone tumors. In osteosarcoma and Ewing sarcoma as well as in bone metastasis secondary to breast, lung or prostate carcinoma, skeletal lesions lead to bone pain and pathological fractures. In physiological conditions in adults, the skeletal integrity is controlled by a balance between bone formation and bone resorption. This equilibrium is altered by tumor cells leading to osteolytic and/or osteoblastic lesions. Moreover, interaction between tumor cells, tumor derived humoral factors and the bone marrow microenvironment has shown to be essential for bone tumor initiation and promotion. As evidenced in bone metastases, a vicious cycle occurs during primary bone tumor development between bone resorption and tumor proliferation [22, 23] (Figure 1). The tropism of primary and metastatic tumor cells for bone is linked to the presence of growth factors, such as Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Transforming Growth Factor-β (TGF-β) or Fibroblast Growth Factor (FGF), in the bone microenvironment itself after their release from the bone matrix during bone resorption [35, 36, 37]. All those factors stimulate tumor engraftment and proliferation according to the "seed and soil" hypothesis [38]. In turn, tumor cells produce pro-osteolytic factors (such as hormones, cytokines and growth factors) directly or indirectly through stromal cell interaction [39, 40, 41]. Among these factors, parathyroid hormone related peptide (PTH-rP) promotes osteoclast differentiation, activation and survival through RANKL production by osteoblasts, leading to final bone resorption. Therefore, the increased bone resorption favours the vicious cycle by inducing the release of growth factors stored in the bone matrix and further enhance tumor proliferation. Increased calcium concentration in bone microenvironment induced by bone destruction has also been shown to increase tumor growth and PTH-rP production.

Accordingly, inhibiting bone resorption seems to be a promising approach to inhibit local Ewing sarcoma growth.

2.2. Bisphosphonates

Bisphosphonates (BP) are synthetic analogues of endogenous pyrophosphate that selectively concentrate at the bone resorption surface thanks to interaction with hydroxyapatite acting as strong

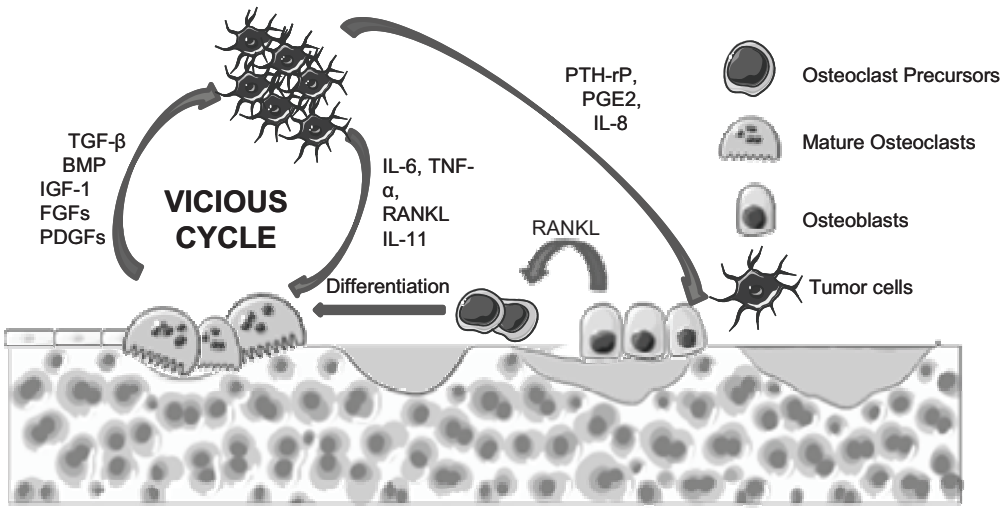


Figure 1. The Vicious cycle between bone resorption and tumor proliferation. Pro-osteolytic factors (IL-6, TNF-α, RANKL, IL-11, PTH-rP, PGE2, IL-8) expressed by tumor cells induce RANKL mediated bone resorption directly or indirectly through RANKL production by osteoblasts, allowing the release of growth factors (TGF-β, BMPs, IGF-1, FGFs and PDGFs) which in turn stimulate tumor proliferation.

inhibitors of bone resorption as they are released during osteolysis [42, 43, 44]. Several bisphosphonates are currently available, with a phosphorus-carbon-phosphorus chemical basis similar to endogenous pyrophosphate with a carbon molecule replacing the central oxygen. This carbon molecule permits the substitution of 2 additional side chains. BPs are distributed in different families depending on the structure of their side-chains (Figure 2). The first generation, composed of etidronate, clodronate or tiludronate have a simple substituent linked to their central carbon and exert a weak inhibitory effect on bone resorption. The second generation including pamidronate, alendronate, oribandronate possesses an aliphatic side chain containing a single nitrogen atom. The third generation and among them zoledronic acid, risedronic, orminodronic acids the most efficient to prevent bone lesions [45, 46, 47]. These last BPs are composed of an heterocyclic substituent containing two nitrogen atoms in an pirydyl ring (risedronate) or imidazole ring [40]. First generation BPs are metabolized as toxic analogues of adenosine triphosphate (ATP) that induce osteoclastic cell death [48, 49]. As for other N-containing BPs (second and third generation), zoledronic acid inhibits the farnesyl diphosphate and geranylgeranyldiphosphate synthases, two enzymes involved in the mevalonate pathway necessary for the prenylation of small intracellular GTPases such as Ras, Rho or Rac [50]. The prenylation of these GTPases being essential in osteoclast function, their inhibition leads to the induction of osteoclast apoptosis by the loss of survival signal [51, 52, 53]. Moreover, BPs may also inhibit bone resorption by increasing the production of OPG by human osteoblasts [54]. OPG is a decoy receptor for RANKL which inhibits the RANK/RANKL interaction that is essential for osteoclast differentiation and activation. The disruption of OPG/RANK/RANKL balance in favor of RANKL can be implicated in increased bone

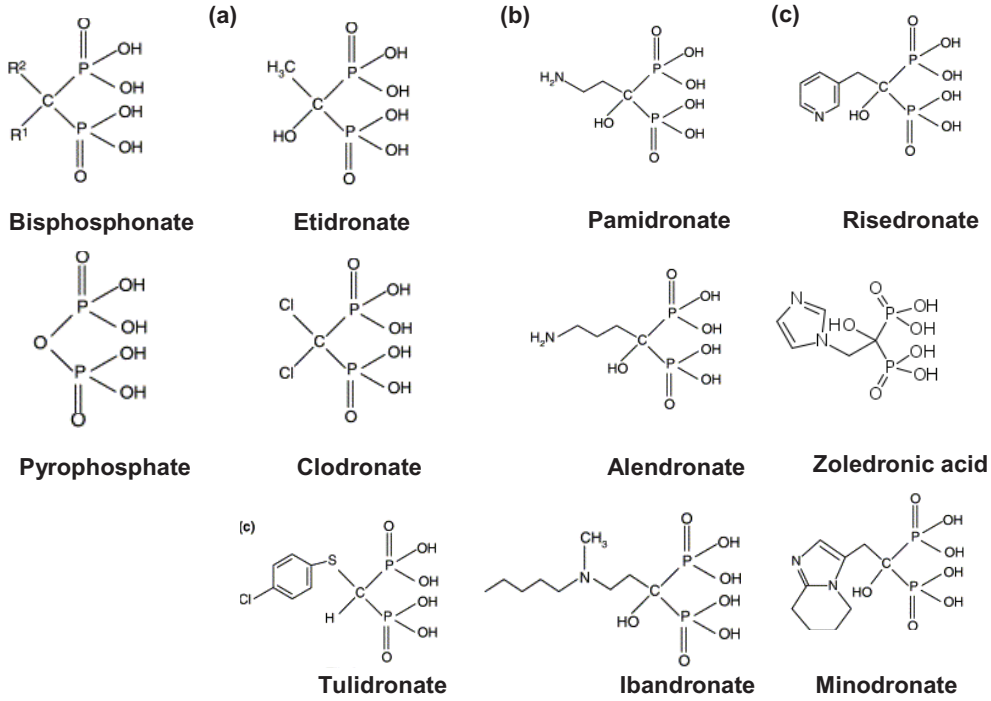


Figure 2. Structure of bisphosphonates: **(a)** The first-generation bisphosphonates have short alkyl, halide or hydroxyl side chains, **(b)** the second-generation bisphosphonates (with the exception of tiludronate) have a nitrogen atom in their side chain, and **(c)** the third-generation bisphosphonates have a heterocyclic side chain with at least one nitrogen atom.

resorption associated with pathological conditions such as malignant bone diseases [55]. Additionally to its antiresorptive effect, zoledronic acid has been shown to induce the death of tumor cell lines such as myeloma, breast and prostate carcinoma cells in several preclinical studies [46]. It also appears to exert an inhibitory effect on cancer cell invasion and angiogenesis [56].

Despite several side effects reported after long term treatment with BPs such as osteonecrosis of the jaw, BPs are currently under investigation in postmenopausal bone loss and bone lesions from tumor origin such as breast and prostate cancer with variable clinical benefit [57, 58]. A significant decrease of bone resorption was observed in these studies but with no unequivocal effects on survival and metastases occurrence. Moreover, BP clinical effects on bone metastases from lung cancer are also discussed as well as their effects on visceral metastases [59, 60, 61, 62]. The encouraging results reported on bone remodeling as well as the ability of BP and in particular zoledronic acid to induce tumor cell death *in vitro* make it a good candidate for a therapeutic strategy in primary bone tumors. Indeed, zoledronic acid could inhibit both bone resorption and tumor proliferation in the vicious cycle, making it more efficient. Concerning primary bone tumors, several studies have already demonstrated the interest of using zoledronic acid in osteosarcoma [63, 64, 65, 66], in particular promising preclinical results had been reported on survival and tumor growth [66]. In this context, zoledronic acid has been recently combined with conventional chemotherapy and surgery for adult and pediatric patients in the French OS2006 phase III randomized clinical trial for osteosarcoma treatment. Following these results, other preclinical and clinical studies demonstrated the beneficial effect of BP treatment in osteosarcoma [67, 68, 69, 70, 71].

Concerning Ewing Sarcoma, despite the improvement in chemotherapy protocols, survival rate for patients with bone metastases remains very low. In this context, combining zoledronic acid with current conventional chemotherapy could represent a promising therapeutic option to limit tumor associated osteolysis and to prevent bone metastases development which is currently the main bad prognosis factor [20]. Few fundamental and preclinical studies have demonstrated an antitumoral effect of zoledronic acid on Ewing Sarcoma cell lines [68, 72, 73, 74]. In the laboratory, we have recently shown that zoledronic acid induces a significant inhibition of tumor cell viability by blocking the cell cycle in S-G_2M phase transition and by lowering caspase-3 activation [75]. Using a preclinical model of Ewing sarcoma induced in athymic mice, zoledronic acid alone significantly inhibits tumor development in bone site, decreases osteolytic lesions and improves mice survival [70] (Figure 3).

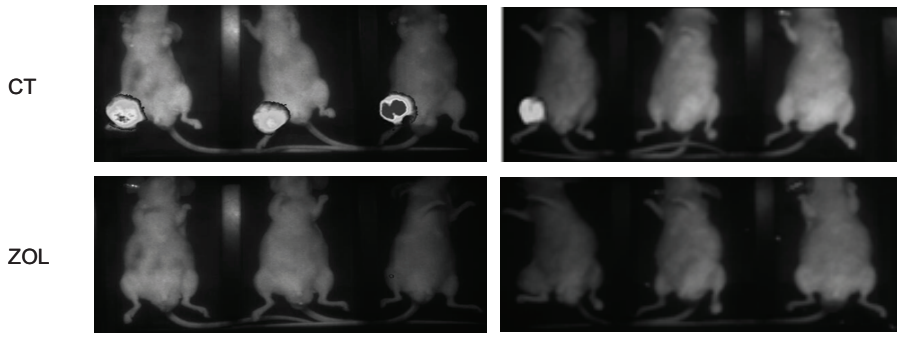


Figure 3. Effects of Zoledronic acid treatment in an Ewing sarcoma preclinical model in nude mice. The model was induced by the intra-osseous injection of 2 millions A673 human Ewing sarcoma cell expressing luciferase. Luciferase expression was followed by *in vivo* bioluminescence. The control group (CT) received PBS injection and the Zoldedronic acid (ZOL) group received 100 µg/kg ZOL twice a week from day 1 to the end of the treatment (8 weeks). Results show significant inhibition of tumor development in the ZOL treated group as revealed by diminution of tumor incidence.

On the contrary, the same doses of zoledronic acid exerted no inhibitory effect on Ewing Sarcoma progression in soft tissue. These results can be explained by the high tropism of BPs for the calcified bone matrix, leading to their elevated concentration in bone tissue and their rapid clearance from blood and soft tissues. These data correlate with other studies on soft tissue tumors or visceral metastases [46]. On the other hand, we demonstrated the synergistic effect of a combination of zoledronic acid and ifosfamide, a conventional drug used in Ewing sarcoma clinical protocols, on tumor progression in soft tissue. Indeed, low doses of ifosfamide induced the same extent of tumor growth inhibition in preclinical soft tissue Ewing Sarcoma as compared to high doses of ifosfamide alone. These results correlate with other previous studies showing a synergistic effect between BPs and chemotherapeutical agents and demonstrate the great interest of using zoledronic acid in Ewing sarcoma treatments to reduce chemotherapy's doses and as a consequence, its side effects [68, 76, 77, 78]. Moreover, the Euro-Ewing 2008 study administering zoledronic acid or placebo to Ewing sarcoma patients corresponding to the R1 group (described above) is actually in progress in Germany and will provide more information on zoledronic acid efficacy as adjuvant therapy in Ewing sarcoma. However, because several side effects have been reported with the clinical use of BPs, another approach to decrease bone resorption could be to target RANKL, the main cytokine involved in osteoclast differentiation [57, 58].

2.3. Osteoclast activity inhibition

2.3.1. RANKL inhibition

Bone remodeling is strongly regulated thanks to the molecular triad composed of OPG, RANKL and RANK [79, 80]. The binding of RANKL to its receptor RANK on the surface of osteoclast precursors in association with M-CSF induces osteoclast differentiation *in vitro* suggesting an important role of this interaction in bone biology (Figure 4). In the bone microenvironment, RANKL

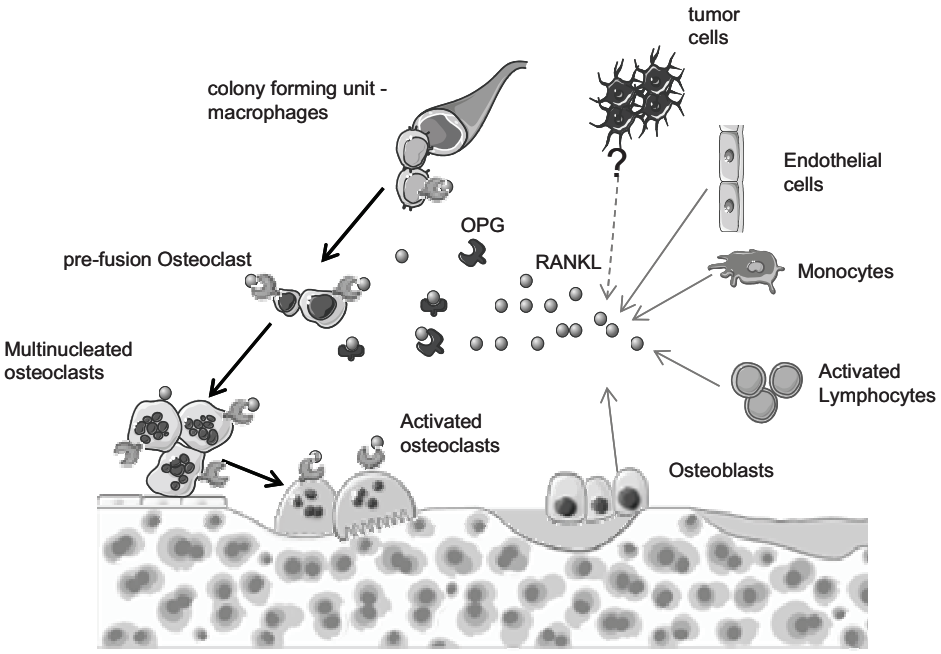


Figure 4. The OPG/RANK/RANKL molecular triad. RANKL can be produced by several cell types in the bone tumor micro-environment (osteoblasts, activated lymphocytes, monocytes, endothelial cells and tumor cells as well). The RANKL/RANK interaction on osteoclast precursors induces osteoclast differentiation, activation and survival. OPG acts as a decoy receptor and its binding to RANKL inhibits RANKL dependent osteoclast differentiation.

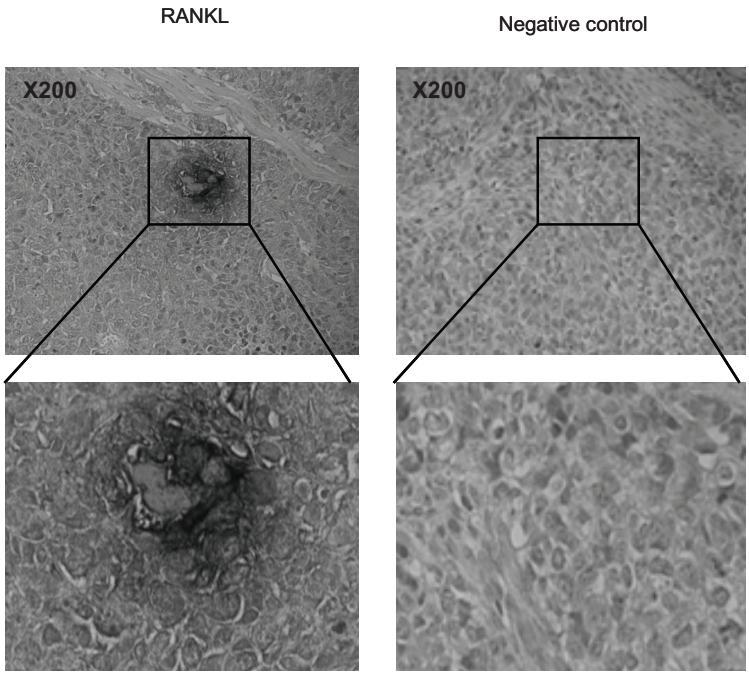


Figure 5. Immuno-histochemical analysis of RANKL expression in Ewing sarcoma tumor developed in nude mice as described in Figure 3. The tumor was stained with a mouse monoclonal antibody targeting RANKL (RANKL), the negative control was performed with mice serum instead of primary antibody.

is produced by bone marrow stromal cells osteoblasts and osteoclasts while in a tumor microenvironement, it can be produced by several other cell types like fibroblasts, epithelial cells and T lymphocytes, in which RANKL appears to be the final effector of osteoclast mediated bone resorption [81]. Cells of many tumor types such as multiple myeloma, prostate cancer or even human neuroblastoma can as well express RANKL themselves [82, 83, 84]. Moreover, many chemokines, cytokines, hormones and growth factors produced by tumor cells are able to induce an increase of RANKL expression through PTH-rP and a decrease of OPG production thus increasing vicious cycle in bone metastases. Concerning Ewing sarcoma, only few studies are available but it seems that these cells express only a low level of RANKL [7]. A preliminary preclinical study carried out by our group showed a localized but strong expression of RANKL in a paratibial model of Ewing sarcoma induced by an intramuscular injection of human A673 cells in nude mice (Figure 5). The interest of targeting RANKL has previously been shown in bone metastases as well as in primary bone tumors and might be a promising target in Ewing sarcoma [23, 24, 82, 83]. Several molecules targeting RANKL have already proved their efficiency in other malignant bone pathologies like osteosarcoma and might represent potent therapeutic agent in Ewing sarcoma as described below.

OPG and RANK-Fc

OPG, a member of the TNF receptor superfamily is a ubiquitous secreted homodimeric cytokine able to bind RANKL then inhibiting the RANK/RANKL interaction and further osteoclast differentiation and activation [79, 85, 86]. The critical role of OPG in bone remodeling has been shown thanks to animal models, such as OPG overexpressing mice that have severe osteopetrosis and knock-out OPG mice exhibiting severe osteoporosis [79, 87]. The ratio between OPG and RANKL expression is essential to control the balance between bone resorption and formation and an increased level of RANKL compared to OPG can be responsible of osteolytic pathologies

such as osteoporosis or Thalassemia induced bone loss [88, 89]. A disruption of this ratio in favor of RANKL has also been demonstrated to be responsible of severe osteolysis in tumoral context [55]. Accordingly, overexpressing OPG to restore this equilibrium between OPG and RANKL expression appears to be a promising approach to limit tumor associated bone lesions. The interest of recombinant OPG therapy has already been demonstrated in preclinical models of secondary bone tumors preventing osteolytic bone disease from multiple myeloma, prostate cancer or breast cancer [82, 83, 90]. Our team showed for the first time a significant therapeutic interest of OPG in primary bone tumors. Indeed, in a preclinical model of osteosarcoma, OPG delivered by non-viral gene transfer inhibited tumor growth and tumor associated osteolysis, increasing significantly animal survival [23]. A clinical trial has already demonstrated the efficacy of OPG in limiting post-menopausal osteoporosis for a sustained period after a single subcutaneous injection of recombinant OPG-Fc. This study validated as well the good tolerability of OPG-Fc administration [91]. Another Phase I clinical trial tested the effect of recombinant OPG-Fc (AMGN-0007) administration on osteolytic lesions of patient presenting multiple myeloma and breast carcinoma. In this study, a single sub-cutaneous injection of recombinant OPG was able to suppress bone resorption with an efficacy comparable to pamidronate, a second generation Biphosphonate [92]. Unfortunately this clinical trial has been stopped because of the production of OPG targeting antibodies in a treated woman inducing a blockade of both endogenous and injected OPG. Moreover, despite its clinical efficiency to prevent osteolytic lesions, a major issue to OPG-Fc administration as an adjuvant therapeutic agent in tumor context is its ability to inhibit TRAIL induced apoptosis [93]. This dual effect of OPG may inhibit TRAIL induced apoptosis of tumor cells, a natural mechanism to prevent tumor development [94]. Moreover TRAIL's ability to induce apoptosis in sensitive Ewing Sarcoma cell lines and to prevent tumor development has already been demonstrated *in vitro* by Wietzerbin's team and *in vivo* by our team in a preclinical model induced by intratibial injection of Ewing sarcoma cells in nude mice [95, 96]. To avoid this potential protumoral effect of OPG, another RANKL blocking recombinant protein might be used in Ewing sarcoma: RANK-Fc, the soluble form of RANK. RANK-Fc is unable to bind TRAIL and its efficacy has already been demonstrated in preventing tumor associated osteolysis and indirectly tumor growth in preclinical models of bone metastases such as prostate, lung and breast cancer [97, 98, 99]. Our team showed as well the ability of RANK-Fc delivered by non-viral gene transfer to prevent osteolytic lesions and tumor development, thus inducing an increase of animal survival in a rodent preclinical model of osteosarcoma [24]. The same efficacy can be expected in Ewing sarcoma and remains to be tested.

Denosumab®

Denosumab® (AMG 162, Amgen) is a humanized monoclonal antibody targeting RANK-L that has been developed for the treatment of osteoporosis and has been rapidly proposed for the treatment of bone tumors associated with osteolytic lesions. It is currently tested in 36 clinical trials, 17 including patients with skeletal metastasis. This antibody is a G2 Immunoglobulin with a long half-life in blood and is well tolerated. A single subcutaneous injection had shown a great efficacy to significantly reduce osteolysis in patients with osteoporosis, inflammatory arthritis and bone tumors such as multiple myeloma or bone metastasis [100, 101]. Moreover, a clinical study realized on breast and prostate cancer patients revealed the same ability of Denosumab® to reduce bone resorption markers in blood and urine as compared to BPs [101]. However, Denosumab has greater advantage for reducing SRE in patients refractory to BP treatment [102]. These promising results about Denosumab® in cancer remain to be confirmed in larger clinical trials.

Despite the fact that RANKL has been shown to be the final effector of osteoclast activity and differentiation through its binding to RANK, other molecular mechanisms appear to be implicated in bone resorption. In view of preliminary results obtained in preclinical studies using animal models, RANKL does not seem to be the only factor involved in bone osteolysis in Ewing's sarcoma.

2.3.2. RANKL independent osteoclast inhibition

Anti-TNFα

Another mechanism of osteoclast differentiation independent of RANKL might be, at least in part, responsible of osteolytic lesions observed during bone tumor development, including Ewing sarcoma. This mechanism involves the cytokine tumor necrosis factor α (TNF-α) whose role in bone loss has been previously evidenced as TNF inhibitor completely protected mice against ovariectomy-induced bone loss [103]. Moreover, it has been shown that osteoclast formation can be induced from circulating precursors by TNF-α, known to be produced by Ewing sarcoma cells [7, 104, 105]. Indeed, tumor associated macrophages (TAM) isolated from Ewing sarcoma tumors are able to differentiate into mature functional osteoclasts in the presence of macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) and TNF-α. According to these observations, this RANKL-independent mechanism might play a significant role in tumor associated osteolysis in Ewing sarcoma, and one can suggest that an anti-TNF-α strategy could block the vicious cycle between bone resorption and tumor proliferation. Because TNF-α is known to exert apoptosis in tumors, an anti-TNF-α strategy might antagonize this process. However, the context is different for Ewing sarcoma tumors which have been shown to be resistant to TNF-α induced apoptosis [106, 107]. TNF-α blocking antibodies, such as adalimumab, etanercept or infliximab have already been developed for inflammatory diseases such as ankylosing spondylitis, psoriasis or rhumatoïd arthritis and proved their tolerability and relative safety concerning short term treatments [108]. However, long term TNF-α blocking strategies must be used with caution because of potential side effects including lymphoma or other malignancies emergence [108, 109]. In the context of Ewing sarcoma treatment, a short term and local treatment could allow to avoid these side effects.

Anti-M-CSF

Macrophages colony stimulating factor (M-CSF), also called colony stimulating factor 1 (CFS1) has been first identified for its ability to stimulate the growth of macrophages [110]. It has been also shown that M-CSF plays an essential active role in bone biology, promoting the stimulation of osteoclast survival and proliferation [111, 112]. M-CSF also upregulates RANK expression in osteoclast precursors which is essential for their differentiation. In late differentiation stages, it also activates Akt, c-Fos and extracellular regulated kinase (ERK) pathways that might interact with RANK/RANKL signaling [113, 114]. *In vitro*, the combination RANKL and M-CSF is able to induce the differentiation of human bone marrow culture into resorbing osteoclasts [115]. *In vivo*, its critical role in bone biology has been assessed thanks to M-CSF deficient mice (op/op) displaying severe osteopetrosis with a depletion of osteoclasts. In these mice, a normal phenotype can be restored thanks to injections of recombinant M-CSF [116, 117, 118]. Another model of mice deficient for the M-CSF receptor c-fms displayed the same severe deficiency in osteoclast associated to an ostopetrotic phenotype [119]. M-CSF seems to be also implicated with other cytokines in bone pathologies like in osteoporosis fragility fractures or breast cancer metastases in which it is overexpressed [120]. The effect of this pathway inhibition was also demonstrated thanks to Imatinib mesylate and Dasatinib, two chemical inhibitor of tyrosine kinase activity able to inhibit c-fms pathway. Both molecules have been shown to induce a dysregulation of bone resorption *in vivo* acting on osteoclasts differentiation [121, 122]. Dasatinib was even able to induce the same effects on bone resoption that zoledronic acid in treated animals with the same increase of trabecular volume and thickness in both cases [121]. Moreover preclinical studies showed that the inhibition of the M-CSF signaling pathway is able to induce a decrease in bone destruction associated with human melanoma metastases and even of tumor proliferation in a myeloid leukemia metastases model [123, 124]. According to these results, M-CSF inhibition might be a promising approach to inhibit Ewing sarcoma associated bone destruction and indirectly tumor proliferation through inhibition of the vicious cycle.

CONCLUSION

Improvement in chemotherapy and surgical techniques has significantly increased long time

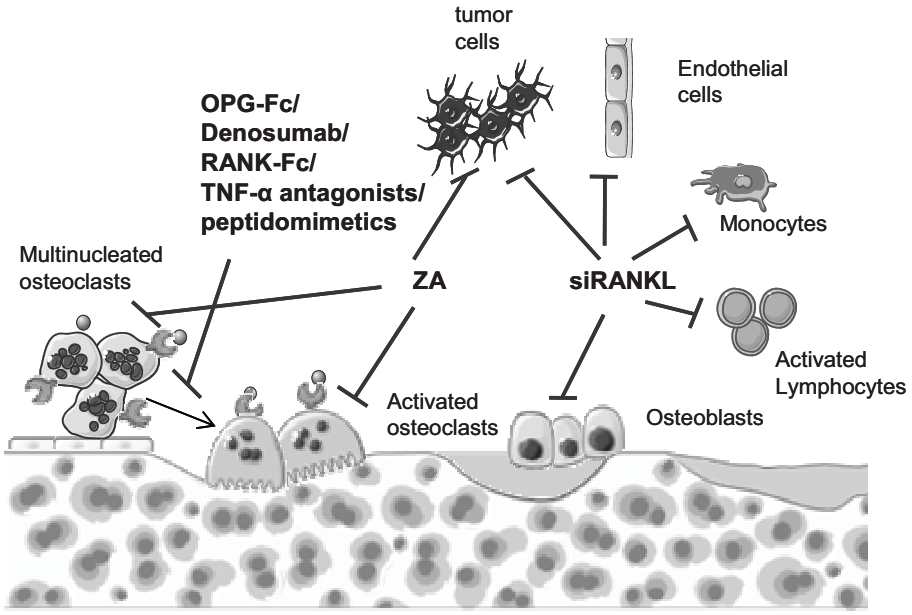


Figure 6. Potential therapeutic options to block the vicious cycle in bone tumor environment. Several strategies aim at inhibiting osteoclast differentiation and activation: OPG, Denosumab®, RANK-Fc, TNF-α antagonists, peptidomimetics... Zoledronic acid (ZA) is able to target both osteoclast and tumor cells, inducing their apoptosis. A strategy using RNA interference could inhibit RANKL production in any cell producing RANKL (osteoblasts, lymphocytes, monocytes…).

survival in patients presenting localized form of Ewing sarcoma, reaching 70% at 5 years. Unfortunately, these therapeutic progresses are not sufficient to improve long term survival for patients presenting a metastatic form of Ewing sarcoma at diagnosis or resistant to treatment. Moreover, in addition to their limited effects on resistant patients, a major issue of current chemotherapeutic agents is their side effects obtained with high doses that affect patient's quality of life. In this context, innovating therapeutic strategies which could be used in combination with chemotherapy are necessary to increase these poor survival rates. Inhibiting bone resorption and by this way the vicious cycle occurring between bone resorption and tumor proliferation represents a promising approach in association with tumor targeting drugs. Bisphosphonates such as zoledronic acids have already proved their efficiency to inhibit osteolytic lesions in pathologies like osteoporosis or bone metastasis but their efficiency remains to be proved in the context of Ewing Sarcoma by clinical trials. Unfortunately, one limit of these molecules is their severe side effects when injected at high doses like osteonecrosis of the jaw or severe hypocalcaemia. The understanding of molecular pathway implicated in bone resorption may also represent a promising strategy to inhibit bone resorption in a more physiological and targeted way. Defining the specific pathway implicated in bone resorption and the involvement of cytokines like RANKL, TNF-α or M-CSF might allow the development of specific antagonists like the RANKL antibody Denosumab® which appears to exert promising effects in the prevention of bone lesions. Other options are based on RNA interference or development of peptidomimetics that allows a specific inhibition of the targeted cytokine. The major interests of these strategies are their low production cost as well as their easy production. Concerning peptidomimetics, preclinical studies already demonstrated their efficacy, showing that by binding RANKL or OPG these peptides were able to prevent osteolytic lesions induced by metastases of multiple myeloma [125]. Concerning RNA interference, preclinical studies have already shown the efficient inhibition of tumor growth and engraftment by a lipoplex or

nanoparticules-combined siRNA targeting the EWS-FLI1 oncogene in Ewing sarcoma [126, 127]. The interest of targeting tumor microenvironment has already been studied as well in a preclinical study using siRNA targeting integrin subunits with a strong inhibitory effect on prostate tumor growth in bone site [128]. These results demonstrate the interest of developing other therapeutic strategies like recombinant antagonist proteins, peptidomimetics or RNA interference which specifically target cytokines implicated in bone resorption and used them in combination with conventional chemotherapeutic agents to limit metastasis development (Figure 6).

REFERENCES

1. Ewing, J. 1972, CA Cancer J. Clin., 22, 95.
2. Riggi, N. and Stamenkovic, I. 2007, Cancer Lett., 254, 1.
3. Tirode, F., Laud-Duval, K., Prieur, A., Delorme, B., Charbord, P., and Delattre, O. 2007, Cancer Cell, 11, 421.
4. Paulussen, M., Fröhlich, B., and Jürgens, H. 2001, Paediatr. Drugs, 3, 899.
5. Parkin, D. M., Stiller, C. A., and Nectoux, J. 1993, Int. J. Cancer, 53, 371.
6. Jawad, M. U., Cheung, M. C., Min, E. S., Schneiderbauer, M. M., Koniaris, L. G., and Scully, S. P. 2009, Cancer, 115, 3526.
7. Lau, Y. S., Adamopoulos, I. E., Sabokbar, A., Giele, H., Gibbons, C. L. M. H., and Athanasou, N. A. 2007, Br. J. Cancer, 96, 1716.
8. Kovar, H., Dworzak, M., Strehl, S., Schnell, E., Ambros, I. M., Ambros, P. F., and Gadner, H. 1990, Oncogene, 5, 1067.
9. Turc-Carel, C., Philip, I., Berger, M. P., Philip, T., and Lenoir, G. 1983, C R Seances Acad. Sci. III, 296, 1101.
10. Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H., Joubert, I., de Jong, P., and Rouleau, G. 1992, Nature, 359, 162.
11. Arvand, A. and Denny, C. T. 2001, Oncogene, 20, 5747-5754.
12. Folpe, A. L., Chand, E. M., Goldblum, J. R., and Weiss, S. W. 2001, Am. J. Surg. Pathol., 25, 1061.
13. May, W. A., Gishizky, M. L., Lessnick, S. L., Lunsford, L. B., Lewis, B. C., Delattre, O., Zucman, J., Thomas, G., and Denny, C. T. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5752.
14. Dauphinot, L., De Oliveira, C., Melot, T., Sevenet, N., Thomas, V., Weissman, B. E., and Delattre, O. 2001, Oncogene, 20, 3258.
15. Kovar, H. 1998, Curr. Opin. Oncol., 10, 334.
16. Ludwig, J. A. 2008, Curr. Opin. Oncol., 20, 412.
17. Jedlicka, P. 2010, Int. J. Clin. Exp. Pathol., 3, 338.
18. Cohen, M. D., Bugaieski, E. M., Haliloglu, M., Faught, P., and Siddiqui, A. R. 1996, Radiographics, 16, 523.
19. Cotterill, S. J., Ahrens, S., Paulussen, M., Jürgens, H. F., Voûte, P. A., Gadner, H., and Craft, A. W. 2000, J. Clin. Oncol., 18, 3108.
20. Anderson, P., Kopp, L., Anderson, N., Cornelius, K., Herzog, C., Hughes, D., and Huh, W. 2008, Expert Opin. Investig. Drugs, 17, 1703.
21. Subbiah, V., Anderson, P., Lazar, A. J., Burdett, E., Raymond, K., and Ludwig, J. A. 2009, Curr. Treat. Options Oncol., 10, 126.
22. Chirgwin, J. M. and Guise, T. A. 2000, Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr., 10, 159.
23. Lamoureux, F., Richard, P., Wittrant, Y., Battaglia, S., Pilet, P., Trichet, V., Blanchard, F., Gouin, F., Pitard, B., Heymann, D., and Redini, F. 2007, Cancer Res., 67, 7308.
24. Lamoureux, F., Picarda, G., Rousseau, J., Gourden, C., Battaglia, S., Charrier, C., Pitard, B., Heymann, D., and Rédini, F. 2008, Mol. Cancer Ther., 7, 3389.
25. Marec-Bérard, P., Chotel, F., and Claude, L. 2010, Bull. Cancer, 97, 707.
26. Sutow, W. W., Sullivan, M. P. 1962, Cancer Chemother. Rep., 23, 55.
27. Pinkel, D. 1962, Cancer, 15, 42.
28. Hayes, F. A., Thompson, E. I., Meyer, W. H., Kun, L., Parham, D., Rao, B., Kumar, M., Hancock, M., Parvey, L., and Magill, L. 1989, J. Clin. Oncol., 7, 208.

29. Jürgens, H., Exner, U., Gadner, H., Harms, D., Michaelis, J., Sauer, R., Treuner, J., Voûte, T., Winkelmann, W., and Winkler, K. 1988, Cancer, 61, 23.
30. Grier, H. E., Krailo, M. D., Tarbell, N. J., Link, M. P., Fryer, C. J. H., Pritchard, D. J., Gebhardt, M. C., Dickman, P. S., Perlman, E. J., Meyers, P. A., Donaldson, S. S., Moore, S., Rausen, A. R., Vietti, T. J., and Miser, J. S. 2003, N. Engl. J. Med., 348, 694.
31. Saylors, R. L., Stewart, C. F., Zamboni, W. C., Wall, D. A., Bell, B., Stine, K. C., and Vietti, T. J. 1998, J. Clin. Oncol., 16, 945.
32. Saylors, R. L., Stine, K. C., Sullivan, J., Kepner, J. L., Wall, D. A., Bernstein, M. L., Harris, M. B., Hayashi, R., and Vietti, T. J. 2001, J. Clin. Oncol., 19, 3463.
33. Bernstein, M. L., Devidas, M., Lafreniere, D., Souid, A., Meyers, P. A., Gebhardt, M., Stine, K., Nicholas, R., Perlman, E. J., Dubowy, R., Wainer, I. W., Dickman, P. S., Link, M. P., Goorin, A., and Grier, H. E. 2006, J. Clin. Oncol., 24, 152.
34. Wagner, L. M., McAllister, N., Goldsby, R. E., Rausen, A. R., McNall-Knapp, R. Y., McCarville, M. B., and Albritton, K. 2007, Pediatr. Blood Cancer, 48, 132.
35. Chikatsu, N., Takeuchi, Y., Tamura, Y., Fukumoto, S., Yano, K., Tsuda, E., Ogata, E., and Fujita, T. 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun., 267, 632.
36. Guise, T. A. 2002, J. Musculoskelet. Neuronal Interact., 2, 570.
37. Guise, T. A. and Chirgwin, J. M. 2003, Clin. Orthop. Relat. Res., S32.
38. Paget, S. 1989, Cancer Metastasis Rev., 8, 98.
39. Perez, M., Migliaccio, S., Taranta, A., Festuccia, C., Orrù, L., Brama, M., Bologna, M., Faraggiana, T., Baron, R., and Teti, A. 2001, Eur. J. Cancer, 37, 629.
40. Thomas, R. J., Guise, T. A., Yin, J. J., Elliott, J., Horwood, N. J., Martin, T. J., and Gillespie, M. T. 1999, Endocrinology, 140, 4451.
41. Mancino, A. T., Klimberg, V. S., Yamamoto, M., Manolagas, S. C., and Abe, E. 2001, J. Surg. Res., 100, 18.
42. Masarachia, P., Weinreb, M., Balena, R., and Rodan, G. A. 1996, Bone, 19, 281.
43. Sato, M., Grasser, W., Endo, N., Akins, R., Simmons, H., Thompson, D. D., Golub, E., and Rodan, G. A. 1991, J. Clin. Invest., 88, 2095.
44. Rogers, M. J., Gordon, S., Benford, H. L., Coxon, F. P., Luckman, S. P., Monkkonen, J., and Frith, J. C. 2000, Cancer, 88, 2961.
45. Epstein, S. 2006, Clin. Ther., 28, 151.
46. Heymann, D., Ory, B., Gouin, F., Green, J. R., and Rédini, F. 2004, Trends Mol. Med., 10, 337.
47. Coleman, R. E. 2008, Br. J. Cancer, 98, 1736.
48. Frith, J. C., Mönkkönen, J., Blackburn, G. M., Russell, R. G., and Rogers, M. J. 1997, J. Bone Miner. Res., 12, 1358.
49. Lehenkari, P. P., Kellinsalmi, M., Näpänkangas, J. P., Ylitalo, K. V., Mönkkönen, J., Rogers, M. J., Azhayev, A., Väänänen, H. K., and Hassinen, I. E. 2002, Mol. Pharmacol., 61, 1255.
50. Dunford, J. E., Rogers, M. J., Ebetino, F. H., Phipps, R. J., and Coxon, F. P. 2006, J. Bone Miner. Res., 21, 684.
51. Coxon, F. P., Helfrich, M. H., Van't Hof, R., Sebti, S., Ralston, S. H., Hamilton, A., and Rogers, M. J. 2000, J. Bone Miner. Res., 15, 1467.
52. Benford, H. L., McGowan, N. W., Helfrich, M. H., Nuttall, M. E., and Rogers, M. J. 2001, Bone, 28, 465.
53. Hughes, D. E., Wright, K. R., Uy, H. L., Sasaki, A., Yoneda, T., Roodman, G. D., Mundy, G. R., and Boyce, B. F. 1995, J. Bone Miner. Res., 10, 1478.
54. Viereck, V., Emons, G., Lauck, V., Frosch, K., Blaschke, S., Gründker, C., and Hofbauer, L. C. 2002, Biochem. Biophys. Res. Commun., 291, 680.
55. Grimaud, E., Soubigou, L., Couillaud, S., Coipeau, P., Moreau, A., Passuti, N., Gouin, F., Redini, F., and Heymann, D. 2003, Am. J. Pathol., 163, 2021.
56. Yoneda, T., Hashimoto, N., and Hiraga, T. 2003, Calcif. Tissue Int., 73, 315.
57. Watts, N. B. and Diab, D. L. 2010, J. Clin. Endocrinol. Metab., 95, 1555.
58. Brufsky, A. M. 2008, Expert Opin. Pharmacother., 9, 1013.
59. Jahanzeb, M. and Hirsh, V. 2010, Semin. Oncol., 37 Suppl. 1, S45.

60. Boudou-Rouquette, P., Alexandre, J., Soubrane, O., Bertagna, X., and Goldwasser, F. 2009, Ann. Oncol., 20, 1747.
61. Kijima, T., Fujii, Y., Suyama, T., Okubo, Y., Yonese, J., and Fukui, I. 2008, Int. J. Urol., 15, 546.
62. Diel, I. J., Solomayer, E. F., Costa, S. D., Gollan, C., Goerner, R., Wallwiener, D., Kaufmann, M., and Bastert, G. 1998, N. Engl. J. Med., 339, 357.
63. Horie, N., Murata, H., Kimura, S., Takeshita, H., Sakabe, T., Matsui, T., Maekawa, T., Kubo, T., and Fushiki, S. 2007, Br. J. Cancer, 96, 255.
64. Ory, B., Heymann, M., Kamijo, A., Gouin, F., Heymann, D., and Redini, F. 2005, Cancer, 104, 2522.
65. Koto, K., Horie, N., Kimura, S., Murata, H., Sakabe, T., Matsui, T., Watanabe, M., Adachi, S., Maekawa, T., Fushiki, S., and Kubo, T. 2009, Cancer Lett., 274, 271.
66. Heymann, D., Ory, B., Blanchard, F., Heymann, M., Coipeau, P., Charrier, C., Couillaud, S., Thiery, J. P., Gouin, F., and Redini, F. 2005, Bone, 37, 74.
67. Kubista, B., Trieb, K., Sevelda, F., Toma, C., Arrich, F., Heffeter, P., Elbling, L., Sutterlüty, H., Scotlandi, K., Kotz, R., Micksche, M., and Berger, W. 2006, J. Orthop. Res., 24, 1145.
68. Kubo, T., Shimose, S., Matsuo, T., Sakai, A., and Ochi, M. 2008, Cancer Chemother. Pharmacol., 62, 111.
69. Benassi, M. S., Chiechi, A., Ponticelli, F., Pazzaglia, L., Gamberi, G., Zanella, L., Manara, M. C., Perego, P., Ferrari, S., and Picci, P. 2007, Cancer Lett., 250, 194.
70. Labrinidis, A., Hay, S., Liapis, V., Ponomarev, V., Findlay, D. M., and Evdokiou, A. 2009, Clin. Cancer Res., 15, 3451.
71. Meyers, P. A., Healey, J. H., Chou, A. J., Wexler, L. H., Merola, P. R., Morris, C. D., Laquaglia, M. P., Kellick, M. G., Abramson, S. J., and Gorlick, R. 2010, Cancer, [Epub ahead of print].
72. Kubo, T., Shimose, S., Matsuo, T., Tanaka, K., Yasunaga, Y., Sakai, A., and Ochi, M. 2006, J. Orthop. Res., 24, 1138.
73. Sonnemann, J., Eckervogt, V., Truckenbrod, B., Boos, J., Winkelmann, W., and van Valen, F. 2003, Anticancer Drugs, 14, 767.
74. Zhou, Z., Guan, H., Duan, X., and Kleinerman, E. S. 2005, Cancer, 104, 1713.
75. Odri, G. A., Dumoucel, S., Picarda, G., Battaglia, S., Lamoureux, F., Corradini, N., Rousseau, J., Tirode, F., Laud, K., Delattre, O., Gouin, F., Heymann, D., and Redini, F. 2010, Cancer Res., 70, 7610.
76. Murayama, T., Kawasoe, Y., Yamashita, Y., Ueno, Y., Minami, S., Yokouchi, M., and Komiya, S. 2008, Anticancer Res., 28, 2147.
77. Neville-Webbe, H. L., Evans, C. A., Coleman, R. E., and Holen, I. 2006, Tumour Biol., 27, 92.
78. Yano, S., Zhang, H., Hanibuchi, M., Miki, T., Goto, H., Uehara, H., and Sone, S. 2003, Clin. Cancer Res., 9, 5380.
79. Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Lüthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., and Boyle, W. J. 1997, Cell, 89, 309.
80. Wittrant, Y., Théoleyre, S., Chipoy, C., Padrines, M., Blanchard, F., Heymann, D., and Rédini, F. 2004, Biochim. Biophys. Acta, 1704, 49.
81. Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S. K., Fortun, Y., Redini, F., and Heymann, D. 2004, Cytokine Growth Factor Rev., 15, 457.
82. Croucher, P. I., Shipman, C. M., Lippitt, J., Perry, M., Asosingh, K., Hijzen, A., Brabbs, A. C., van Beek, E. J., Holen, I., Skerry, T. M., Dunstan, C. R., Russell, G. R., Van Camp, B., and Vanderkerken, K. 2001, Blood, 98, 3534.
83. Zhang, J., Dai, J., Qi, Y., Lin, D. L., Smith, P., Strayhorn, C., Mizokami, A., Fu, Z., Westman, J., and Keller, E. T. 2001, J. Clin. Invest., 107, 1235.

84. Michigami, T., Ihara-Watanabe, M., Yamazaki, M., and Ozono, K. 2001, Cancer Res., 61, 1637.
85. Hofbauer, L. C., Khosla, S., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Boyle, W. J., and Riggs, B. L. 2000, J. Bone Miner. Res., 15, 2.
86. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S. I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., and Higashio, K. 1998, Endocrinology, 139, 1329.
87. Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H. L., Xu, W., Lacey, D. L., Boyle, W. J., and Simonet, W. S. 1998, Genes Dev., 12, 1260.
88. Mitchner, N. A. and Harris, S. T. 2009, J. Fam Pract, 58, S45.
89. Terpos, E. and Voskaridou, E. 2008, Pediatr. Endocrinol. Rev., 6 Suppl. 1, 94.
90. Morony, S., Capparelli, C., Sarosi, I., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., and Kostenuik, P. J. 2001, Cancer Res., 61, 4432.
91. Bekker, P. J., Holloway, D., Nakanishi, A., Arrighi, M., Leese, P. T., and Dunstan, C. R. 2001, J. Bone Miner. Res., 16, 348.
92. Body, J. 2003, Cancer, 97, 859.
93. Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C., and Young, P. R. 1998, J. Biol. Chem., 273, 14363.
94. Lamoureux, F., Moriceau, G., Picarda, G., Rousseau, J., Trichet, V., and Rédini, F. 2010, Biochim. Biophys. Acta, 1805, 17.
95. Picarda, G., Lamoureux, F., Geffroy, L., Delepine, P., Montier, T., Laud, K., Tirode, F., Delattre, O., Heymann, D., and Rédini, F. 2010, Clin. Cancer Res., 16, 2363.
96. Abadie, A. and Wietzerbin, J. 2003, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1010, 117.
97. Virk, M. S., Alaee, F., Petrigliano, F. A., Sugiyama, O., Chatziioannou, A. F., Stout, D., Dougall, W. C., and Lieberman, J. R. 2010, Bone, [Epub ahead of print].
98. Feeley, B. T., Liu, N. Q., Conduah, A. H., Krenek, L., Roth, K., Dougall, W. C., Huard, J., Dubinett, S., and Lieberman, J. R. 2006, J. Bone Miner. Res., 21, 1571.
99. Holland, P. M., Miller, R., Jones, J., Douangpanya, H., Piasecki, J., Roudier, M., Dougall, W. C. 2010, Cancer Biol. Ther., 9, 539.
100. Body, J., Facon, T., Coleman, R. E., Lipton, A., Geurs, F., Fan, M., Holloway, D., Peterson, M. C., and Bekker, P. J. 2006, Clin. Cancer Res., 12, 1221.
101. Nanes, M. S. 2010, J. Bone Miner. Res., 25, 437.
102. Body, J., Lipton, A., Gralow, J., Steger, G. G., Gao, G., Yeh, H., and Fizazi, K. 2010, J. Bone Miner. Res., 25, 440.
103. Kimble, R. B., Bain, S., and Pacifici, R. 1997, J. Bone Miner. Res., 12, 935-941.
104. Kudo, O., Fujikawa, Y., Itonaga, I., Sabokbar, A., Torisu, T., and Athanasou, N. A. 2002, J. Pathol., 198, 220.
105. Rübe, C. E., van Valen, F., Wilfert, F., Palm, J., Schuck, A., Willich, N., Winkelmann, W., Jürgens, H., and Rübe, C. 2003, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 56, 1414.
106. Javelaud, D., Wietzerbin, J., Delattre, O., and Besançon, F. 2000, Oncogene, 19, 61.
107. Lagirand-Cantaloube, J., Laud, K., Lilienbaum, A., Tirode, F., Delattre, O., Auclair, C., and Kryszke, M. 2010, Biochem. Biophys. Res. Commun., 399, 705.
108. Bachmann, F., Nast, A., Sterry, W., and Philipp, S. 2010, Semin. Cutan. Med. Surg., 29, 35.
109. Askling, J., Fahrbach, K., Nordstrom, B., Ross, S., Schmid, C. H., and Symmons, D. 2010, Pharmacoepidemiol. Drug Saf., [Epub ahead of print].
110. Stanley, E. R., Berg, K. L., Einstein, D. B., Lee, P. S., Pixley, F. J., Wang, Y., and Yeung, Y. G. 1997, Mol. Reprod. Dev., 46, 4.
111. Yao, G., Wu, J., Sun, B., Troiano, N., Mitnick, M. A., and Insogna, K. 2003, Endocrinology, 144, 3677.
112. Biskobing, D. M., Fan, X., and Rubin, J. 1995, J. Bone Miner. Res., 10, 1025.

113. Arai, F., Miyamoto, T., Ohneda, O., Inada, T., Sudo, T., Brasel, K., Miyata, T., Anderson, D. M., and Suda, T. 1999, J. Exp. Med., 190, 1741.
114. Ross, F. P. and Teitelbaum, S. L. 2005, Immunol. Rev., 208, 88.
115. Sarma, U. and Flanagan, A. M. 1996, Blood, 88, 2531.
116. Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L. D., and Nishikawa, S. 1990, Nature, 345, 442.
117. Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A. W., Ahmed-Ansari, A., Sell, K. W., Pollard, J. W., and Stanley, E. R. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4828-4832.
118. Kodama, H., Yamasaki, A., Nose, M., Niida, S., Ohgame, Y., Abe, M., Kumegawa, M., and Suda, T. 1991, J. Exp. Med., 173, 269.
119. Dai, X., Ryan, G. R., Hapel, A. J., Dominguez, M. G., Russell, R. G., Kapp, S., Sylvestre, V., and Stanley, E. R. 2002, Blood, 99, 111.
120. D'Amelio, P., Roato, I., D'Amico, L., Veneziano, L., Suman, E., Sassi, F., Bisignano, G., Ferracini, R., Gargiulo, G., Castoldi, F., Pescarmona, G. P., and Isaia, G. C. 2010, Osteoporos Int., [Epub ahead of print].
121. Vandyke, K., Dewar, A. L., Diamond, P., Fitter, S., Schultz, C. G., Sims, N. A., and Zannettino, A. C. W. 2010, J. Bone Miner. Res., 25, 1759.
122. Vandyke, K., Fitter, S., Dewar, A. L., Hughes, T. P., and Zannettino, A. C. W. 2010, Blood, 115, 766.
123. Manthey, C. L., Johnson, D. L., Illig, C. R., Tuman, R. W., Zhou, Z., Baker, J. F., Chaikin, M. A., Donatelli, R. R., Franks, C. F., Zeng, L., Crysler, C., Chen, Y., Yurkow, E. J., Boczon, L., Meegalla, S. K., Wilson, K. J., Wall, M. J., Chen, J., Ballentine, S. K., Ott, H., Baumann, C., Lawrence, D., Tomczuk, B. E., and Molloy, C. J. 2009, Mol. Cancer Ther., 8, 3151.
124. Ohno, H., Kubo, K., Murooka, H., Kobayashi, Y., Nishitoba, T., Shibuya, M., Yoneda, T., and Isoe, T. 2006, Mol. Cancer Ther., 5, 2634.
125. Heath, D. J., Vanderkerken, K., Cheng, X., Gallagher, O., Prideaux, M., Murali, R., and Croucher, P. I. 2007, Cancer Res., 67, 202.
126. Hu-Lieskovan, S., Heidel, J. D., Bartlett, D. W., Davis, M. E., and Triche, T. J. 2005, Cancer Res., 65, 8984.
127. Toub, N., Bertrand, J., Tamaddon, A., Elhamess, H., Hillaireau, H., Maksimenko, A., Maccario, J., Malvy, C., Fattal, E., and Couvreur, P. 2006, Pharm. Res., 23, 892.

Annexe 2

Published OnlineFirst September 14, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-4272

Therapeutics, Targets, and Chemical Biology

Cancer Research

Zoledronic Acid as a New Adjuvant Therapeutic Strategy for Ewing's Sarcoma Patients

Guillaume A. Odri[1,2,3], Sophie Dumoucel[1,2,4], Gaëlle Picarda[1,2], Séverine Battaglia[1,2], François Lamoureux[1,2], Nadège Corradini[4], Julie Rousseau[1,2], Franck Tirode[5], Karine Laud[5], Olivier Delattre[5], François Gouin[1,2,3], Dominique Heymann[1,2], and Françoise Redini[1,2]

Abstract

Ewing's sarcoma (ES) is the second most frequent pediatric bone tumor also arising in soft tissues (15% of cases). The prognosis of patients with clinically detectable metastases at diagnosis, not responding to therapy or with disease relapse, is still very poor. Among new therapeutic approaches, bisphosphonates represent promising adjuvant molecules to chemotherapy to limit the osteolytic component of bone tumors and to protect from bone metastases. The combined effects of zoledronic acid and mafosfamide were investigated on cell proliferation, viability, apoptosis, and cell cycle distribution of human ES cell lines differing in their p53 and p16/ink4 status. ES models were developed to reproduce both soft tissue and intraosseous tumor development. Mice were treated with 100 μg/kg zoledronic acid (two or four times per week) and/or ifosfamide (30 mg/kg, one to three cycles of three injections). ES cell lines showed different sensitivities to zoledronic acid and mafosfamide at the cell proliferation level, with no correlation with their molecular status. Both drugs induced cell cycle arrest, but in the S or G_2M phase, respectively. *In vivo*, zoledronic acid had no effect on soft tissue tumor progression, although it dramatically inhibited ES development in bone. When combined with ifosfamide, zoledronic acid exerted synergistic effects in the soft tissue model: Its combination with one cycle of ifosfamide resulted in an inhibitory effect similar to three cycles of ifosfamide alone. This very promising result could allow clinicians to diminish the doses of chemotherapy.

Cancer Res; 70(19); 7610–9. ©2010 AACR.

Introduction

Ewing's sarcoma (ES) is the second most frequent primitive malignant bone tumor in children and adolescents after osteosarcoma. Its frequency is around three cases per million in people under 20 years old, with a peak incidence in the second decade of life (1). Current treatments developed in the Euro-EWING99 protocol consist of neoadjuvant chemotherapy, local surgical resection with limb salvage, followed by adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy. These treatments lead to a 70% overall survival, but it is less than 40% in patients with metastasis and only 15% for bone metastasis. Radiographs show marked osteolysis with periosteal reaction and frequent soft tissue invasion around the primary tumor. ES are included in the primitive neuroectodermal tumors (PNET) sharing a chromosomal translocation involving the *EWS* gene on chromosome 22 with a gene of the erythroblast transformation sequence (ETS) family (2). In 85% of cases, the translocation t(11;22)(q24;q12) occurs leading to the *EWS-FLI1* fusion gene, which behaves as an oncogene.

Bisphosphonates are PP_i derivatives that selectively concentrate at the bone resorption surface (3) and induce osteoclast apoptosis, resulting in inhibition of bone resorption (4). In addition, they inhibit tumor cell adhesion, invasion, and proliferation, and induce apoptosis in a variety of human tumor cell lines *in vitro* including osteosarcoma (5–10). Among all bisphosphonates tested, zoledronic acid, one of the third-generation nitrogen-containing bisphosphonates, shows the greatest inhibitory effects on both osteoclast activity and tumor cell proliferation (11). Quite appropriately, these agents are increasingly used alongside anticancer treatments to prevent skeletal complications and relieve bone pain. Concerning primary bone tumors, zoledronic acid has been recently combined with conventional chemotherapy and surgery in the French OS2006 phase III randomized clinical trial for osteosarcoma treatment, after promising preclinical results had been found on survival and tumor growth (10).

The rationale for the therapeutic use of zoledronic acid in bone tumors is linked to the existence of a stimulatory

Authors' Affiliations: [1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U957; [2]Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822; [3]Service d'Orthopédie, CHU Hôtel Dieu; [4]Service de Pédiatrie, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France; and [5]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U830, Institut Curie, Paris, France

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

Corresponding Author: Françoise Rédini, EA3822-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U957, Pathophysiology of Bone Resorption and Therapy of Primary Bone Tumors, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France. Phone: 33-240-412-842; Fax: 33-240-412-860; E-mail: francoise.redini@univ-nantes.fr.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4272

©2010 American Association for Cancer Research.

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst September 14, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-4272

feedback loop (the "vicious cycle") between tumor cell proliferation and bone resorption during tumor development in bone (12). Thus, zoledronic acid may have complementary actions on bone tumors: an indirect antitumor effect by inhibiting osteoclastogenesis and a direct action on tumor cells. To date, only one preclinical study reported the therapeutic benefit of using zoledronic acid in ES, showing an inhibitory effect on osteolysis; however, no study on survival and tumor volume has been done (13). In the present study, *in vitro* experiments were performed to evaluate the effect of zoledronic acid on eight human ES cell lines, all expressing the EWS-FLI1 fusion gene but differing in their molecular characteristics (p53 mutation, p16/ink4 deletion). Then, *in vivo* experiments were realized to study the effects on tumor progression and animal survival, as a single therapeutic agent or in combination with ifosfamide, a conventional drug used in ES clinical protocols. Two different animal models of ES were developed, reproducing both clinical behaviors of ES: soft tissue or bone development (15% and 85%, respectively, of total ES).

The objectives were to determine the potential therapeutic efficacy of zoledronic acid alone or in combination with chemotherapy that could help reduce the chemotherapy dosing regimen in preclinical and then clinical protocols for ES.

Materials and Methods

Cell lines

Human ES cell lines kindly provided by Dr. S. Burchill (Children's Hospital, Leeds, United Kingdom; A673, TC32, SKES1, SKNMC, and RDES cells) or by Dr. O. Delattre (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U830, Paris, France; EW24, TC71, and EW7) were used. They all contain the EWS/FLI1 chromosomal translocation EWS-FLI1 but differ in their p53 and p16/ink4 status (Supplementary Data). A673, TC32, SKES1, and RDES cells were cultured in DMEM (BioWhittaker) with 10% fetal bovine serum (Hyclone). SKNMC, EW24, TC71, EW7 cell lines were cultured in RPMI (BioWhittaker) with 10% fetal bovine serum. In addition, EW7 cells require type I collagen to grow.

Cell viability assay

Three thousand cells seeded in 96-well plates were treated with 0.1 to 100 μmol/L zoledronic acid [1-hydroxy-2-(1*H*-imidazole-1-yl) ethylidene-bisphosphonic acid supplied as the disodium salt by Novartis Pharma AG] or 0.1 to 50 μg/mL mafosfamide (Baxter Oncology), or by the combination of both for 24 to 72 hours. Cellular activity was determined by the sodium 3′-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate assay (Roche Molecular Biomedicals) and measured by a Victor multilabel plate reader (Perkin-Elmer) at 490 nm.

Trypan blue counting

Fifteen thousand cells seeded in 24-well plates were treated for 72 hours as above. Cells and culture medium were collected after trypsinization, and trypan blue (Sigma) was added. The cells in each well were then manually counted to determine the ratio of dead cells to viable cells.

Apoptosis analysis

Caspase-3 activity was determined using the CaspACE assay system fluorometric kit (Promega). Fifteen thousand cells seeded in 24-well plates were treated as described above for 6 to 24 hours or with 1 μmol/L staurosporine for 6 hours as a positive control before lysis. Caspase-3 activity is reported per microgram protein as determined with copper sulfate diluted in bicinchonic acid (both from Sigma).

Cell cycle analysis

Two hundred thousand cells were seeded in 25-cm^2 flasks, then test compounds were added for 24 to 72 hours. Cells were collected with the supernatant and centrifuged at 800 × *g* for 5 minutes. The cells in the pellet were fixed in ethanol, centrifuged, and rinsed twice. The final pellet was resuspended in citrate phosphate buffer, incubated for 30 minutes at room temperature, and then centrifuged. The pellet was finally rinsed with PIB-RNase (DPBS+ Triton X-100 + 0.5 mol/L EDTA). After 30 minutes of incubation at 37°C, 50 μg of propidium iodine were added to each tube. After a final incubation at 4°C for 20 minutes, cell cycle analysis was performed using a FC500 flow cytometer.

Mouse models of ES

All procedures involving mice [their housing in the Experimental Therapeutic Unit at the Faculty of Medicine of Nantes (France) and care, the method by which they were anesthetized and killed, and all experimental protocols] were conducted in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA.PdL.06). Four-week-old male athymic mice were purchased from Harlan. The soft tissue ES model was induced by an i.m. injection of 2×10^6 ES cells next to the tibia, leading to a rapidly growing tumor in soft tissue with secondary contiguous bone invasion. For the bone model, the same number of cells was injected in the medullar cavity of the tibia, leading to a slow-growing intraosseous tumor that progressively destroyed the cortical bone and invaded the surrounding soft tissues. Mice were anesthetized by inhalation of a combination of isoflurane/air (1.5%, 1 L/min) and buprenorphine (0.05 mg/kg; Temgésic, Schering-Plough). Mice were randomly assigned to treatment groups 1 day after tumor cell injection. The tumor volume was calculated by using the formula $L \times (l^2)/2$, where L and l are the longest and the smallest perpendicular diameter, respectively. The mice died either spontaneously or were killed by CO_2 inhalation when the tumor volume exceeded 6,000 mm^3. The tumor-bearing hind limb was dissected and kept in 10% paraformaldehyde for radiography, micro–computed tomography (micro-CT), and histologic analyses.

Dosing regimens and experimental protocols

Zoledronic acid prepared in PBS was injected s.c. at 100 μg/kg, this dose being equivalent to the clinical dose of 4 mg every 3 to 4 weeks (14). Zoledronic acid treatment started at day 1 after tumor cell inoculation and was

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst September 14, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-4272

administered either twice a week with a 3-day interval or on 4 consecutive days each week. Ifosfamide (ASTA Medica) was injected i.p. at a final dose of 30 mg/kg. The first ifosfamide sequence, starting 10 days after tumor cell injection when the tumor was detectable, comprised a 3-day treatment with a 24-hour interval. A second and third cycle was administrated 1 and 2 weeks later depending on the protocols. The mice in the control group were injected with an equivalent volume of PBS. The protocol was determined in accordance with clinicians to start the treatment at a tumor stage comparable with that of patients at their first visit to an oncologist.

Radiographic analysis

Radiographs on anesthetized animals [xylazine (Rompun)-ketamine (Imalgène 500), 8% and 13%, respectively, in PBS; 100 μL/10 g] were taken every week and at necropsy with a PLANMED Sophie mammography apparatus (SN RAH 40710).

Micro-CT analysis

Micro-CT tomography was performed with a high-resolution X-ray micro-CT system for small-animal imaging SkyScan-1072. Three-dimensional reconstructions were built for each hind limb bone to quantify and compare the bone microarchitecture parameters between control and treated animals.

Bone and tumor histology

After sacrifice, the tibiae were conserved and fixed in 10% formalin, decalcified (PBS-EDTA), and embedded in paraffin for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining: 4-μm sections were cut and stained for TRAP by incubating for 1 hour in a solution of 1 mg/mL napthol-AS-TR-phosphate, 60 mmol/L *N,N*-dimethylformamide, 100 mmol/L sodium tartrate, and 1 mg/mL fast red TR salt solution (all from Sigma). A hematoxylin counterstain was performed. Apoptotic cells in primary bone tumor were determined using the *in situ* cell death detection kit (Roche Diagnostics), based on the terminal-deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method. TUNEL-positive cells were counted by microscopic examination on four to six histologic sections per animal.

Statistical analysis

Regression models were used to assess the effect of zoledronic acid and mafosfamide on cell proliferation of each cell line *in vitro*. Splines developed with generalized additive models were used to look for nonlinear effects of both chemotherapies on each cell line (15). In case of important departure from linearity, a log transformation was used and linearity was assessed again. When linearity was adequate, linear regression models were constructed to independently test the effect of each chemotherapy and search for an interaction. Nonparametric tests (Kruskal-Wallis test) with Dunn's post hoc test were used for the other *in vitro* experiments. Tumor volume averages were also compared using the nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. Mice survival were estimated with the Kaplan-Meier estimator and compared with the log-rank test. The level of statistical significance was chosen at 0.05; all tests were bilateral. R software and Excel software were used for these analyses.

Results

In vitro experiments

Cell viability. Figure 1A summarizes the sensitivity to zoledronic acid and mafosfamide of eight human ES cell lines, but no correlation with p53 status could be evidenced. Results obtained with the A673 cell line are presented as an example in all the forthcoming figures. A linear effect of zoledronic acid and mafosfamide was found on A673 cell proliferation after log transformation of the data (Fig. 1B; $P < 0.0001$), revealing that sensitivity of A673 cells to zoledronic acid and mafosfamide is concentration dependent with an IC_{50} of 3 μmol/L and 5 μg/mL, respectively. When these molecules were combined, no synergistic effect on ES cell proliferation could be shown by covariate analysis whatever the drug combination tested (Fig. 1C).

Cell death—apoptosis. Studies on cell viability were performed using trypan blue on cells treated by zoledronic acid and mafosfamide for 72 hours. Figure 2A shows that the proportion of dead cells increased with increasing zoledronic acid and mafosfamide concentration. To characterize the cell mechanisms involved in this process, apoptosis and cell cycle were analyzed. An increase in caspase-3 activation was observed in cells treated with both drugs but in a lower extent with zoledronic acid than mafosfamide (Fig. 2B). However, the use of the pangenomic caspase inhibitor Z-VAD-FMK did not abrogate the zoledronic acid–induced inhibition of cell proliferation (Supplementary Data). Cell cycle distribution analyzed by flow cytometry revealed that zoledronic acid treatment increases the proportion of A673 cells in the S phase (34% versus 18% in controls) whereas mafosfamide blocks cells in the G_2M phase (84% versus 33% in untreated cells; Fig. 2C). Therefore, this therapy combination may overcome the potential resistance to either drug.

Experimental *in vivo* protocols

Two experimental models of ES were developed (in soft tissue and in bone) to reproduce as closely as possible the pathologic variants observed in patients. The *in vivo* experimental results obtained in the tumor model induced by A673 cells are presented in this article, but were confirmed in at least another ES model (Supplementary Data).

Zoledronic acid and chemotherapy exert a synergistic effect in the soft tissue model of ES. Zoledronic acid treatment of mice bearing ES, induced in soft tissue by using A673 or TC71 cells, did not inhibit tumor progression regardless of the dose used (10, 50, or 100 μg/kg; two or four times a week for 4 weeks, beginning at day 1; data not shown). Zoledronic acid was then combined with ifosfamide following two dosing regimens (Fig. 3A): zoledronic acid (100 μg/kg twice a week, beginning at day 1) and three courses of ifosfamide, each consisting of three injections of 30 mg/kg ifosfamide at 24-hour intervals beginning when the tumor was detectable (around day 10, then one course per week; left), and zoledronic acid (100 μg/kg twice a week from day 1) and one

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst September 14, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-4272

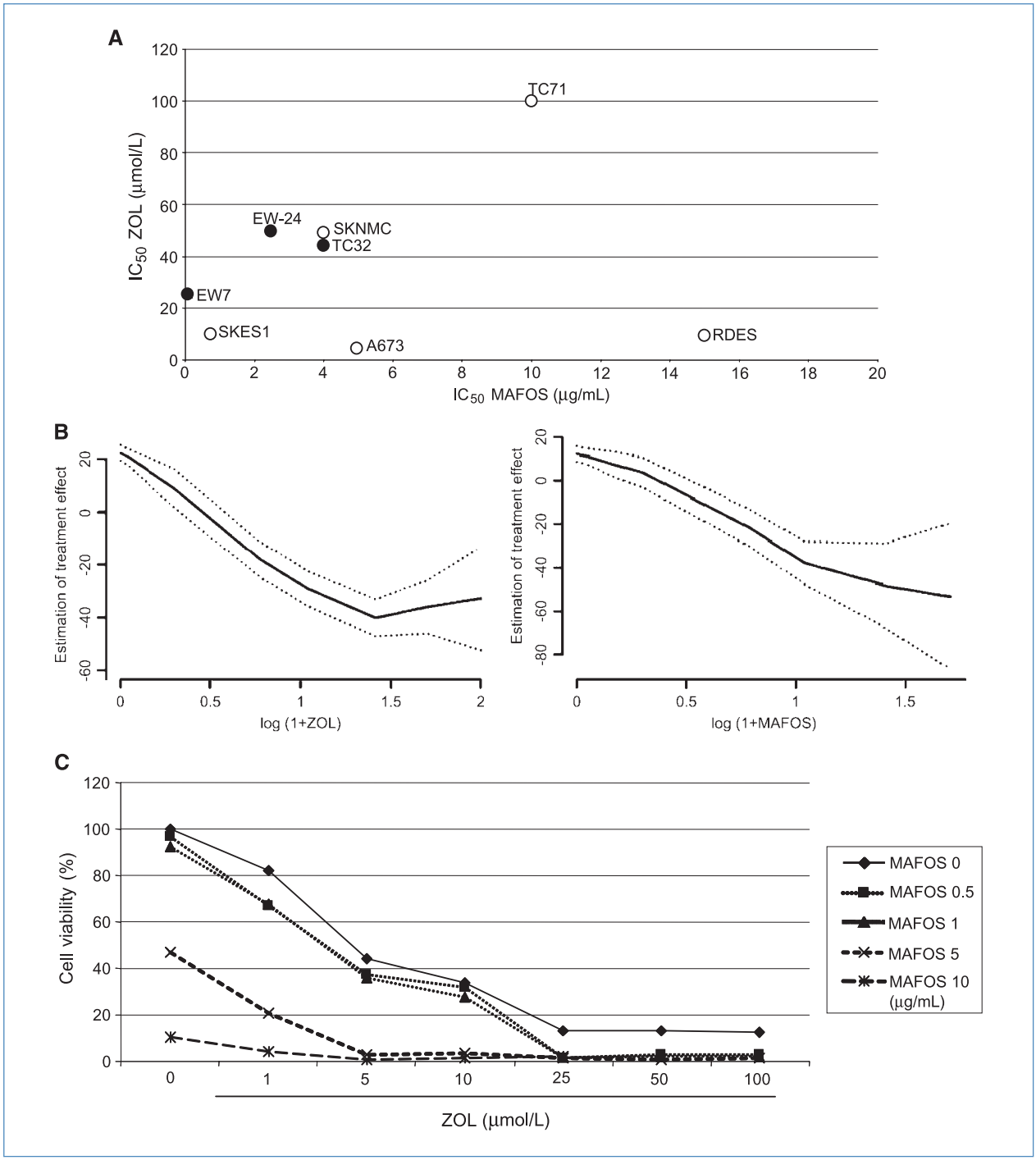


Figure 1. *In vitro* effects of zoledronic acid (ZOL) and/or mafosfamide (MAFOS) on ES cell proliferation. A, ES cell line sensitivity for zoledronic acid and mafosfamide expressed as IC_{50} values. ●, wild-type or functional p53; ○, mutated p53. B, dose-dependent effects of zoledronic acid or mafosfamide alone on human A673 cell line proliferation for 72 hours, represented as linear regression curves. C, effects of the zoledronic acid and mafosfamide combination on A673 cell proliferation (48 hours).

course of ifosfamide (30 mg/kg beginning at day 10; right). In the first set of experiments, zoledronic acid alone had no effect on tumor development, ifosfamide alone decreased tumor progression by 27% at day 25 compared with control mice ($P < 0.05$), and the combination of both drugs exerted an effect similar to that of ifosfamide alone (Fig. 3A, left). In the second set of experiments, zoledronic acid and ifosfamide alone had no significant effect on tumor progression,

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst September 14, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-4272

but the combination reduced the mean tumor volume by 54% at day 25 compared with untreated animals ($P < 0.01$; Fig. 3A, right), a higher extent than three courses of ifosfamide alone (Fig. 3A, left). Taken together, both these experiments show that the combination of zoledronic acid with a single course of ifosfamide exerts a greater inhibitory effect on tumor progression than three courses of ifosfamide alone, suggesting that chemotherapy combined with bisphosphonate may allow the reduction of chemotherapy doses. Complementary radiography (Fig. 3B) and micro-CT (Fig. 3C) analyses showed a global reduction of bone mineralization, marked osteolysis with disruption of cortical continuity leading to multiple fractures in untreated mice bearing ES (Fig. 3B and C). The severity of these bone lesions was strongly diminished in zoledronic acid–treated mice (alone or combined with ifosfamide), indicating that zoledronic acid protects bone from tumor-associated osteolysis. Quantitation of specific bone volume [BV/total volume (TV)] confirmed these observations: BV/TV of tibia from zoledronic acid– and zoledronic acid + ifosfamide–treated mice is strongly increased (53.41% and 53.24%) compared with the ifosfamide and untreated groups (33% and 25%, respectively; Fig. 3C), being comparable with normal tibia (52.1%). Histology analysis confirmed the protective effect of zoledronic acid on bone, leading to the prevention of tumor cell invasion in the bone marrow (Fig. 3D). However, it cannot protect against tumor progression in soft tissue; thus, chemotherapy is needed in combination with zoledronic acid in this case.

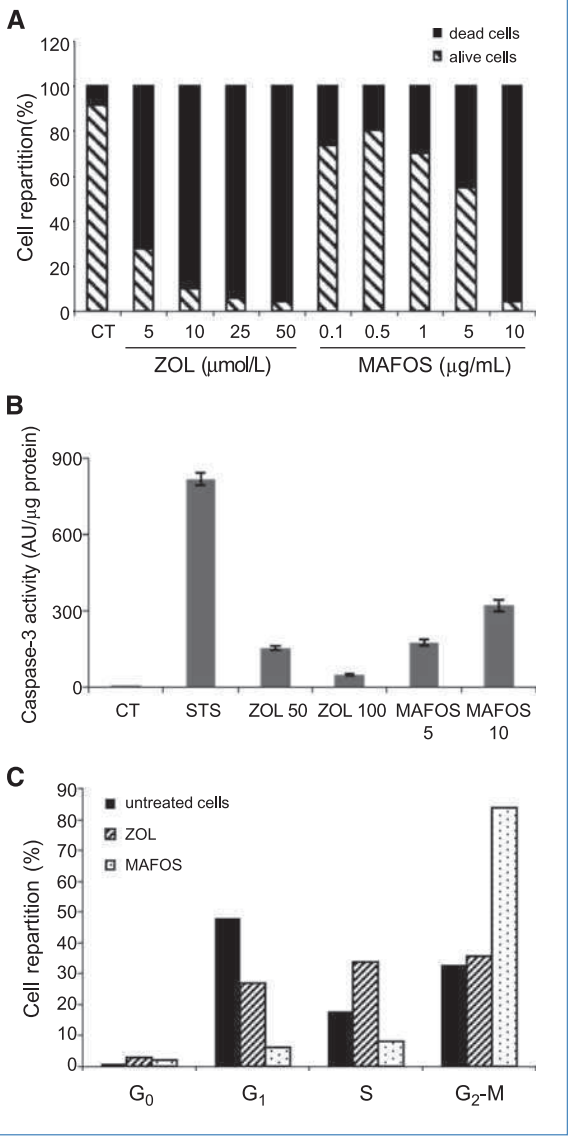


Figure 2. Effects of zoledronic acid or mafosfamide on ES cell death. A, A673 cell viability analyzed by trypan blue staining at 5 to 50 μmol/L (zoledronic acid) or 0.1 to 10 μg/mL (mafosfamide) for 72 hours. B, caspase-3 activity per microgram of protein in A673 cells treated or not with zoledronic acid (5 or 10 μmol/L) or mafosfamide (5 or 10 μg/mL). Staurosporine was used as a positive control (1 μmol/L, 6 hours; ***, $P < 0.001$ compared with controls). C, cell cycle distribution in the absence or presence of 5 μmol/L zoledronic acid or 5 μg/mL mafosfamide for 48 hours.

Zoledronic acid alone prevents ES development in bone. This model closely reproduces ES development in patients, with a slower tumor growth than that observed in the previous model in soft tissue (42 and 27 days, respectively, to reach a tumor volume of 4,000 mm^3). Figure 4A shows that zoledronic acid alone (100 μg/kg, four times a week for 9 weeks) strongly inhibits tumor development as shown by a 97% reduction in mean tumor volume 46 days after tumor cell inoculation. The corresponding radiography analyses showed that zoledronic acid protects bone from tumor cell invasion compared with untreated animals (Fig. 4B). This result was confirmed at the osteoclast level as revealed by TRAP staining (Fig. 4C): Osteoclasts were clearly evident at the tumor site in control animals but were absent in zoledronic acid–treated mice. The direct effect of zoledronic acid on ES cell apoptosis was confirmed *in vivo* by increased TUNEL staining in the tumors from the zoledronic acid–treated group compared with untreated animals (Fig. 4D).

Zoledronic acid combined with ifosfamide prevents tumor relapse in bone. The combination of zoledronic acid (100 μg/kg, twice a week) and ifosfamide (3 courses of 3 × 30 mg/kg) was tested for 4 weeks in the above-described bone model. Zoledronic acid alone exerted a stronger inhibitory effect on tumor progression (–65%, $P < 0.01$ at day 30 posttumor cell inoculation) than ifosfamide alone (–45% at the same day, $P < 0.01$; Fig. 5A). Moreover, ifosfamide efficacy declined over time, and relapse was observed from day 18. When zoledronic acid was combined with ifosfamide, the mean tumor volume curve could be superimposed on that of zoledronic acid alone, suggesting that zoledronic acid combined with ifosfamide prevents the early relapse that occurs with ifosfamide alone.

At the bone level, micro-CT analysis showed impressive bone degradation and disorganized bone remodeling in mice bearing ES (untreated) compared with naïve control animals (no tumor; Fig. 5B). Animals treated with ifosfamide showed the same extent of bone degradation. When mice were treated with zoledronic acid alone or combined with ifosfamide, a protection from bone lesions was observed with an absence of

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst September 14, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-4272

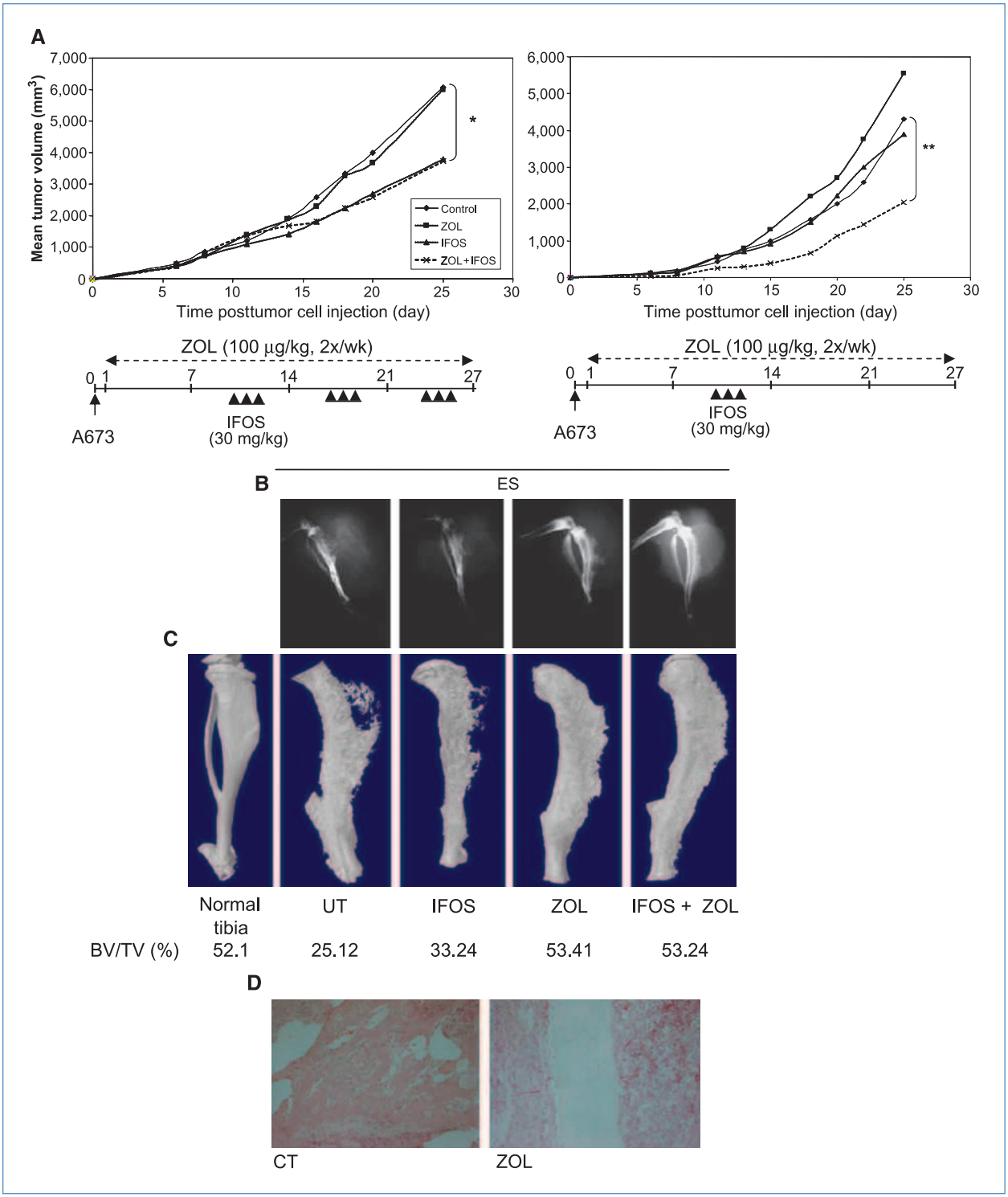


Figure 3. Synergistic effect of zoledronic acid and ifosfamide (IFOS) on the development of ES in soft tissue. A, A673 ES cells (2×10^6) were injected into the tibial muscle of immunodeficient mice. Animals were then divided into four groups (eight mice per group) designed as control, zoledronic acid (100 μg/kg, two times per week beginning at day 1 after tumor cell injection), ifosfamide [30 mg/kg, three cycles of three injections (left) or one cycle of injection (right)], and zoledronic acid + ifosfamide. The tumor volume was reported as mean tumor volume per group (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). B, radiography analysis of osteolytic lesions. C, micro-CT analysis of tibia from normal mice or mice bearing ES induced by A673 cell injection as described above, treated (ifosfamide, zoledronic acid, and ifosfamide + zoledronic acid) or untreated (UT). Specific bone volume is indicated in each case (BV/TV). D, histologic analysis of the cortical bone in mice treated with zoledronic acid (hematoxylin eosin staining, magnification ×100).

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst September 14, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-4272

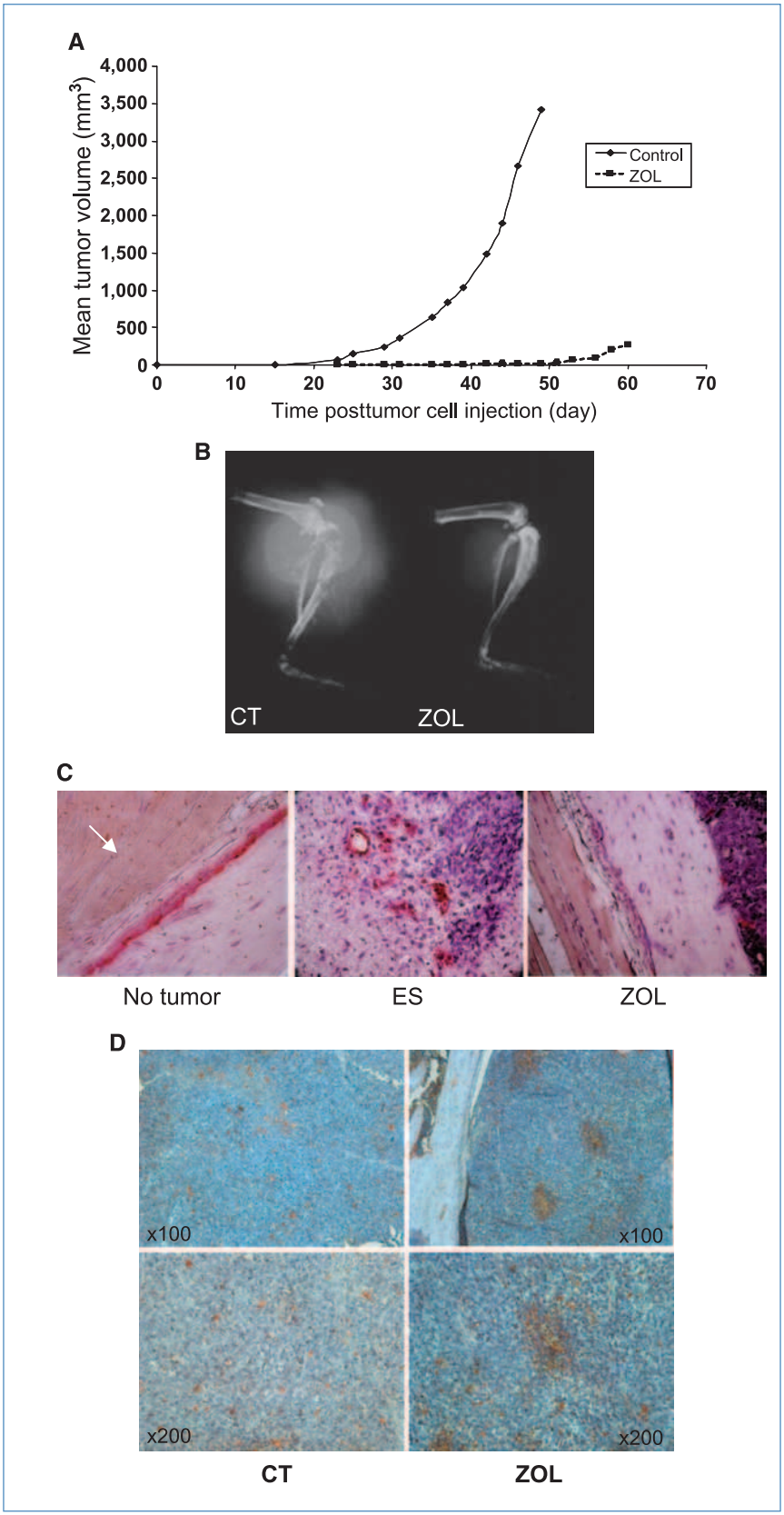


Figure 4. Monotherapy with zoledronic acid prevents ES development in bone. A, A673 ES cells (2×10^6) were injected in the medullar cavity of the tibia of immunodeficient mice. Mean tumor volume of control and zoledronic acid (100 μg/kg, two times per week beginning at day 1 after tumor cell injection) groups (8–10 mice per group) is reported. B, radiography analysis of osteolytic lesions in one representative mouse of each group. C, TRAP staining of osteoclasts in mice treated with zoledronic acid compared with untreated mice bearing ES tumor and normal mice (no tumor). D, TUNEL staining was performed on 6-μm sections of A673 ES tumors treated or not with zoledronic acid (magnification ×100 and ×200).

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst September 14, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-4272

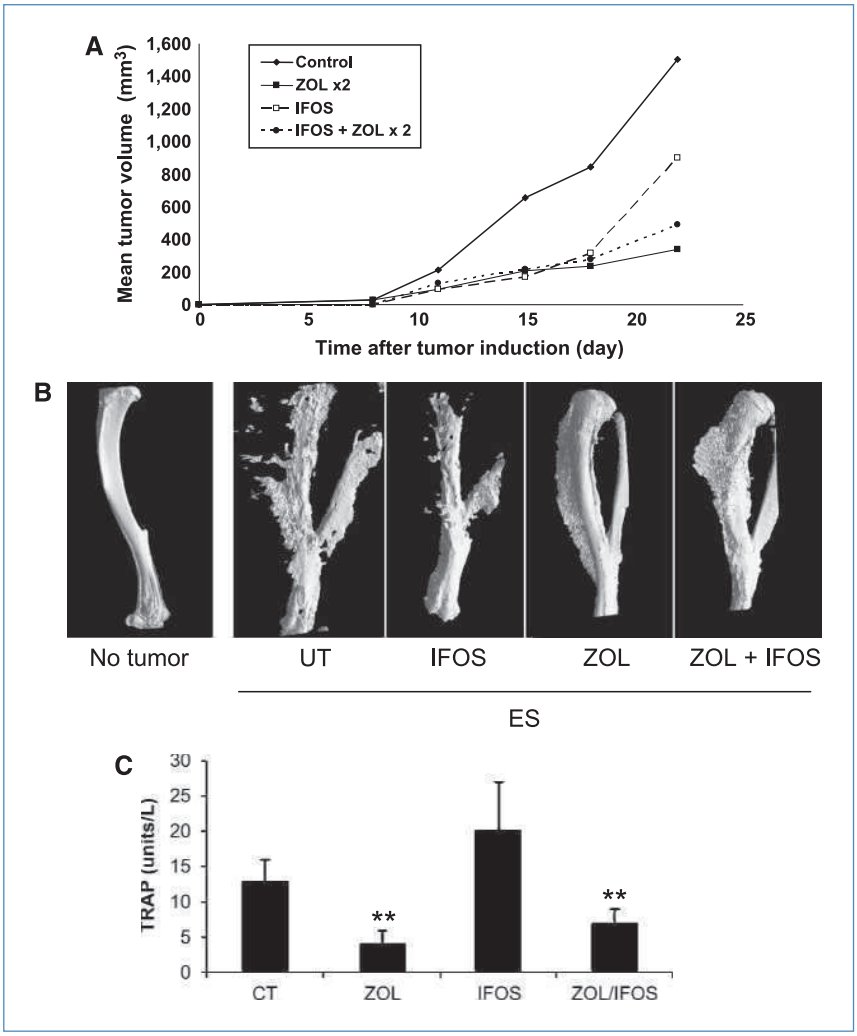


Figure 5. Effect of zoledronic acid combined with ifosfamide on the development of ES in bone. A, A673 ES cells (2×10^6) were injected in the medullar cavity of the tibia of immunodeficient mice, then mice were assigned to control, zoledronic acid (100 μg/kg, two times per week beginning at day 1 after tumor cell injection), ifosfamide (30 mg/kg, 3 courses of 3 injections), and zoledronic acid + ifosfamide (n = 8 per group) groups. The tumor volume was reported as mean tumor volume per group. B, bone lesions were analyzed by micro-CT and compared between the bone of naive mice (no tumor), untreated mice bearing ES (CT), mice treated with ifosfamide or zoledronic acid alone, and zoledronic acid combined with ifosfamide. C, the effect of zoledronic acid alone or in combination with ifosfamide on osteoclast number was studied by TRAP5b activity in the serum of ES-bearing mice at day 22 (**, $P < 0.01$ compared with controls).

cortical disruption, increased cortical bone density, and lack of fractures (Fig. 5B). In these cases, the bone architecture was conserved, even with extensive ectopic bone formation in the zoledronic acid + ifosfamide group. These results were confirmed by measuring TRACP5b levels in the serum of corresponding mice. TRACP5b levels were indeed significantly diminished in both the zoledronic acid–alone and zoledronic acid + ifosfamide–treated groups compared with untreated controls or ifosfamide-alone groups: 4 and 6 units/L versus 12.5 and 20.5 units/L ($P < 0.001$; Fig. 5C), respectively.

Discussion

Among the new investigational approaches to improve therapy in ES and OS, bone-specific agents may improve survival and/or quality of life on "continuation" therapy. This would include regimens with fewer short- and long-term side effects and better results for tumors in difficult locations and patients with recurrent disease.

Among primary bone tumors, giant cell tumors of bone are characterized by a major osteoclastic component that justifies the clinical use of bisphosphonates in this pathology (16). Because osteosarcoma and ES cells are metabolically active bone cells (17, 18), studies with bisphosphonates and more specifically nitrogen-containing bisphosphonates have shown selective uptake and "poisoning" of these cells (19–23). We have previously shown that zoledronic acid is able to limit tumor progression in a rat model of osteosarcoma, to prevent tumor relapse compared with chemotherapy alone and to prevent osteolytic lesions (10). Our results have provided the rationale for the French randomized clinical protocol OS2006, which combines zoledronic acid with conventional therapy for adult and pediatric patients. Since then, other fundamental or preclinical studies have confirmed the beneficial effect of bisphosphonates in osteosarcoma (20–25).

The limits of ES therapy in the current European protocol EuroEWING99 mainly concern patients with bone or medullar metastases. Therefore, bisphosphonates may be

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst September 14, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-4272

useful as adjuvant therapy to target osteoclasts and consequently to diminish the bone lesions associated with these tumors, or to prevent the development of bone metastases (26, 27). Very few studies specifically concern bisphosphonate action in ES. Two previous studies have shown cytotoxic and growth-inhibitory effects of bisphosphonates in ES/PNET cell lines and xenograft models (21, 25, 28). Another study has reported the inhibition of ES/PNET tumor growth by zoledronic acid, apoptosis induction, and alteration of the tumor lytic phenotype (13). However, all cell lines used to induce ES in these studies possess the p53 mutation and therefore are not representative of ES tumors in which p53 mutations are relatively uncommon (~13% of patients; ref. 29).

We thus wanted to extend these studies by using eight human ES cell lines, all expressing the fusion gene *EWS-FLI1* but differing in their p53 (mutation) and p16/ink4 (homozygous/hemizygous deletion) status. The results presented here, showing that all these ES cell lines were sensitive to zoledronic acid whatever their p53 mutation or p16 deletion status, are encouraging for treating a large cohort of ES patients. The data on ES cell growth inhibition can be compared with others obtained with different bisphosphonates: Sonnemann and colleagues' study showed that 50 μmol/L pamidronate reduced cell number by up to 80% in eight ES cell lines, whereas clodronate had limited effects, reducing cell viability by maximally 40% at 1 mmol/L (28). To investigate the mechanism of action of zoledronic acid in ES, apoptosis and cell cycle analyses were performed. The results showed that zoledronic acid inhibits cell viability by blocking the cell cycle in S-G_2M phase, as previously described for osteosarcoma cells (30). In addition, a low caspase-3 activation was shown in ES cells, more probably reflecting a postmitotic process linked to the cell cycle blockade rather than a caspase-dependent mechanism. Indeed, the use of the pangenomic caspase inhibitor Z-VAD-FMK had no effect on zoledronic acid–induced of ES cell proliferation.

A subsequent step was to confirm the inhibitory effects of zoledronic acid *in vivo*. In patients, ES tumors mainly develop in bone (85% of cases), but it can also occur as isolated soft tissue tumors. Because zoledronic acid targets not only osteoclasts but also the tumor cells themselves *in vitro*, this therapy was also tested in a soft tissue model. Interestingly, zoledronic acid strongly inhibited tumor progression in bone (–97% after 9 weeks of treatment in the A673 model), this result being in accordance with the beneficial effects of bisphosphonate widely reported in several experimental models of bone lesions associated with primary or secondary tumors (10, 14, 31, 32). On the contrary, the same doses of zoledronic acid had no inhibitory effect on ES progression in soft tissue. This result is consistent with data from other models of soft tissue tumors or visceral metastases. Indeed, the inhibitory effect of bisphosphonate on tumor growth is still inconsistent for soft tumors (33–35). Even at the clinical level, few data have reported an antitumor effect of zoledronic acid against visceral metastases (36, 37), and conflicting results have been highly discussed (38). In our ES models, it is clear that the doses of zoledronic acid that prevented tumor development in bone were unable to significantly influence soft tissue tumor growth. The best efficacy of zoledronic acid in bone may be explained by the fact that bisphosphonates concentrate in bone due to their high tropism for the calcified bone matrix. The efficacy of zoledronic acid may be therefore potentiated in bone tissue by a dual mechanism: antitumoral and antibone resorption activities. Higher concentrations could be tested in soft tissue models, but would be irrelevant to clinical dosing regimens.

For many years, bisphosphonates have been used as an adjuvant to chemotherapy in several clinical protocols (39). *In vitro* and *in vivo* studies showed a synergistic interaction between bisphosphonates and chemotherapeutic agents, augmenting their efficacy (23, 25, 40, 41) and (re-)sensitizing to chemotherapy (22), to diminish side effects or to improve the function and quality of life (42). In our study, we showed that zoledronic acid exerts synergistic activity with low doses of ifosfamide in soft tissue ES, inducing the same extent of tumor growth inhibition as high doses of ifosfamide alone. This result suggests that chemotherapy dosing regimens could be diminished in the presence of adjuvant bisphosphonate. In the case of intraosseous ES tumor, zoledronic acid alone exerted strong antitumor activity; however, when lower doses were combined with chemotherapy, zoledronic acid seemed to prevent the tumor recurrence observed with one course of ifosfamide. Here, the combination of bisphosphonate with chemotherapy again improved the therapeutic response to ES.

Because ES is characterized by marked bone resorption, therapeutics that target osteoclasts such as bisphosphonates are promising. Our study shows, by complementary fundamental and preclinical analyses, that zoledronic acid represents a promising therapeutic agent for ES patients as a first-line therapy in combination with chemotherapy to limit bone lesions and to prevent bone tumor relapse, and also as an adjuvant therapy for the treatment of bone or medullary metastases. This is particularly important in the context of the EuroEWING99 protocol, which is nearing completion, and for the choice of new future strategies, especially for patients at high risk of relapse.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank C. Bailly, C. Le Corre, A. Lefèbvre, and M-A. Muller from the Experimental Therapy Unit Platform and P. Pilet from the microscopy platform of the IFR26 (Nantes, France) for their technical assistance; Dr. David Biau (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S 717, Paris, France) for statistical consultation; and Dr. Jonathan Green (Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) for critical review.

Grant Support

Novartis Pharma (Rueil-Malmaison, France), "Fédération Nationale Enfants et Santé", "Société Française de lutte contre les Cancers et les leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent", and "Institut National du Cancer" (grant no. R09018NN).

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 11/25/2009; revised 05/07/2010; accepted 05/25/2010; published OnlineFirst 09/14/2010.

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst September 14, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-4272

References

1. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, et al. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. Oncologist 2006;11:503–19.
2. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir G. Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma. C R Seances Acad Sci III 1983;296:1101–3.
3. Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. Comparison of the distribution of 3*H*-alendronate and 3*H*-etidronate in rat and mouse bones. Bone 1996;19:281–90.
4. Sato M, Grasser W, Endo N, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. J Clin Invest 1991;88:2095–105.
5. Verdijk R, Franke HR, Wolbers F, Vermes I. Differential effects of bisphosphonates on breast cancer cell lines. Cancer Lett 2007;246:308–12.
6. Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Russell RG, Croucher PI. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. Br J Haematol 1997;98:665–72.
7. Tassone P, Tagliaferri P, Viscomi C, et al. Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells *in vitro*. Br J Cancer 2003;88:1971–8.
8. Riebeling C, Forsea AM, Raisova M, Orfanos CE, Geilen CC. The bisphosphonate pamidronate induces apoptosis in human melanoma cells *in vitro*. Br J Cancer 2002;87:366–71.
9. Lee MV, Fong EM, Singer FR, Guenette RS. Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. Cancer Res 2001;61:2602–8.
10. Heymann D, Ory B, Blanchard F, et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. Bone 2005;37:74–86.
11. Coleman RE. Risks and benefits of bisphosphonates. Br J Cancer 2008;98:1736–40.
12. Roodman GD. The biology of osteoclast activation in cancer. J Clin Oncol 2001;19:3562–71.
13. Zhou Z, Guan H, Duan X, Kleinerman ES. Zoledronic acid inhibits primary bone tumor growth in Ewing sarcoma. Cancer 2005;104:1713–20.
14. Daubiné F, Le Gall C, Gasser J, Green J, Clézardin P. Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. J Natl Cancer Inst 2007;99:322–30.
15. Hastie TJ. Generalized additive models. Chapter 7 of statistical models in S. In: Chambers JM, Hastie TJ, editors. Belmont, California; Wadsworth & Brooks/Cole, 1991.
16. Tse LF, Wong KC, Kumta SM, Huang L, Chow TC, Griffith JF. Bisphosphonates reduce local recurrence in extremity giant cell tumor of bone: a case-control study. Bone 2008;42:68–73.
17. Wunder J, Nielsen TO, Maki RG, O'Sullivan B, Alman BA. Opportunities for improving the therapeutic ratio for patients with sarcoma. Lancet Oncol 2007;8:513–24.
18. Lau YS, Adamopoulos IE, Sakobar A, Giele H, Gibbons CLMH, Athanasou NA. Cellular and humoral mechanisms of osteoclast formation in Ewing's sarcoma. Br J Cancer 2007;96:1716–22.
19. Inoue R, Matsuki NA, Jing G, Kanematsu T, Abe K, Hirata M. The inhibitory effect of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate on the PI3K-Akt-NFκB pathway in osteosarcoma cells. Br J Pharmacol 2005;146:633–41.
20. Kubista B, Trieb K, Sevelda F, et al. Anticancer effects of zoledronic acid against human osteosarcoma cells. J Orthop Res 2006;24:1145–62.
21. Kubo T, Shimose S, Matsuo T, et al. Inhibitory effects of a new bisphosphonate, minodronate, on proliferation and invasion of a variety of malignant bone tumor cells. J Orthop Res 2006;24:1138–44.
22. Benassi MS, Chiechi A, Ponticelli F, et al. Growth inhibition and sensitization to cisplatin by zoledronic acid in osteosarcoma cells. Cancer Lett 2007;250:194–205.
23. Murayama T, Kawasoe Y, Yamashita Y, et al. Efficacy of the third generation bisphosphonate risedronate alone and in combination with anticancer drugs against osteosarcoma cell lines. Anticancer Res 2008;28:2147–54.
24. Labridinis A, Hay S, Liapis V, Ponomarev V, Findlay DM, Evdokiou A. Zoledronic acid inhibits both the osteolytic and osteoblastic components of osteosarcoma lesions in a mouse model. Clin Cancer Res 2009;15:3451–61.
25. Kubo T, Shimose S, Matsuo T, Sakai A, Achi M. Efficacy of a nitrogen-containing bisphosphonate, minodronate, in conjunction with a p38 mitogen activated protein kinase inhibitor or doxorubicin against malignant bone tumor cells. Cancer Chemother Pharmacol 2008;62:111–6.
26. Anderson P, Kopp L, Anderson N, et al. Novel bone cancer drugs: investigational agents and control paradigms for primary bone sarcomas (Ewing's sarcoma and osteosarcoma). Expert Opin Investig Drugs 2008;17:1703–15.
27. Windsor R, Strauss S, Seddon B, Whelan J. Experimental therapies in Ewing's sarcoma. Expert Opin Invest Drugs 2009;18:143–59.
28. Sonnemann J, Eckervogt V, Truckenbrod B, Boos J, Winkelmann W, van Valen F. The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of Ewing's sarcoma cell growth *in vitro*. Anticancer Drugs 2003;14:767–71.
29. Huang HY, Illei PB, Zhao Z, et al. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. J Clin Oncol 2005;23:548–58.
30. Ory B, Blanchard F, Battaglia S, Gouin F, Rédini F, Heymann D. Zoledronic acid activates the DNA S-phase checkpoint and induces osteosarcoma cell death characterized by apoptosis-inducing factor and endonuclease-G translocation independently of p53 and retinoblastoma status. Mol Pharmacol 2007;41:333–43.
31. Corey E, Brown LG, Quinn JE, et al. Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer. Clin Cancer Res 2003;9:295–306.
32. Croucher PI, De Hendrik R, Perry MJ, et al. Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. J Bone Min Res 2003;18:482–92.
33. Michigami T, Hiraga T, Williams PJ, et al. The effect of the bisphosphonate ibandronate on cancer metastasis to visceral organs. Breast Cancer Res Treat 2002;75:249–58.
34. Hiraga T, Williams PJ, Ueda A, Tamura D, Yoneda T. Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. Clin Cancer Res 2004;10:4559–67.
35. Ottewell PD, Mönkkönen H, Jones M, Lefley DV, Coleman RE, Holen I. Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. J Natl Cancer Inst 2008;100:1167–78.
36. Boudou-Rouquette P, Alexandre J, Soubrane O, Bertagna X, Goldwasser F. Antitumoral effect of the bisphosphonate zoledronic acid against visceral matastases in an adrenocortical cancer patient. Ann Oncol 2009;20:1747.
37. Kijima T, Fujii Y, Suyama T, Okubo Y, Yonese J, Fukui I. Lung and bone metastases from renal cell carcinoma responsive to bisphosphonates: a case report. Int J Urol 2008;15:546–7.
38. Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, et al. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. N Engl J Med 1998;339:357–63.
39. Clemons MJ, Dranitsaris G, Ooi WS, et al. Phase III trial evaluating the palliative benefit of second-line zoledronic acid in breast cancer patients with either a skeletal-related event or progressive bone metastases despite first-line bisphosphonate therapy. J Clin Oncol 2006;24:4895–900.
40. Neville-Webbe HL, Evans CA, Coleman RE, Holen I. Mechanisms of the synergistic interaction between the bisphosphonate zoledronic acid and the chemotherapy agent paclitaxel in breast cancer cells *in vitro*. Tumour Biol 2006;27:92–103.
41. Yano S, Zhang H, Hanibuchi M, et al. Combined therapy with a new bisphosphonate, minodronate (YM529), and chemotherapy for multiple organ metastases of small cell lung cancer cells in severe combined immunodeficient mice. Clin Cancer Res 2003;9:5380–5.
42. Fan TM, Charney SC, de Lorimier LP, et al. Double-blind placebo-controlled trial of adjuvant pamidronate with palliative radiotherapy and intravenous doxorubicin for canine appendicular osteosarcoma bone pain. J Vet Intern Med 2009;23:152–60.

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Annexe 3

DOI:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497

Therapeutic efficacy of soluble receptor activator of nuclear factor-κB-Fc delivered by nonviral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma

François Lamoureux,[1] Gaëlle Picarda,[1] Julie Rousseau,[1] Clothilde Gourden,[2] Séverine Battaglia,[1] Céline Charrier,[1] Bruno Pitard,[3] Dominique Heymann,[1] and Françoise Rédini[1]

[1]INSERM, ERI 7, Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822; [2]In-Cell-Art; [3]INSERM, U533, Nantes, France

Abstract

Osteosarcoma is the most frequent primary bone tumor that develops mainly during youth, the median age of diagnosis being 18 years. Despite improvement in osteosarcoma treatment, survival rate is only 30% after 5 years for patients with pulmonary metastases at diagnosis. This warrants exploration of new therapeutic options. The anti-bone resorption molecule receptor activator of NF-κB (RANK) is very promising, as it may block the vicious cycle between bone resorption and tumor proliferation that takes place during tumor development in bone site. The cDNA encoding murine RANK-Fc (mRANK-Fc) was administered by gene transfer using an amphiphilic polymer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma. Clinical and bone microarchitecture variables were assessed by radiography and micro-CT analyses. *In vitro* experiments were designed to determine the mechanism of action of RANK-Fc on tumor cell proliferation (XTT assays), apoptosis (caspase activation), cell cycle distribution (fluorescence-activated cell sorting analysis), or gene expression (reverse transcription-PCR). RANK-Fc was effective in preventing the formation of osteolytic lesions associated with osteosarcoma development and in reducing the tumor incidence, the local tumor growth, and the lung metastases dissemination leading to a 3.9-fold augmentation of mice survival 28 days after implantation. On the contrary, mRANK-Fc did not prevent the development of nonosseous tumor nodules, suggesting that bone environment is necessary for mRANK-Fc therapeutic efficacy. Furthermore, mRANK-Fc has no direct activity on osteosarcoma cells *in vitro*. mRANK-Fc exerts an indirect inhibitory effect on osteosarcoma progression through inhibition of bone resorption. [Mol Cancer Ther 2008;7(10):3389–98]

Introduction

With an estimated incidence of 2 cases per million people per year, osteosarcoma is the most frequent primary bone malignant tumor excluding hematopoietic intraosseous tumors. Osteosarcoma generally affects young patients with a peak incidence at age 18 years. The unifying histologic feature found in all types and subtypes of osteosarcomas is the presence of osteoid tissue produced by the neoplastic cells (1). As these tumors frequently penetrate and destroy the cortical substance of the bone and extend into the surrounding tissues, a strong osteolytic activity is often associated with osteosarcoma development. In spite of newly devised chemotherapy regimens combined with wide-margin, limb-sparing surgery, osteosarcoma continues to confer a generally poor prognosis in patients with lung metastasis (<30%; ref. 2). As this survival rate has not evolved since two decades, there is an urgent need for new therapeutic strategies, adjuvant to surgery and chemotherapy.

The final effector molecules that ultimately control osteolysis associated with tumor development in bone site are receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG; ref. 3). RANKL directly stimulates osteoclastic differentiation and osteoclast activation and survival by signaling through its membrane receptor RANK, expressed on the osteoclast precursor surface. Physiologically, RANKL signaling is negatively regulated by the soluble antagonist receptor protein OPG, which induces osteoclast apoptosis. Targeting RANKL signaling with OPG inhibits tumor-associated osteolysis in several experimental bone tumor models including mouse colon adenocarcinoma, myeloma, breast, lung, prostate cancer, and osteosarcoma (4–9). However, OPG has been shown to bind the tumor necrosis factor receptor [TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)] and to block TRAIL-mediated apoptosis in cancer cells (10–13). Thus, alternative agents, such as soluble RANK-Fc that block RANKL-mediated bone resorption but that do not

Received 5/23/08; revised 7/23/08; accepted 7/26/08.

Grant support: Institut National du Cancer, Fondation pour l'Avenir de la Recherche Médicale Appliquée (study ET 6-418), Ligue Contre le Cancer (Comité des Pays de la Loire), and INSERM-Région Pays de la Loire (J. Rousseau); Association de Recherche sur le Cancer, GP by the Institut National du Cancer (F. Lamoureux).

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.

Note: F. Lamoureux and G. Picarda contributed equally to this work.

Requests for reprints: Françoise Rédini, INSERM, ERI 7, Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France. Phone: 33-2-72-64-11-43; Fax: 33-2-40-41-28-60. E-mail: francoise.redini@univ-nantes.fr

Copyright © 2008 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497

Downloaded from mct.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497

interact with TRAIL, may provide useful therapies to prevent tumor development in bone. RANK-Fc is a chimeric protein formed by fusing the four cysteine-rich pseudorepeats of RANK that are responsible for RANK-L binding with the Fc portion of human IgG1. Moreover, RANK-Fc has the potential advantage over OPG of greater specificity for RANKL. Fusion of the four cysteine-rich domains of RANK to the constant region of hIgG1 dictates homodimerization, which probably increases its avidity for RANKL. The sRANK differs from OPG because, in addition to containing four cysteine-rich domains, OPG also contains two death domains and a heparin-binding domain (14). Accordingly, RANK-Fc has been recently shown to cause a marked reduction in tumor burden in two SCID-hu multiple myeloma models (15) and also an inhibition of prostate cancer progression in bone (16). However, no study was done on RANK-Fc effects in primary bone tumors.

Previous data showed that it is feasible to provide long-lasting expression of RANK-Fc at bone-protective levels using a retroviral gene therapy approach (17). However, the toxicity associated with the use of viral vectors is extremely complex involving both innate and adaptative immune responses. Recently, a new class of synthetic vectors has been reported for *in vivo* gene transfer in various organs including skeletal and cardiac muscles (18, 19) and in lungs (20). These new synthetic vectors result from the association of plasmid DNA with amphiphilic polymers consisting in blocks of poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide). Intramuscular injections of these synthetic vectors lead to the synthesis of proteins for local benefit such as dystrophin or for systemic use such as erythropoietin (21).

The aim of this study was to determine the therapeutic relevance of RANK-Fc in a murine osteolytic osteosarcoma model by using a nonviral gene transfer approach.

Materials and Methods

Cell Lines

The osteosarcoma cell line POS-1, derived from mouse spontaneous osteosarcoma (22), was cultured in RPMI 1640 (Bio Whittaker) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone) and 2 mmol/L L-glutamine.

The osteoclast precursor RAW 264.7 cells from the monocyte macrophage lineage were obtained from the American Tissue and Cell Collection and grown in αMEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone) and 1% nonessential amino acids (Invitrogen).

The human osteosarcoma MG63 cell line was purchased from the American Tissue and Cell Collection and used for *in vitro* assay of TRAIL biological activity and cultured in DMEM (BioWhittaker) supplemented by 10% fetal bovine serum (Hyclone) and 2 mmol/L L-glutamine.

In vitro Experimentations

Plasmid Constructions. The pcDNA3.1-RANK-Fc construction (kindly provided by Dr. Y. Choi) contains a DNA sequence encoding the extracellular domain of murine RANK (mRANK; 0.7 kb) fused to the coding sequences of the constant portion of human IgG1 (0.5 kb; ref. 23). The soluble RANK-Fc cDNA is inserted in the pcDNA3.1 plasmid between *Xba*I and *Xho*I under the control of the cytomegalovirus promoter. For the *in vivo* and *in vitro* studies, the empty pcDNA3.1 was used as a control.

Cell Transfection. To assess the cellular expression of RANK-Fc, 2 μg pcDNA3.1 and pcDNA3.1-RANK-Fc were transfected by nucleofection into RAW 264.7 cells using the Cell Line Nucleofector Kit V program D-032 (AMAXA Biosystems) following the manufacturer's recommendations. The transfection efficacy is controlled by quantification of 2 μg pmaxGFP-transfected cells by fluorescence microscopy (AMAXA Biosystems).

Osteoclast Differentiation. The biological activity of the transgene was compared between pcDNA3.1-RANK-Fc- and pcDNA3.1-nucleofected RAW 264.7 cells plated in 96-well plates (3,000 per well) during 5 days. Medium was replaced twice (after 2 and 48 h) with αMEM 10% fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids, and increasing concentrations of recombinant human soluble RANKL (50, 75, and 100 ng/mL; kindly provided by Amgen). After 5 days of culture, multinucleated cells (>3 nuclei) were counted after a May-Grünwald Giemsa staining.

Cell Proliferation. Replicate subconfluent cell cultures of POS-1 cells in 96-well plates were treated for 24 to 72 h with increasing concentrations of mRANK-Fc (R&D Systems; 0, 25, 50, and 100 ng/mL). Cell viability was determined by the XTT cell proliferation reagent assay kit (Roche Molecular Biomedicals).

Caspase Activity. POS-1 cells (2×10^4 per well) cultured in 24-well plates were treated with 100 ng/mL RANK-Fc for 24 to 72 h, washed and lysed with 50 μL radioimmunoprecipitation buffer for 30 min in the presence of protease inhibitors. The cells were then scraped off and the protein amount was quantified using the BCA (bicinchonic acid + copper II sulfate) test (Pierce Chemical). Caspase-3 activity was assessed on 10 μL cell lysate with the CaspACE assay kit (Promega) following the manufacturer's recommendations. Cells treated with 1 μmol/L staurosporin 6 h before harvesting were used as a positive control for caspase activity.

Cell Cycle Analysis. Confluent POS-1 cells treated with increasing concentrations of RANK-Fc (0, 50, and 100 ng/mL) for 24, 48, and 72 h were removed from culture dishes by trypsinization, washed twice in PBS, and incubated in PBS containing 0.12% Triton X-100, 0.12 mmol/L EDTA, and 1 μg/mL DNase-free RNase A (Sigma). Each sample was incubated 20 min at 4°C in the dark with 50 μg/mL propidium iodide (Sigma). The stained nuclei were analyzed by flow cytometry (FACScan; BD Biosciences) using the CellQuest software. Cell cycle distribution was based on 2N and 4N DNA content.

TRAIL Biological Activity. Replicate subconfluent cell cultures of human osteosarcoma MG63 cells in 96-well plates were treated for 72 h with increasing concentrations of human TRAIL (R&D Systems; 0, 50, and 100 ng/mL) in the presence or absence of 100 ng/mL RANK-Fc.

Downloaded from mct.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497

Cell viability was determined by the XTT cell proliferation reagent assay kit as described above.

In vivo Experimentations

Mouse Osteosarcoma Models. Male C3H/He mice (4 weeks old; Elevages Janvier) were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators. The mice were anesthetized by inhalation of a combination isofluorane/air (1.5%, 1 L/min) associated with an intramuscular injection of buprenorphine (0.05 mg/kg; Temgesic, Schering-Plough) before s.c. inoculation of POS-1 cell suspension containing 2×10^6 cells in 50 μL PBS in the hind footpad of the mice. Under these conditions, mice develop a primary tumor at the site of injection in 3 weeks that can be transplanted to mice of the same strain as a small fragment ($2 \times 2 \times 2$ mm^3) in close contact with the tibia. For this purpose, the periostum of the diaphysis was opened and resected along a length of 5 mm; underlying bone was intact. The osteosarcoma fragment was placed contiguous to the exposed bone surface without periostum, and the cutaneous and muscular wounds were sutured. Tumors appeared at the graft site approximately 8 days later associated with the development of pulmonary metastases in a 3-week period. The tumor that develops in contact to the tibia induces osteolytic lesions that reproduce the osteolytic form of human osteosarcoma (22). The tumor volume (V) was calculated from the measurement of two perpendicular diameters using a caliper according to the following formula: $V = 0.5 \times L \times S^2$, where L and S are the largest and smallest perpendicular tumor diameters, respectively. A model of pulmonary metastases was developed to study RANK-Fc effect independent of bone environment, where mice were anesthetized by inhalation of a mixture of isofluorane/air combined with an intramuscular injection of buprenorphine as described above before i.v. injection of 50 μL POS-1 cell suspension containing 1.5×10^5 cells. In these conditions, pulmonary metastases developed rapidly, leading to the death of the animals in 3 weeks after POS-1 cell injection.

Formulation Preparations. For intramuscular injections, mice were anesthetized with a combination isofluorane/air. Fifty microliters of block copolymers/DNA formulations were injected into shaved tibial anterior muscles at one site using a microfine syringe (U100; Becton Dickinson). Lutrol, a block copolymer consisting of poly(-ethyleneoxide)$_{75}$-poly(propyleneoxide)$_{30}$-poly(ethyleneoxide)$_{75}$, was generously provided by BASF. Stock solutions were prepared at 6% (w/v) in water and stored at 4°C. Formulations of DNA with block copolymers were prepared by equivolumetric mixing block copolymers in water and DNA solution at the desired concentration (50 μg/muscle) as already reported (21).

Experimental Protocols. To determine the effect of RANK-Fc delivered by synthetic vectors on osteosarcoma development, the mice were transplanted with POS-1 osteosarcoma fragments as described above. Groups of 8 mice were assigned as controls (no injection), control vectors (Lutrol/pcDNA3.1 alone), and RANK-Fc (Lutrol/pcDNA3.1-RANK-Fc), respectively. Preliminary results from the laboratory have already shown that the vector Lutrol alone does not affect tumor development in the same mouse osteosarcoma model (9). A preventive treatment was applied, where the Lutrol/DNA formulations were injected into both tibial anterior muscles once a week, beginning 7 days before osteosarcoma implantation up to 21 days post-implantation. The tumor volume was calculated as described above. Treatment continued until each animal showed signs of morbidity, which included cachexia or respiratory distress, at which point they were sacrificed by cervical dislocation. Lung tumor dissemination was assessed at necropsy.

Radiographs on animals anesthetized with 50 mg/kg Nesdonal (Merial) were taken every week and at the time of necropsy with a mammography PLANMED Sophie apparatus (SN RAH 40710). Analysis of architectural variables was done using the high-resolution X-ray micro-CT system for small animal imaging SkyScan-1072 (SkyScan). Relative volume (BV/TV) of the tibia [total bone (cortical + trabecular) or trabecular bone] was quantified at necropsy in the osteosarcoma groups that received RANK-Fc compared with that of control mice. The results of one of three representative experiments are shown.

Gene and Protein Expression Analysis

To assess RANK-Fc transgene expression *in vitro* at the mRNA and protein levels, pcDNA3.1- and pcDNA3.1-RANK-Fc-nucleofected RAW 264.7 cells were cultured in six-well plates (2×10^6 per well) under standard conditions during 48 h.

In vivo, blood was drawn intermittently from the retro-orbital vein to monitor serum RANK-Fc level (days 7, 10, or 15 post-injection). At necropsy, the tumor and muscle tissues were lysed in 1× reporter lysis buffer (Promega) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biomedicals), buoyed during 30 s using Ultraturax, centrifuged at 10,000 rpm during 5 min at 4°C, and processed for RANK-Fc detection using the ELISA test described below.

RNA Extraction and Semiquantitative Reverse Transcription-PCR Analysis. RANK-Fc mRNA expression was determined by reverse transcription-PCR (RT-PCR) after total RNA extraction using Trizol reagent (Invitrogen). First, RNA was reverse transcribed using 400 units MMLV-RT (Invitrogen). Then, 2 μL RT reaction mixture was subjected to PCR using upstream (5′-GCTGGCTACCACTGGAACTC-3′) and downstream (5′-GTGGGCATGTGTGAGTTTTG-3′) primers (30 pmol each) of sRANK-Fc and Taq polymerase (1.25 units; Eurobio). The effect of RANK-Fc was assessed on tumor cell phenotype by studying the expression of several bone markers by RT-PCR.

RANK-Fc ELISA. RANK-Fc protein levels were determined by ELISA test: 96-well plates were coated with goat polyclonal anti-mouse RANK extracellular

Downloaded from mct.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497

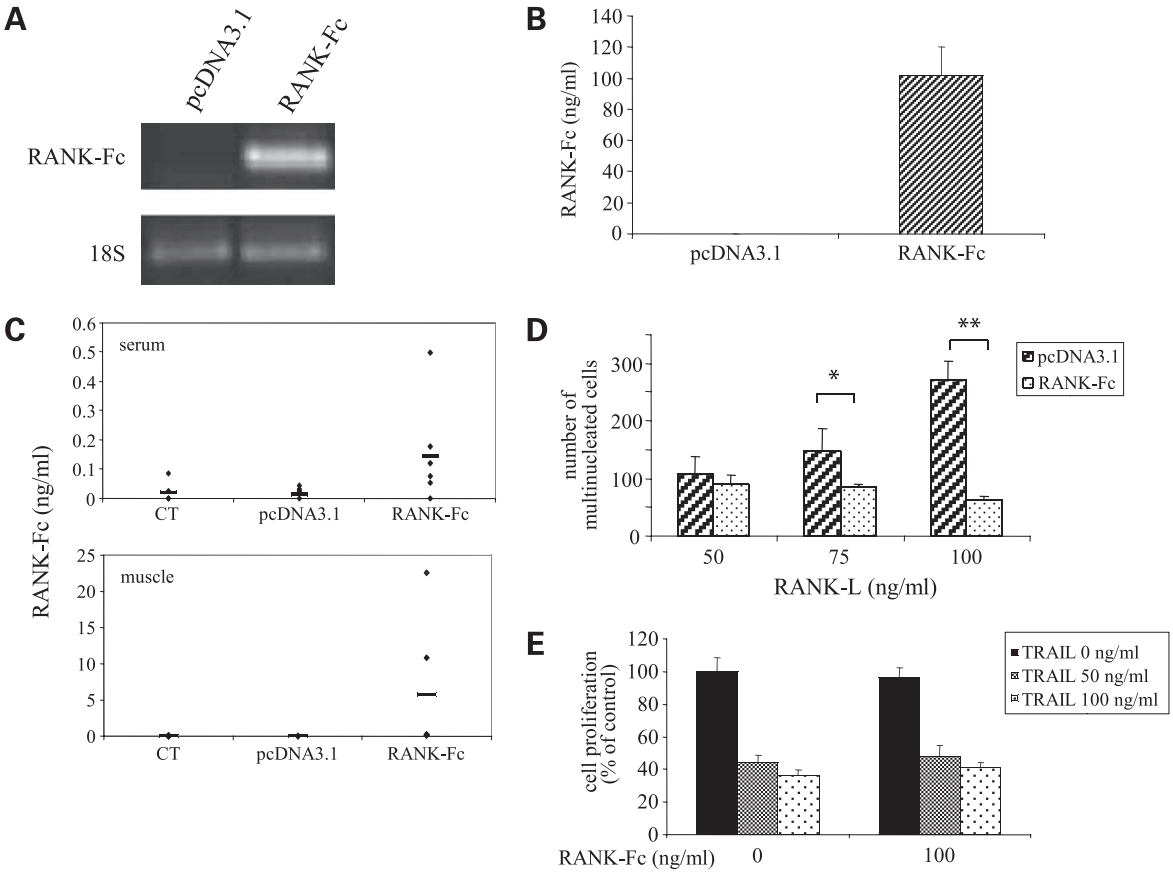


Figure 1. *In vitro* and *in vivo* validation of RANK-Fc transgene overexpression and biological activity. mRANK-Fc transgene expression was assessed 48 h after transfection in murine RAW 264.7 cells using a AMAXA nucleofector /pcDNA3-mRANK-Fc formulation at the transcript level by RT-PCR (**A**) and at the protein level by ELISA in the culture medium (**B**). *In vivo,* formulations of pcDNA3-mRANK-Fc with Lutrol block copolymers were assessed. The formulations were prepared by equivolumetric mixing block copolymers in water and DNA solution at the desired concentration (50 μg/muscle). The DNA-Lutrol formulation was administered in the tibial anterior muscle of both legs at weekly intervals. mRANK-Fc expression was analyzed 7 d post-injection by ELISA test in the muscle and in the serum (**C**). The biological activity of the mRANK-Fc transgene was assessed by its ability to block the RANKL-induced multinucleated cell formation in RAW 264.7 cells (**D**). RAW 264.7 cells transfected by nucleofection with pcDNA3.1 or pcDNA3.1-mRANK-Fc (RANK-Fc) were cultured in the presence of 50, 75, and 100 ng/mL RANKL during 5 d to assess multinucleated cell formation. *, $P = 0.048$, pcDNA3.1/RANK-Fc- versus pcDNA3.1-transfected RAW cells cultured with 75 ng/mL RANKL; **, $P = 0.003$, pcDNA3.1-mRANK-Fc- versus pcDNA3.1-transfected RAW cells cultured with 100 ng/mL RANKL. Viability assay using XTT test of MG63 cells cultured in the presence of 50 or 100 ng/mL human TRAIL were realized with recombinant human RANK-Fc (100 ng/mL), which exhibits the same sequence than the RANK-Fc transgene produced *in vivo* (**E**).

domain (Jackson ImmunoResearch Laboratories; 0.2 μg/well) overnight at room temperature and then washed and incubated for 1 h with a blocking solution (1% bovine serum albumin, 5% sucrose PBS). After washing, wells were incubated at room temperature with dilute serum or medium from nucleofected RAW 264.7 cells for 2 h followed by a 2 h incubation with a biotin-SP-conjugate donkey anti-human IgG (1:20,000; R&D Systems). Detection was done with conjugate streptavidin horseradish peroxidase (1:200; R&D Systems) incubation for 30 min. Reaction was stopped by 50 μL of 1 mol/L H_2SO_4, and 410 nm absorbance was determined (VICTOR^2 Multilabel counter; Perkin-Elmer). The ELISA detection limit was 0.02 ng/mL.

Histology

After sacrifice, tibia were conserved and fixed in 10% neutral-buffered formalin at 4°C and embedded in glycol methyl methacrylate for TRAP staining, and 5 μm sections were cut. The sections were stained for TRAP to identify osteoclasts by 1 h incubation in a 2 mg/mL naphthyl phosphate (Sigma) and 5 mg/mL fast violet salt (Sigma) solution. The counterstain was done with toluidine blue after a 1 h inactivation of the first solution in sodium fluorure. The number of osteoclasts was evaluated on the cortical bone by manually counting by light microscopy.

Data Analyses

For *in vivo* experimentations, the Tukey/Bonferroni test was used for microscanner and nonparametrical test by Kruskal-Wallis analysis for the tumoral progression evaluation. The differences of actuarial survival were determined by the log-rank test on a Kaplan-Meier survival curve. Statistical evaluation of the *in vitro* proliferation data was done by Student's *t* test. Results

Downloaded from mct.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497

are given as mean ± SD and results with $P < 0.05$ were considered significant.

Results

In vitro Analysis of Transgene Expression

mRANK-Fc overexpression was investigated at the mRNA and protein levels by RT-PCR and ELISA analyses done on RAW 264.7 cells, which were transfected with pcDNA3.1 or pcDNA3.1-RANK-Fc using the AMAXA nucleofector system. RT-PCR analysis showed a major expression of RANK-Fc mRNA in pcDNA3.1-RANK-Fc-transfected cells, whereas no expression was observed in the corresponding pcDNA3.1-transfected cells (Fig. 1A). This result was confirmed at the protein level by ELISA analysis, as supernatant from pcDNA3.1-RANK-Fc-transfected cells showed a high level of mRANK-Fc protein (101.6 ± 15.88 ng/mL) after 48 h when compared with pcDNA3.1-transfected cells, which showed no protein expression (Fig. 1B).

In vivo Validation of Transgene Expression

After injection of the DNA-Lutrol complexes into the tibial anterior muscles, an overexpression of the RANK-Fc transgene was measured at both systemic (serum) and local (muscle) levels in mice treated with pcDNA3.1-RANK-Fc. The production varied from 0.053 to 0.499 ng/mL in the serum and from 0.09 to 22.57 ng/mL in the muscle, being significantly higher to the pcDNA3.1 or control groups where no RANK-Fc expression could be detected, either in serum or in muscle (Fig. 1C). No correlation could be established between RANK-Fc concentration (either systemic or local) and its therapeutic efficacy. The immunogenicity of the human Fc part of RANK-Fc was checked previously in a immunocompetent rat model of osteosarcoma, and no antibodies were detected up to 3 weeks (not shown).

In vitro Validation of Transgene Biological Activity

To confirm that RANK-Fc expressed by nonviral gene transfer was biologically active, we investigated its ability to block RANKL-induced multinucleated cell formation in the osteoclast precursor RAW 264.7 cells. Inhibition of osteoclast formation was analyzed by multinucleated cell counting after May-Grünwald Giemsa staining of pcDNA3.1- and pcDNA3.1-RANK-Fc-transfected RAW 264.7 cells cultured in the presence of soluble RANKL. The results presented in Fig. 1D show that RAW 264.7 cells transfected with pcDNA3.1-RANK-Fc induced a significant inhibition of multinucleated cell formation in the presence of RANKL compared with cells transfected with pcDNA3.1 [84.7 ± 4 and 148.3 ± 39.1 multinucleated cells ($P = 0.048$) in the presence of 75 ng/mL RANKL and 62.7 ± 7.4 and 272.7 ± 30.3 ($P = 0.003$) for 100 ng/mL RANKL, respectively].

To ensure that RANK-Fc does not block TRAIL-mediated apoptosis, the effect of RANK-Fc was assessed on the human osteosarcoma cell line MG63 treated with increasing concentrations of TRAIL. To dispose of great amount of

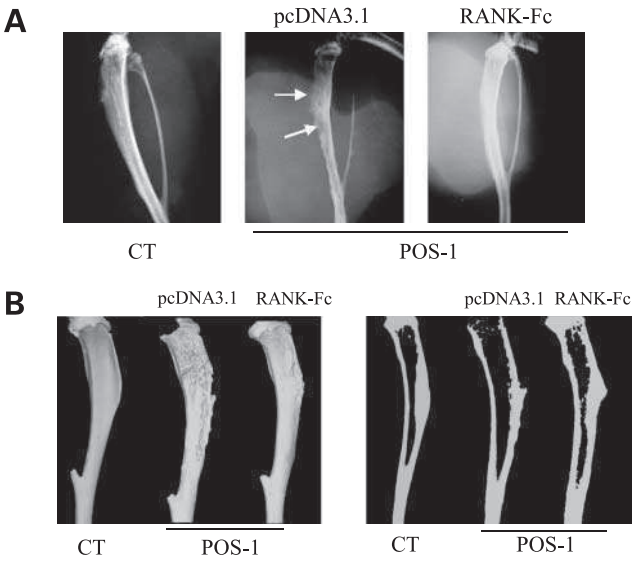


Figure 2. mRANK-Fc transgene expression prevents osteosarcoma-associated osteolysis. Mice were transplanted with POS-1 osteosarcoma fragments as described in Materials and Methods. Groups of six to eight mice were assigned as CT (controls: no tumor), POS-1/pcDNA3.1 (control vectors: Lutrol/pcDNA3.1 alone in POS-1 osteosarcoma-bearing mice), and POS-1/RANK-Fc (Lutrol/pcDNA3.1-mRANK-Fc in POS-1-bearing mice), respectively. A preventive treatment was applied, where the Lutrol/DNA formulations were injected into both tibial anterior muscles once a week, beginning at 7 d before osteosarcoma implantation up to 21 d post-implantation (time of sacrifice). At that time, the tumor-associated osteolysis was analyzed by radiography (**A**) and the microarchitectural variables by micro-CT (**B** and **C**). The trabecular specific bone volume was quantified in percentage by the following formula: BV / TV (**C**), where BV is bone volume and TV is total volume. Relative bone loss was calculated as percentage of control following the formula: $[(BV / TV)_{CT} - (BV / TV)_{POS \text{ or } mRANK\text{-}Fc}] / (BV / TV)_{CT}$. *, $P < 0.05$, POS-1/pcDNA3.1 versus CT.

C

Trabecular bone	CT (no tumor)	POS-1/ pcDNA3.1	POS-1/ RANK-Fc
BV/TV (%) (mean ± SD)	50.31 ± 1.4	*27.8 ± 7.3	38.22 ± 0.49
Relative bone loss (% of control)		44.7	24.01

Downloaded from mct.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497

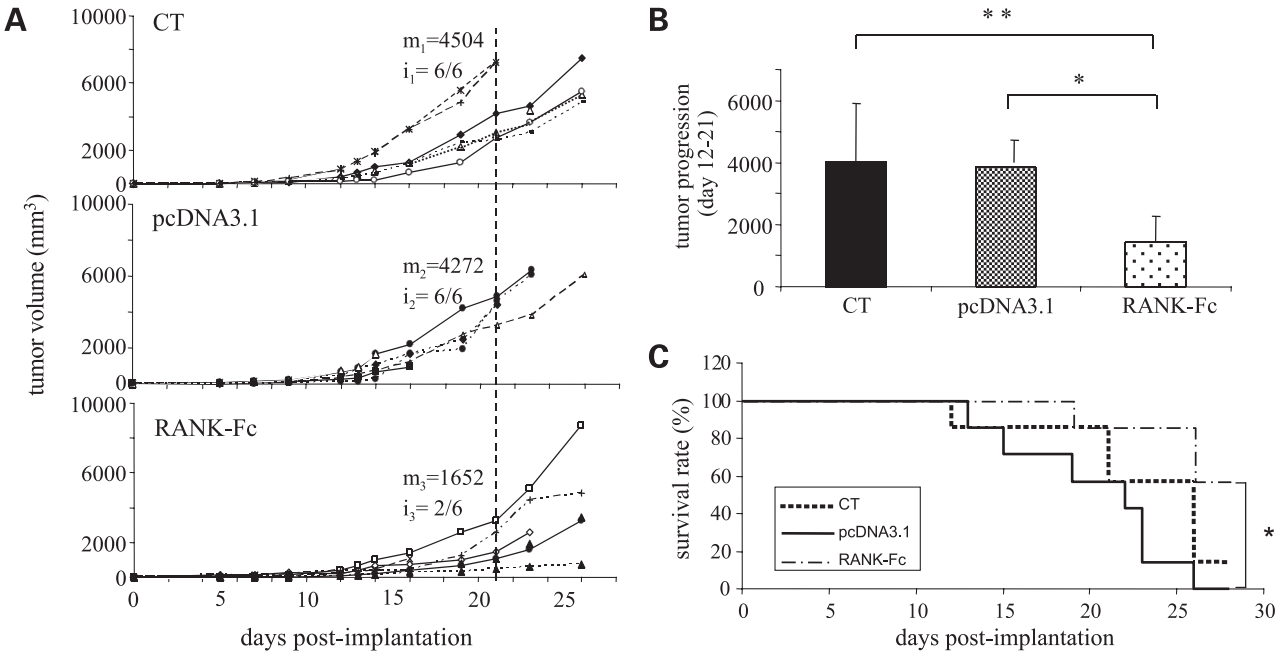


Figure 3. mRANK-Fc decreases tumor volume, tumor progression, and increases mouse survival. The same protocol was applied as in Fig. 2. The tumor volume (*V*) was calculated from the measurement of two perpendicular diameters according to the following formula: $V = 0.5 \times L \times S^2$, where *L* and *S* are the largest and smallest perpendicular tumor diameters, respectively. The tumor volumes of individuals untreated or treated by pcDNA3.1/Lutrol formulation (named pcDNA3.1) are compared with that of mice treated with pcDNA3.1-mRANK-Fc/Lutrol (RANK-Fc), 50 μg in both tibial anterior muscles (**A**). The mean tumor is indicated at day 21 in each group as $m_{1\text{-}3}$. The incidence of animals bearing progressive tumors at day 21 is also indicated as $i_{1\text{-}3}$. The mean tumor progression volume between days 12 and 21 (**B**). *, $P < 0.05$, pcDNA3.1-mRANK-Fc-treated versus pcDNA3.1 mice; **, $P < 0.01$, pcDNA3.1-mRANK-Fc-treated versus untreated mice (CT). The overall survival rate was compared between control mice and mice that received pcDNA3/Lutrol formulation (pcDNA3) and pcDNA3.1-mRANK-Fc/Lutrol (RANK-Fc) over a 28-d period (**C**). *, $P < 0.02$.

protein for dose and time-dependant analysis *in vitro*, a recombinant RANK-Fc corresponding to the same sequence as the transgene used in the *in vivo* study was chosen. No effect of RANK-Fc treatment could be shown on TRAIL-induced apoptosis of MG63 cells (Fig. 1E). Similar results were obtained with other TRAIL-sensitive cell lines, such as the A673 human Ewing sarcoma cell line.

These results show that RANK-Fc protein is expressed after nonviral gene transfer both *in vitro* and *in vivo* and that it exerts an antiresorption activity *in vivo* (against RANKL) and not a protumoral one (unable to block TRAIL-induced apoptosis).

Protective Effect of mRANK-Fc Transgene Expression on Bone Resorption Associated to Osteosarcoma Development

The mouse osteosarcoma POS-1 model used in this study has been associated previously with osteolytic lesions by micro-CT analysis (22). To show the inhibitory effect of RANK-Fc on the development of osteolytic lesions, mice transplanted with osteosarcoma were treated with pcDNA3.1-RANK-Fc or pcDNA3.1 alone (control vector) using the amphiphile block copolymer Lutrol, which have shown previously the best transfection efficiency *in vivo* (20, 21). Because control tumors and pcDNA3.1 (control vector)-treated mice exhibit similar bone alterations (9), only pcDNA3.1-treated mice tibiae radiographs and micro-CT analyses were shown. Important osteolytic lesions were observed on the tibia of POS-1 osteosarcoma-bearing mice treated with pcDNA3.1 alone compared with the pcDNA3.1-RANK-Fc group that exhibit minor lesions (Fig. 2A). These results were confirmed by the bone microarchitecture analysis, as the quantification of the specific bone volume revealed a reduced trabecular bone loss in RANK-Fc-treated mice compared with the pcDNA3.1 group: 24.01% versus 44.7%, respectively (Fig. 2B and C). The anti-bone resorption activity of the RANK-Fc transgene was thus confirmed *in vivo*, as RANK-Fc treatment induces a decrease of osteolytic lesions in the POS-1 model of osteosarcoma compared with the control group (CT: without tumor).

mRANK-Fc Transgene Expression Limits Osteosarcoma Progression and Increases Animal Survival

Mice received a preventive treatment with DNA-Lutrol complexes, the first injections being realized 7 days before osteosarcoma implantation. This strategy was chosen because *in vivo* transgene production is optimal 7 days after the construct injection, this time point corresponding to the day of tumor transplantation. The tumor volume was calculated twice a week following the measure of the two perpendicular diameters. The results show that the tumor volume of each animal was smaller in the RANK-Fc-treated group compared with the pcDNA3.1 or the control groups (Fig. 3A). As a result, the mean tumor volume 21 days after tumor implantation was significantly lower in the group

Downloaded from mct.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497

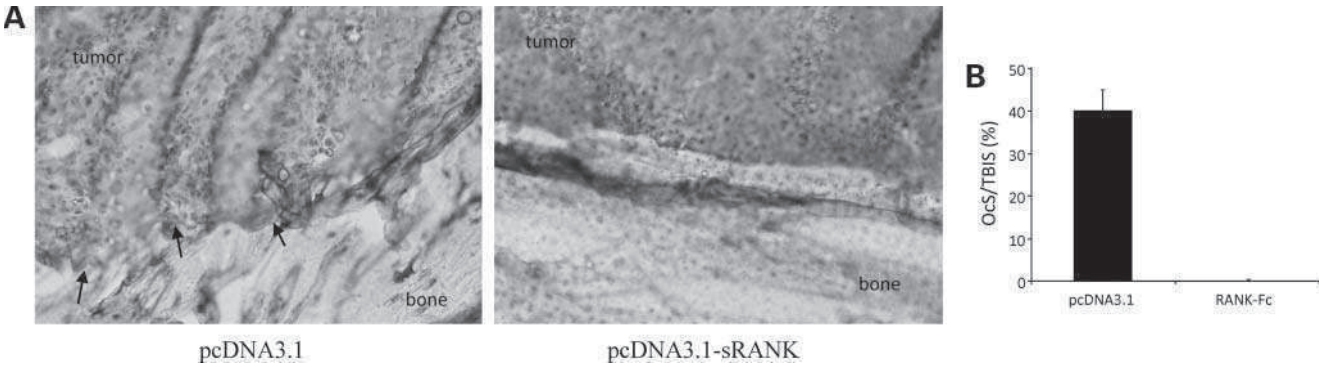


Figure 4. mRANK-Fc gene transfer inhibits osteosarcoma progression by preventing bone resorption. TRAP staining was realized on 6 μm sections of tibias and tumors from pcDNA3.1- and RANK-Fc-treated mice (**A**). Numerous TRAP-positive osteoclasts were observed in POS-1 osteosarcoma-bearing mice treated by pcDNA3.1 (*arrows*). Magnification, ×320. Osteoclast numbers at the tumor-bone interface surface (*OcS/TBIS*; **B**).

receiving RANK-Fc compared with the pcDNA3.1 group or the control group ($P < 0.05$), reaching 1,652.7 ± 1,055, 4,272.7 ± 712.8, and 4,504.1 ± 2,162.2 mm^3, respectively (Fig. 3A). In addition, the incidence of animals bearing progressive tumors (tumor volume > 2,000 mm^3) is significantly lower at day 21 in the RANK-Fc-treated animals (2/6) compared with controls or pcDNA3.1-treated mice (6 of 6 for both; Fig. 3A). These results enabled us to calculate the relative tumor progression between days 12 and 21, which was significantly decreased by 62.7% ($P < 0.05$) and 64.3% ($P < 0.01$) in the RANK-Fc-treated group compared with the pcDNA3.1-treated and untreated groups, respectively (Fig. 3B). As a consequence, a significant increase ($P < 0.02$) of animal survival was observed with 57.1% of survival at day 28 in the RANK-Fc-treated group versus 0% in the pcDNA3.1-treated group

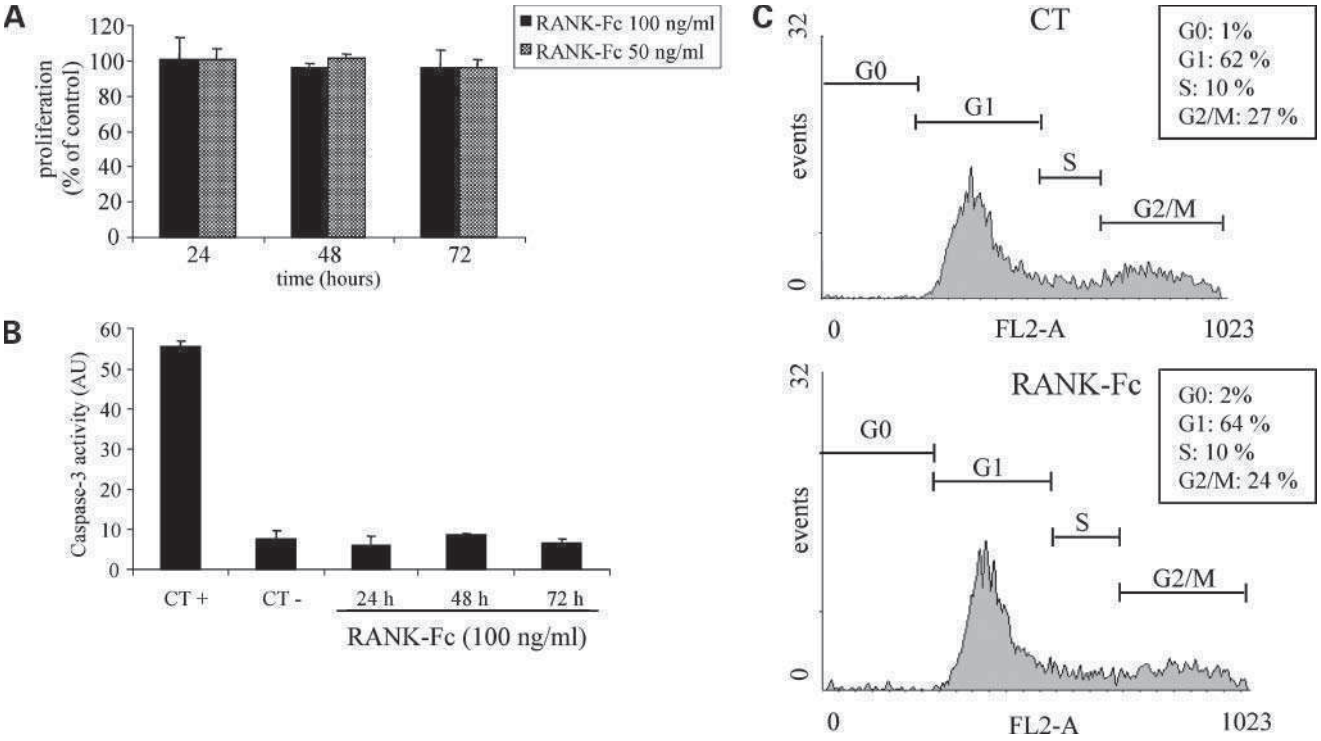


Figure 5. mRANK-Fc exerts no direct effect on osteosarcoma cells *in vitro*. Effects were assessed on POS-1 cell proliferation using a XTT assay as described in Materials and Methods. POS-1 cells were treated for 24 to 72 h with increasing concentrations of recombinant mRANK-Fc (50 and 100 ng/mL) that exhibits the same sequence as the mRANK-Fc transgene used for *in vivo* experiments (**A**). To determine the RANK influence on tumor cell apoptosis, the caspase-3 activity was analyzed in the cell lysate of POS-1 cells treated with 100 ng/mL mRANK-Fc for 24, 48, and 72 h (**B**). *CT+*, staurosporin (1 μmol/L, 6 h) was used as positive control; *CT-*, POS-1 cells alone. Paralleled experiments were done on cell cycle distribution by fluorescence-activated cell sorting analysis in the absence or the presence of 100 ng/mL mRANK-Fc during 24, 48, and 72 h (**C**). As no effect could be detected, only the results obtained after 72 h of incubation are shown.

Downloaded from mct.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497

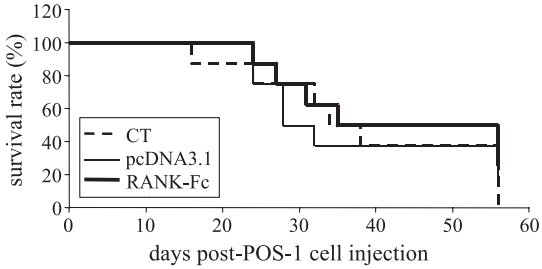


Figure 6. mRANK-Fc exerts no therapeutic effect in a model of tumor lesions that develop in lungs. A model of pulmonary tumor lesions was induced in C3H/HeN mice by the i.v. injection of 200 000 POS-1 cells in the retro-orbital vein. The Lutrol/DNA formulations were injected into both tibial anterior muscles once a week, beginning at 7 d before POS-1 cells injection up to 21 d post-implantation. The mice were separated into three groups (n = 8) treated as follows: control mice received vehicle (PBS) alone (CT), pcDNA3.1/Lutrol (pcDNA3.1), or pcDNA3.1-mRANK-Fc/Lutrol (RANK-Fc). The overall survival rate was compared with the three groups over a 56-d period.

and 14.3% in the untreated group (Fig. 3C). Animals died of respiratory distress because of lung metastasis or were sacrificed due to huge tumor development. Animals treated with RANK-Fc showed no pulmonary metastases at day 26.

All these results show that RANK-Fc not only exerts a protective effect on osteosarcoma associated bone lesions but also diminishes the tumor progression in bone, increasing the animal survival in an osteolytic model of osteosarcoma.

Expression of mRANK-Fc Inhibits Osteosarcoma Progression by Preventing Bone Resorption

Complementary to radiographic and micro-CT analyses, TRAP staining was done on osteosarcoma sections from mice treated or not with RANK-Fc to determine whether this cytokine could inhibit osteosarcoma-induced osteoclast formation. The development of large osteosarcoma tumors in this model is accompanied by increased osteoclastic bone resorption and increased recruitment of osteoclasts to the tumor-bone interface (Fig. 4A, *arrows*). The presence of TRAP-positive osteoclasts was abrogated in the sRANK-Fc group (Fig. 4A and B), confirming at the cellular level the inhibitory effect of RANK-Fc on osteosarcoma associated osteolysis.

In vitro, RANK-Fc Has No Effect on Tumor Cell Proliferation, Apoptosis, Migration, and Gene Expression

To determine whether *in vivo* RANK-Fc-inhibitory effect on tumor progression is direct on tumor cells, several *in vitro* experiments were done on osteosarcoma cell proliferation, apoptosis, cell migration, gene expression, and cell cycle using the POS-1 mouse osteosarcoma cell line corresponding to the *in vivo* model.

The viability of POS-1 cells treated with increasing concentrations of RANK-Fc was analyzed from 24 to 72 h using a XTT-based method. No significant effect was noticed even after 72 h of treatment with 100 ng/mL RANK-Fc (Fig. 5A) nor on POS-1 cell apoptosis as analyzed by caspase activity assay (Fig. 5B). Similarly, RANK-Fc treatment had no effect on POS-1 cells migration (data not shown) and on the cell cycle phase distribution (Fig. 5C). RT-PCR analysis shows that a 100 ng/mL treatment during 72 h with RANK-Fc does not induce gene expression modulation of POS-1 cells (data not shown).

These data show that the inhibitory effects observed on tumor progression *in vivo* for the RANK-Fc-treated group are not due to a direct effect on POS-1 tumor cells.

RANK-Fc Treatment Does Not Affect Tumor Nodule Development in Lungs

As RANK-Fc exerts no direct effect on tumor cells, we hypothesize that the inhibitory effect observed in osteosarcoma development is the indirect consequence of bone resorption inhibition, thus depending on bone microenvironment. To show this hypothesis, another set of experiments was done in mice developing tumor lesions in lungs. This model was induced after POS-1 cell injection in the retro-orbital vein. The results presented in Fig. 6 show no significant differences between the different groups in the overall mouse survival rate, indicating that RANK-Fc exerts no inhibitory effect on tumor development outside the bone microenvironment.

Discussion

The mouse model of osteosarcoma used in this study is characterized by the presence of osteolytic lesions (24). The release of latent growth factors (such as insulin growth factor, transforming growth factor-β, bone morphogenetic protein, platelet-derived growth factor, and vascular endothelial growth factor) stored in the bone matrix during osteolysis stimulates the tumor growth in a vicious cycle that leads to tumor cell proliferation and tumor progression in bone sites (25, 26). Bone resorption inhibitors thus appear as one of the most promising tools to manage osteolytic lesions associated to primary or secondary bone tumors. The OPG/RANKL/RANK pathway offers multiple molecular checkpoints for therapeutic targeting in osteolytic tumors. Inhibition of this axis has shown therapeutic efficacy in restricting tumor-mediated osteolysis *in vitro* as well as in animal models of both bone metastasis (16, 27–29) and osteosarcoma (9). Indeed, previous results obtained in our laboratory in the same mouse osteosarcoma model with OPG gene transfer showed the relevance of using such antiresorptive factors as promising therapeutic approaches for primitive osteolytic tumors. However, the ability of OPG to block the TRAIL apoptosis pathway in cancer cells was noticed and there were concerns that this could lead to a burst in tumor growth (30). Denosumab is a fully human monoclonal antibody directed against RANKL and is currently under investigation in phase III clinical trials (31, 32). Denosumab was generated by immunizing the XenoMouse (33) with full-length human RANKL protein, producing a fully human IgG1 monoclonal antibody, which recognizes an epitope with a single amino acid difference between the mouse and the human sequences. Because human IgG1 can induce complement-dependent

Downloaded from mct.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497

cytotoxicity or antibody-dependent cell cytotoxicity to target cells (34), it was converted to a noncytotoxic IgG2 monoclonal antibody, known as Denosumab, which has an extremely high affinity (K_d, $\sim 10^{-12}$ mol/L) for human RANKL. The fact that Denosumab does not recognize rodent RANKL has complicated preclinical development, with only one relevant animal study conducted in cynomolgus monkeys (35). Therefore, as these anti-RANKL antibodies cannot be used in our mouse model of osteosarcoma, RANK-Fc, another member of the tumor necrosis factor receptor family was used in the present study. Indeed, RANK-Fc, the fusion of the extracellular domain of RANK (amino acids 22-209) with the constant region of human IgG1 has the potential advantage over OPG of greater specificity for RANKL (15). Delivery of RANK-Fc as a recombinant protein has shown promising results as a potential therapy through experiments in animal models, in that RANK-Fc limits hypercalcemia and osteolysis induced by myeloma or prostate cancer and reduces bone tumor establishment in these models (15, 16, 29, 36). Moreover, a recent study reported that RANK-Fc inhibition of RANKL has an antiosteoclast activity at doses that have no detectable immunoregulatory activity (37). Even if long-lasting expression of RANK-Fc could be provided at bone-protective levels using a retrovirus-mediated gene transfer approach by the use of genetically modified mesenchymal stem cells (17), the toxicity associated with the use of such viral vectors is extremely complex.

The results from the present study validate the nonviral gene transfer method and the therapeutic interest of RANK-Fc in osteosarcoma. This methodology has proven previously its efficacy to deliver and express therapeutic gene in the same mouse model of osteosarcoma (9). In the present study, we show that when injected every week, the DNA-Lutrol complexes can induce RANK-Fc overexpression at both local (muscle) and systemic levels in sufficient quantities to induce anti-bone resorption activity. The overproduction reached its maximum 7 days after injection and lasted for 15 days at the systemic level. The intramuscular injection of the RANK-Fc/Lutrol complexes induces a local RANK-Fc transgene production that blocks bone resorption as confirmed by radiography and histology and quantified by micro-CT analysis in an osteolytic model of osteosarcoma. Moreover, the same inhibitory effect on bone osteolytic lesions has been obtained by adenoviral delivery of RANK-Fc in a rat osteocondensant osteosarcoma (data already published; refs. 3, 27).

Given its role in osteoclastogenesis, it is likely that inhibition of osteosarcoma progression by RANK-Fc reflects, at least in part, its ability to inhibit bone resorption. Indeed, RANK-Fc has no direct activity on osteosarcoma cells as shown by *in vitro* studies on proliferation, migration, apoptosis, cell cycle, or phenotype analysis. Furthermore, the observation that RANK-Fc did not diminish development of nonosseous tumors (pulmonary tumor lesions induced by the same osteosarcoma POS-1 cells injected i.v.) suggests that the ability of RANK-Fc to inhibit osteosarcoma development was not caused by a direct effect on tumor but rather specific to factors in the bone microenvironment. Given that RANKL expression has been shown previously in the POS-1 tumor by immunohistochemical analyses (9), the present data suggest that inhibition of RANKL activity diminishes the osteosarcoma progression. Moreover, other experiments done in our laboratory have shown that osteosarcoma cells express RANK and that RANKL is able to induce modulation of gene expression in these cells (24, 38, 39). Targeting RANKL is therefore a promising approach in bone tumor therapy. It has been shown that RANKL is implicated in the pathogenesis of bone metastasis at several levels: increased bone resorption as a result of excess RANKL results in the release of growth factors that facilitate tumor cell division and survival, and a recent study suggested a role for RANKL as a chemoattractant for certain cancer cells metastatic to bone (40). Furthermore, RANKL can stimulate both angiogenesis (41) and endothelial cell survival (42), suggesting a role for RANKL in supporting vascularization of bone metastases. This role could also be extended to osteosarcoma, which is a naturally highly vascularized tumor. As RANKL participates to the regulation of Treg function, it could also interfere in tumor response at this level (43, 44).

To inhibit RANKL activity, three candidates are potentially promising: the decoy receptor OPG, the soluble receptor RANK-Fc constructed as the fusion of RANK extracellular domain with the constant region of the human IgG1, and antibodies directed against human RANKL. The advantage of using anti-RANKL antibodies is that they do not inhibit the TRAIL apoptosis pathway. In a recent randomized, double-blind, double-dummy, active-controlled multicenter phase I clinical study, Body et al. (45) showed the efficacy of denosumab. A single s.c. dose of denosumab given to patients with multiple myeloma or bone metastasis from breast cancer yielded a dose-dependent and sustained reduction in bone resorption. However, as this therapeutic agent cannot be used in immunocompetent models of bone tumors in rodents, RANK-Fc, which is more specific of RANKL binding than OPG, seems therefore a better therapeutic tool for these pathologies.

In conclusion, these data show that RANK-Fc delivered by nonviral gene transfer is a promising therapeutic approach for osteolytic bone tumors such as osteosarcoma by targeting RANKL in the bone microenvironment.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Christelle Bailly, Marie-Noëlle Hervé, and Cyril Le Corre (Experimental Therapy Unit) and Paul Pilet (INSERM U791) from the microscopy platforms of the IFR26 for technical assistance and G. Odri for critical review of this article.

Downloaded from mct.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497

References

1. Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma. Anatomic and histologic variants. Am J Clin Pathol 2006;125:555 – 81.
2. Campanacci M, Bacci G, Bertoni F, Picci P, Minutillo A, Franceschi C. The treatment of osteosarcoma of the extremities: twenty year's experience at Istituto Rizzoli. Cancer 1981;48:1569 – 81.
3. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Rédini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. Cell Mol Life Sci 2007;64:2334 – 50.
4. Morony S, Capparelli C, Sarosi I, Lacey DL, Dunstan CR, Kostenuik PJ. Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. Cancer Res 2001;61:4432 – 6.
5. Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. Blood 2001; 98:3534 – 40.
6. Yonou H, Kanomata N, Goya M, et al. Osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor decreases human prostate cancer burden in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. Cancer Res 2003;63:2096 – 102.
7. Capparelli C, Kostenuik PJ, Morony S, et al. Osteoprotegerin prevents and reverses hypercalcemia in a murine model of humoral hypercalcemia of malignancy. Cancer Res 2000;60:783 – 7.
8. Zhang J, Dai J, Qi Y, et al. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. J Clin Invest 2001;107:1235 – 44.
9. Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: prevention of bone resorption, inhibition of tumor progression, increase of animal survival. Cancer Res 2007;67:7308 – 18.
10. Holen I, Shipman CM. Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. Clin Sci (Lond) 2006;110:279 – 91.
11. Holen I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. Cancer Res 2002;62: 1619 – 23.
12. Shipman CM, Croucher PI. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. Cancer Res 2003;63:912 – 6.
13. Kapoor P, Suva LJ, Welch DR, Donahue HJ. Osteoprotegerin and the bone homing and colonization potential of breast cancer. J Cell Biochem 2008;103:30 – 41.
14. Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, et al. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. J Biol Chem 1998;273:5117 – 23.
15. Sordillo EM, Pearse RN. RANK-Fc: a therapeutic antagonist for RANK-L in myeloma. Cancer 2003;97:802 – 12.
16. Zhang J, Dai J, Yao Z, Lu Y, Dougall W, Keller ET. Soluble receptor activator of nuclear factor κB diminishes prostate cancer progression in bone. Cancer Res 2003;63:7883 – 90.
17. Kim D, Cho SW, Her SJ, et al. Retrovirus-mediated gene transfer of receptor activator of nuclear factor-κB-Fc prevents bone loss in ovariectomized mice. Stem Cells 2006;24:1798 – 805.
18. Pitard B, Pollard H, Agbulut O, et al. A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery *in vivo* to skeletal and cardiac muscles. Hum Gene Ther 2002;13:1767 – 75.
19. Pitard B, Bello-Roufai M, Lambert O, et al. Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for *in vivo* gene transfer. Nucleic Acids Res 2004;32:e159.
20. Desigaux L, Gourden C, Bello-Roufai M, et al. Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung. Hum Gene Ther 2005;16:821 – 9.
21. Richard P, Bossard F, Desigaux L, Lanctin C, Bello-Roufai M, Pitard B. Amphiphilic block copolymers promote gene delivery *in vivo* to pathological skeletal muscles. Hum Gene Ther 2005;16:1318 – 24.
22. Kamijo A, Koshino T, Uesugi M, Nitto H, Saito T. Inhibition of lung metastasis of osteosarcoma cell line POS-1 transplanted into mice by thigh ligation. Cancer Lett 2002;188:213 – 9.
23. Guilloneau C, Louvet C, Renaudin K, et al. The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-κB interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. J Immunol 2004;172:1619 – 29.
24. Wittrant Y, Lamoureux F, Mori K, et al. RANKL directly induces bone morphogenetic protein-2 expression in RANK-expressing POS-1 osteosarcoma cells. Int J Oncol 2006;28:261 – 9.
25. Guise TA, Kozlow WM, Heras-Herzig A, Padalecki SS, Yin JJ, Chirgwin JM. Molecular mechanisms of breast cancer metastases to bone. Clin Breast Cancer 2005;5 Suppl:S46 – 53.
26. Yin JJ, Pollock CB, Kelly K. Mechanisms of cancer metastasis to the bone. Cell Res 2005;15:57 – 62.
27. Wittrant Y, Theoleyre S, Chipoy C, et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. Biochim Biophys Acta 2004;170:49 – 57.
28. Whang PG, Schwarz EM, Gamradt SC, Dougall WC, Lieberman JR. The effects of RANK blockade and osteoclast depletion in a model of pure osteoblastic prostate cancer metastasis in bone. J Orthop Res 2005;23: 1475 – 83.
29. Feeley BT, Liu NO, Conduah AH, et al. Mixed metastatic lung cancer lesions in bone are inhibited by noggin overexpression and Rank:Fc administration. J Bone Miner Res 2006;21:1571 – 80.
30. Neville-Webbe HL, Cross NA, Eaton CL, et al. Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. Breast Cancer Res Treat 2004;86:269 – 79.
31. Weiner LM. Fully human therapeutic monoclonal antibodies. J Immunother 2006;29:1 – 9.
32. Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals. Nat Biotechnol 2005;23:1117 – 25.
33. Green LL. Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. J Immunol Methods 1999; 231:11 – 23.
34. Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, Ghrayeb J. Chimeric anti-TNF-α monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-α and activates immune effector functions. Cytokine 1995;7:251 – 9.
35. Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. Curr Opin Pharmacol 2005;5:618 – 25.
36. Oyajobi BO, Anderson DM, Traianedes K, Williams PJ, Yoneda T, Mundy GR. Therapeutic efficacy of a soluble receptor activator of nuclear factor κB-IgG Fc fusion protein in suppressing bone resorption and hypercalcemia in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. Cancer Res 2006;61:2572 – 8.
37. Miller RE, Branstetter D, Armstrong A, et al. Receptor activator of NF-κB ligand inhibition suppresses bone resorption and hypercalcemia but does not affect host immune responses to influenza infection. J Immunol 2007;179:266 – 74.
38. Mori K, Le Goff B, Berreur M, et al. Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-κB. J Pathol 2007; 211:555 – 62.
39. Mori K, Berreur M, Blanchard F, et al. Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) directly modulates the gene expression profile of RANK-positive Saos-2 human osteosarcoma cells. Oncol Rep 2007;18: 1365 – 71.
40. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. Nature 2006;440:692 – 6.
41. Min JK, Kim YM, Kim YM, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF-κB (RANK) in endothelial cells. Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. J Biol Chem 2003;278:39548 – 57.
42. Kim YM, Kim YM, Lee YM, et al. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells. J Biol Chem 2002;277: 6799 – 805.
43. Antony PA and Restifo NP. Do $CD4^+CD25^+$ immunoregulatory T cells hinder tumor immunotherapy? J Immunother 1997;25:202 – 6.
44. Curotto de Lafaille MA and Lafaille JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. Curr Opin Immunol 2002;14:771 – 8.
45. Body JJ. Breast cancer: bisphosphonate therapy for metastatic bone disease. Clin Cancer Res 2006;12:6258 – 63s.

Downloaded from mct.aacrjournals.org on July 20, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

BIBLIOGRAHIE

[1] Marieb E. Human Anatomy and Physiology. 1998 p.

[2]. Glimcher MJ. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. Instr Course Lect. 1987;3649-69.

[3] Owen M. Marrow stromal stem cells. J. Cell Sci. Suppl 1988;10:63-76.

[4] Bianco P, Cossu G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. Exp. Cell Res 1999;251:257-263. doi:10.1006/excr.1999.4592

[5] Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. Arch. Biochem. Biophys 2008;473:98-105. doi:10.1016/j.abb.2008.02.030

[6] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999;284:143-147.

[7] Grigoriadis AE, Schellander K, Wang ZQ, Wagner EF. Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. J. Cell Biol 1993;122:685-701.

[8] Wagner EF. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. Ann. Rheum. Dis 2002;61 Suppl 2:ii40-42.

[9] Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Möhle-Steinlein U, Rüther U, Wagner EF. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. Nature 1992;360:741-745. doi:10.1038/360741a0

[10] McCabe LR, Banerjee C, Kundu R, Harrison RJ, Dobner PR, Stein JL, et al. Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation. Endocrinology 1996;137:4398-4408.

[11] Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell 1997;89:755-764.

[12] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell 2002;108:17-29.

[13] Tai G, Polak JM, Bishop AE, Christodoulou I, Buttery LDK. Differentiation of osteoblasts from murine embryonic stem cells by overexpression of the transcriptional factor osterix. Tissue Eng 2004;10:1456-1466. doi:10.1089/ten.2004.10.1456

[14] Chambers TJ, Fuller K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. J. Cell. Sci 1985;76:155-165.

[15] Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. J. Cell. Biochem 1994;55:287-299. doi:10.1002/jcb.240550304

[16] Poole KES, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. FASEB J 2005;19:1842-1844. doi:10.1096/fj.05-4221fje

[17] Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, et al. Origin of

osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1990;87:7260-7264.

[18] Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. J Orthop Sci 1998;3:346-355.

[19] Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. Endocrinology 1998;139:2659-2661.

[20] Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. J. Dent. Res 2006;85:584-595.

[21] Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. Endocrinology 2003;144:5545-5555. doi:10.1210/en.2003-0296

[22] Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. Semin. Cell Dev. Biol 2008;19:444-451. doi:10.1016/j.semcdb.2008.07.016

[23] Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2008;105:20764-20769. doi:10.1073/pnas.0805133106

[24] von Levetzow C, Jiang X, Gwye Y, von Levetzow G, Hung L, Cooper A, et al. Modeling initiation of ewing sarcoma in human neural crest cells. PLoS ONE 2011;6:e19305. doi:10.1371/journal.pone.0019305

[25] Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, et al. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. Oncologist 2006;11:503-519. doi:10.1634/theoncologist.11-5-503

[26] Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. J. Pediatr. Hematol. Oncol 2008;30:425-430. doi:10.1097/MPH.0b013e31816e22f3

[27] Marec-Bérard P, Chotel F, Claude L. [PNET/Ewing tumours: current treatments and future perspectives]. Bull Cancer 2010;97:707-713. doi:10.1684/bdc.2010.1120

[28] Mackintosh C, Madoz-Gúrpide J, Ordóñez JL, Osuna D, Herrero-Martín D. The molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. Cancer Biol. Ther 2010;9:655-667.

[29] May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, et al. The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. Mol. Cell. Biol 1993;13:7393-7398.

[30] Cironi L, Riggi N, Provero P, Wolf N, Suvà M-L, Suvà D, et al. IGF1 is a common target gene of Ewing's sarcoma fusion proteins in mesenchymal progenitor cells. PLoS ONE 2008;3:e2634. doi:10.1371/journal.pone.0002634

[31] Guillon N, Tirode F, Boeva V, Zynovyev A, Barillot E, Delattre O. The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential

transcriptional activation function. PLoS ONE 2009;4:e4932. doi:10.1371/journal.pone.0004932

[32] Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, Kinsey M, Haroldsen SC, Shah AA, et al. Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2008;105:10149-10154. doi:10.1073/pnas.0801073105

[33] Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. Mol. Cell. Biol 2004;24:7275-7283. doi:10.1128/MCB.24.16.7275-7283.2004

[34] Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. Nat. Rev. Mol. Cell Biol 2004;5:261-270. doi:10.1038/nrm1357

[35] Riggi N, Stamenkovic I. The Biology of Ewing sarcoma. Cancer Lett 2007;254:1-10. doi:10.1016/j.canlet.2006.12.009

[36] Falk S, Alpert M. Five-year survival of patients with Ewing's sarcoma. Surg Gynecol Obstet 1967;124:319-324.

[37] SUTOW WW, SULLIVAN MP. Cyclophosphamide therapy in children with Ewing's sarcoma. Cancer Chemother Rep 1962;23:55-60.

[38] PINKEL D. Cyclophosphamide in children with cancer. Cancer 1962;15:42-49.

[39] Nesbit ME, Gehan EA, Burgert EO, Vietti TJ, Cangir A, Tefft M, et al. Multimodal therapy for the management of primary, nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone: a long-term follow-up of the First Intergroup study. J. Clin. Oncol 1990;8:1664-1674.

[40] Paulussen M, Ahrens S, Dunst J, Winkelmann W, Exner GU, Kotz R, et al. Localized Ewing tumor of bone: final results of the cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86. J. Clin. Oncol 2001;19:1818-1829.

[41] Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJH, Pritchard DJ, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. N. Engl. J. Med 2003;348:694-701. doi:10.1056/NEJMoa020890

[42] Leavey PJ, Collier AB. Ewing sarcoma: prognostic criteria, outcomes and future treatment. Expert Rev Anticancer Ther 2008;8:617-624. doi:10.1586/14737140.8.4.617

[43] Leavey PJ, Mascarenhas L, Marina N, Chen Z, Krailo M, Miser J, et al. Prognostic factors for patients with Ewing sarcoma (EWS) at first recurrence following multi-modality therapy: A report from the Children's Oncology Group. Pediatr Blood Cancer 2008;51:334-338. doi:10.1002/pbc.21618

[44] Chirgwin JM, Guise TA. Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr 2000;10:159-178.

[45] Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, Trichet V, et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. Cancer Res 2007;67:7308-7318. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4130

[46] Chikatsu N, Takeuchi Y, Tamura Y, Fukumoto S, Yano K, Tsuda E, et al. Interactions between cancer and bone marrow cells induce osteoclast differentiation factor expression and osteoclast-like cell formation in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun 2000;267:632-637. doi:10.1006/bbrc.1999.2008

[47] Guise TA. The vicious cycle of bone metastases. J Musculoskelet Neuronal Interact 2002;2:570-572.

[48] Guise TA, Chirgwin JM. Transforming growth factor-beta in osteolytic breast cancer bone metastases. Clin. Orthop. Relat. Res 2003:S32-38. doi:10.1097/01.blo.0000093055.96273.69

[49] Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer Metastasis Rev 1989;8:98-101.

[50] Perez M, Migliaccio S, Taranta A, Festuccia C, Orrù L, Brama M, et al. Melanoma cells stimulate osteoclastogenesis, c-Src expression and osteoblast cytokines. Eur. J. Cancer 2001;37:629-640.

[51] Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, Elliott J, Horwood NJ, Martin TJ, et al. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. Endocrinology 1999;140:4451-4458.

[52] Mancino AT, Klimberg VS, Yamamoto M, Manolagas SC, Abe E. Breast cancer increases osteoclastogenesis by secreting M-CSF and upregulating RANKL in stromal cells. J. Surg. Res 2001;100:18-24. doi:10.1006/jsre.2001.6204

[53] Benini S, Zuntini M, Manara MC, Cohen P, Nicoletti G, Nanni P, et al. Insulin-like growth factor binding protein 3 as an anticancer molecule in Ewing's sarcoma. Int. J. Cancer 2006;119:1039-1046. doi:10.1002/ijc.21929

[54] Toretsky JA, Steinberg SM, Thakar M, Counts D, Pironis B, Parente C, et al. Insulin-like growth factor type 1 (IGF-1) and IGF binding protein-3 in patients with Ewing sarcoma family of tumors. Cancer 2001;92:2941-2947.

[55] Manara MC, Landuzzi L, Nanni P, Nicoletti G, Zambelli D, Lollini PL, et al. Preclinical in vivo study of new insulin-like growth factor-I receptor--specific inhibitor in Ewing's sarcoma. Clin. Cancer Res 2007;13:1322-1330. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1518

[56] Anderson P, Kopp L, Anderson N, Cornelius K, Herzog C, Hughes D, et al. Novel bone cancer drugs: investigational agents and control paradigms for primary bone sarcomas (Ewing's sarcoma and osteosarcoma). Expert Opin Investig Drugs 2008;17:1703-1715. doi:10.1517/13543784.17.11.1703

[57] Olmos D, Postel-Vinay S, Molife LR, Okuno SH, Schuetze SM, Paccagnella ML, et al. Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study. Lancet Oncol 2010;11:129-135. doi:10.1016/S1470-2045(09)70354-7

[58] Bolontrade MF, Zhou R-R, Kleinerman ES. Vasculogenesis Plays a Role in the Growth of Ewing's Sarcoma in Vivo. Clin. Cancer Res 2002;8:3622-3627.

[59] Subbiah V, Anderson P, Lazar AJ, Burdett E, Raymond K, Ludwig JA. Ewing's sarcoma: standard and experimental treatment options. Curr Treat Options Oncol 2009;10:126-140. doi:10.1007/s11864-009-0104-6

[60] Kovar H, Aryee DN, Jug G, Henöckl C, Schemper M, Delattre O, et al. EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. Cell Growth Differ 1996;7:429-437.

[61] Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y. EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. J. Clin. Invest 1997;99:239-247. doi:10.1172/JCI119152

[62] Toretsky JA, Connell Y, Neckers L, Bhat NK. Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. J. Neurooncol 1997;31:9-16.

[63] Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Subra F, Pinto-Alphandary H, Malvy C, et al. EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun 2000;279:401-406. doi:10.1006/bbrc.2000.3963

[64] Stegmaier K, Wong JS, Ross KN, Chow KT, Peck D, Wright RD, et al. Signature-based small molecule screening identifies cytosine arabinoside as an EWS/FLI modulator in Ewing sarcoma. PLoS Med 2007;4:e122. doi:10.1371/journal.pmed.0040122

[65] DuBois SG, Krailo MD, Lessnick SL, Smith R, Chen Z, Marina N, et al. Phase II study of intermediate-dose cytarabine in patients with relapsed or refractory Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. Pediatr Blood Cancer 2009;52:324-327. doi:10.1002/pbc.21822

[66] Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. Bone 1996;19:281-290.

[67] Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. J. Clin. Invest 1991;88:2095-2105. doi:10.1172/JCI115539

[68] Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Cancer 2000;88:2961-2978.

[69] Epstein S. Update of current therapeutic options for the treatment of postmenopausal osteoporosis. Clin Ther 2006;28:151-173. doi:10.1016/j.clinthera.2006.02.007

[70] Heymann D, Ory B, Gouin F, Green JR, Rédini F. Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors. Trends Mol Med 2004;10:337-343. doi:10.1016/j.molmed.2004.05.007

[71] Coleman RE. Risks and benefits of bisphosphonates. Br. J. Cancer 2008;98:1736-1740. doi:10.1038/sj.bjc.6604382

[72] Frith JC, Mönkkönen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. J. Bone Miner. Res 1997;12:1358-1367. doi:10.1359/jbmr.1997.12.9.1358

[73] Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Näpänkangas JP, Ylitalo KV, Mönkkönen J, Rogers MJ, et al. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing

metabolite. Mol. Pharmacol 2002;61:1255-1262.

[74] Dunford JE, Rogers MJ, Ebetino FH, Phipps RJ, Coxon FP. Inhibition of protein prenylation by bisphosphonates causes sustained activation of Rac, Cdc42, and Rho GTPases. J. Bone Miner. Res 2006;21:684-694. doi:10.1359/jbmr.060118

[75] Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R, Sebti S, Ralston SH, Hamilton A, et al. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. J. Bone Miner. Res 2000;15:1467-1476. doi:10.1359/jbmr.2000.15.8.1467

[76] Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttall ME, Rogers MJ. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. Bone 2001;28:465-473.

[77] Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch K-H, Blaschke S, Gründker C, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun 2002;291:680-686. doi:10.1006/bbrc.2002.6510

[78] Yoneda T, Hashimoto N, Hiraga T. Bisphosphonate actions on cancer. Calcif. Tissue Int 2003;73:315-318. doi:10.1007/s00223-002-0025-x

[79] Watts NB, Diab DL. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. J. Clin. Endocrinol. Metab 2010;95:1555-1565. doi:10.1210/jc.2009-1947

[80] Brufsky AM. Zoledronic acid for cancer therapy--induced and postmenopausal bone loss. Expert Opin Pharmacother 2008;9:1013-1028. doi:10.1517/14656566.9.6.1013

[81] Jahanzeb M, Hirsh V. Bisphosphonates in lung cancer: more than a palliative therapy? Semin. Oncol 2010;37 Suppl 1:S45-52. doi:10.1053/j.seminoncol.2010.06.004

[82] Boudou-Rouquette P, Alexandre J, Soubrane O, Bertagna X, Goldwasser F. Antitumoral effect of the bisphosphonate zoledronic acid against visceral metastases in an adrenocortical cancer patient. Ann. Oncol 2009;20:1747. doi:10.1093/annonc/mdp378

[83] Kijima T, Fujii Y, Suyama T, Okubo Y, Yonese J, Fukui I. Lung and bone metastases from renal cell carcinoma responsive to bisphosphonates: a case report. Int. J. Urol 2008;15:546-547. doi:10.1111/j.1442-2042.2008.02044.x

[84] Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, et al. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. N. Engl. J. Med 1998;339:357-363. doi:10.1056/NEJM199808063390601

[85] Horie N, Murata H, Kimura S, Takeshita H, Sakabe T, Matsui T, et al. Combined effects of a third-generation bisphosphonate, zoledronic acid with other anticancer agents against murine osteosarcoma. Br. J. Cancer 2007;96:255-261. doi:10.1038/sj.bjc.6603548

[86] Ory B, Heymann M-F, Kamijo A, Gouin F, Heymann D, Redini F. Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. Cancer 2005;104:2522-2529. doi:10.1002/cncr.21530

[87] Koto K, Horie N, Kimura S, Murata H, Sakabe T, Matsui T, et al. Clinically relevant

dose of zoledronic acid inhibits spontaneous lung metastasis in a murine osteosarcoma model. Cancer Lett 2009;274:271-278. doi:10.1016/j.canlet.2008.09.026

[88] 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. doi:10.1016/j.bone.2005.02.020

[89] Kubista B, Trieb K, Sevelda F, Toma C, Arrich F, Heffeter P, et al. Anticancer effects of zoledronic acid against human osteosarcoma cells. J. Orthop. Res 2006;24:1145-1152. doi:10.1002/jor.20129

[90] Benassi MS, Chiechi A, Ponticelli F, Pazzaglia L, Gamberi G, Zanella L, et al. Growth inhibition and sensitization to cisplatin by zoledronic acid in osteosarcoma cells. Cancer Lett 2007;250:194-205. doi:10.1016/j.canlet.2006.10.004

[91] Labrinidis A, Hay S, Liapis V, Ponomarev V, Findlay DM, Evdokiou A. Zoledronic acid inhibits both the osteolytic and osteoblastic components of osteosarcoma lesions in a mouse model. Clin. Cancer Res 2009;15:3451-3461. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1616

[92] Meyers PA, Healey JH, Chou AJ, Wexler LH, Merola PR, Morris CD, et al. Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. Cancer 2010. doi:10.1002/cncr.25744

[93] Kubo T, Shimose S, Matsuo T, Tanaka K, Yasunaga Y, Sakai A, et al. Inhibitory effects of a new bisphosphonate, minodronate, on proliferation and invasion of a variety of malignant bone tumor cells. J. Orthop. Res 2006;24:1138-1144. doi:10.1002/jor.20177

[94] Sonnemann J, Eckervogt V, Truckenbrod B, Boos J, Winkelmann W, van Valen F. The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of Ewing's sarcoma cell growth in vitro. Anticancer Drugs 2003;14:767-771. doi:10.1097/01.cad.0000094848.34612.41

[95] Zhou Z, Guan H, Duan X, Kleinerman ES. Zoledronic acid inhibits primary bone tumor growth in Ewing sarcoma. Cancer 2005;104:1713-1720. doi:10.1002/cncr.21383

[96] Odri GA, Dumoucel S, Picarda G, Battaglia S, Lamoureux F, Corradini N, et al. Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. Cancer Res 2010;70:7610-7619. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4272

[97] Murayama T, Kawasoe Y, Yamashita Y, Ueno Y, Minami S, Yokouchi M, et al. Efficacy of the third-generation bisphosphonate risedronate alone and in combination with anticancer drugs against osteosarcoma cell lines. Anticancer Res 2008;28:2147-2154.

[98] Neville-Webbe HL, Evans CA, Coleman RE, Holen I. Mechanisms of the synergistic interaction between the bisphosphonate zoledronic acid and the chemotherapy agent paclitaxel in breast cancer cells in vitro. Tumour Biol 2006;27:92-103. doi:10.1159/000092489

[99] Yano S, Zhang H, Hanibuchi M, Miki T, Goto H, Uehara H, et al. Combined therapy with a new bisphosphonate, minodronate (YM529), and chemotherapy for

multiple organ metastases of small cell lung cancer cells in severe combined immunodeficient mice. Clin. Cancer Res 2003;9:5380-5385.

[100] Houghton PJ, Morton CL, Tucker C, Payne D, Favours E, Cole C, et al. The pediatric preclinical testing program: description of models and early testing results. Pediatr Blood Cancer 2007;49:928-940. doi:10.1002/pbc.21078

[101] Shafat I, Ben-Arush MW, Issakov J, Meller I, Naroditsky I, Tortoteto M, et al. Preclinical and clinical significance of heparanase in Ewing's sarcoma. J. Cell. Mol. Med 2010. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01190.x

[102] Brounais B, Chipoy C, Mori K, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, et al. Oncostatin M induces bone loss and sensitizes rat osteosarcoma to the antitumor effect of Midostaurin in vivo. Clin. Cancer Res 2008;14:5400-5409. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4781

[103] Lamoureux F, Picarda G, Rousseau J, Gourden C, Battaglia S, Charrier C, et al. Therapeutic efficacy of soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B-Fc delivered by nonviral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma. Mol. Cancer Ther 2008;7:3389-3398. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497

[104] Floch V, Loisel S, Guenin E, Hervé AC, Clement JC, Yaouanc JJ, et al. Cation substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity. J. Med. Chem 2000;43:4617-4628.

[105] Floch V, Delépine P, Guillaume C, Loisel S, Chassé S, Le Bolc'h G, et al. Systemic administration of cationic phosphonolipids/DNA complexes and the relationship between formulation and lung transfection efficiency. Biochim. Biophys. Acta 2000;1464:95-103.

[106] Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1999;96:4262-4267.

[107] Bureau MF, Gehl J, Deleuze V, Mir LM, Scherman D. Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. Biochim. Biophys. Acta 2000;1474:353-359.

[108] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature 1999;397:315-323. doi:10.1038/16852

[109] Yao G-Q, Wu J-J, Sun B-H, Troiano N, Mitnick MA, Insogna K. The cell surface form of colony-stimulating factor-1 is biologically active in bone in vivo. Endocrinology 2003;144:3677-3682.

[110] Kimble RB, Bain S, Pacifici R. The functional block of TNF but not of IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice. J. Bone Miner. Res 1997;12:935-941. doi:10.1359/jbmr.1997.12.6.935

[111] Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J. Biol. Chem 1996;271:12687-12690.

[112] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.

Immunity 1995;3:673-682.

[113] Kimberley FC, Screaton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. Cell Res 2004;14:359-372. doi:10.1038/sj.cr.7290236

[114] Cha SS, Kim MS, Choi YH, Sung BJ, Shin NK, Shin HC, et al. 2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. Immunity 1999;11:253-261.

[115] Diehl GE, Yue HH, Hsieh K, Kuang AA, Ho M, Morici LA, et al. TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. Immunity 2004;21:877-889. doi:10.1016/j.immuni.2004.11.008

[116] Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. J. Immunol 2002;168:1356-1361.

[117] Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. Cytokine Growth Factor Rev 2003;14:337-348.

[118] Zheng S-J, Jiang J, Shen H, Chen YH. Reduced apoptosis and ameliorated listeriosis in TRAIL-null mice. J. Immunol 2004;173:5652-5658.

[119] Wandinger K-P, Lünemann JD, Wengert O, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Weber A, et al. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. Lancet 2003;361:2036-2043. doi:10.1016/S0140-6736(03)13641-0

[120] Lub-de Hooge MN, de Vries EGE, de Jong S, Bijl M. Soluble TRAIL concentrations are raised in patients with systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis 2005;64:854-858. doi:10.1136/ard.2004.029058

[121] Lamhamedi-Cherradi S-E, Zheng S-J, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. Nat. Immunol 2003;4:255-260. doi:10.1038/ni894

[122] Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. Nat. Med 2001;7:94-100. doi:10.1038/83416

[123] Finnberg N, Klein-Szanto AJP, El-Deiry WS. TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. J. Clin. Invest 2008;118:111-123. doi:10.1172/JCI29900

[124] Grosse-Wilde A, Voloshanenko O, Bailey SL, Longton GM, Schaefer U, Csernok AI, et al. TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. J. Clin. Invest 2008;118:100-110. doi:10.1172/JCI33061

[125] Bos PD, Zhang XH-F, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. Nature 2009;459:1005-1009. doi:10.1038/nature08021

[126] Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. Science 1997;276:111-113.

[127] Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. Science 1997;277:815-818.

[128] Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. Science 1997;277:818-821.

[129] Clancy L, Mruk K, Archer K, Woelfel M, Mongkolsapaya J, Screaton G, et al. Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2005;102:18099-18104. doi:10.1073/pnas.0507329102

[130] Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. J. Biol. Chem 1998;273:14363-14367.

[131] Wu GS, Burns TF, Zhan Y, Alnemri ES, El-Deiry WS. Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. Cancer Res 1999;59:2770-2775.

[132] Chan FK-M. Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. Cytokine 2007;37:101-107. doi:10.1016/j.cyto.2007.03.005

[133] Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, Lancaster K, et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. Nat. Med 2007;13:1070-1077. doi:10.1038/nm1627

[134] Nimmanapalli R, Perkins CL, Orlando M, O'Bryan E, Nguyen D, Bhalla KN. Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. Cancer Res 2001;61:759-763.

[135] Takimoto R, El-Deiry WS. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. Oncogene 2000;19:1735-1743. doi:10.1038/sj.onc.1203489

[136] Burns TF, Bernhard EJ, El-Deiry WS. Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo. Oncogene 2001;20:4601-4612. doi:10.1038/sj.onc.1204484

[137] Gonzalvez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. Oncogene 2010;29:4752-4765. doi:10.1038/onc.2010.221

[138] Rossin A, Derouet M, Abdel-Sater F, Hueber A-O. Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling. Biochem. J 2009;419:185-192, 2 p following 192. doi:10.1042/BJ20081212

[139] Austin CD, Lawrence DA, Peden AA, Varfolomeev EE, Totpal K, De Mazière AM, et al. Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2006;103:10283-10288. doi:10.1073/pnas.0604044103

[140] Kohlhaas SL, Craxton A, Sun X-M, Pinkoski MJ, Cohen GM. Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. J. Biol. Chem 2007;282:12831-12841. doi:10.1074/jbc.M700438200

[141] Sanlioglu AD, Karacay B, Koksal IT, Griffith TS, Sanlioglu S. DcR2 (TRAIL-R4) siRNA and adenovirus delivery of TRAIL (Ad5hTRAIL) break down in vitro tumorigenic potential of prostate carcinoma cells. Cancer Gene Ther 2007;14:976-984. doi:10.1038/sj.cgt.7701087

[142] Sanlioglu AD, Korcum AF, Pestereli E, Erdogan G, Karaveli S, Savas B, et al. TRAIL death receptor-4 expression positively correlates with the tumor grade in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys 2007;69:716-723. doi:10.1016/j.ijrobp.2007.03.057

[143] Riccioni R, Pasquini L, Mariani G, Saulle E, Rossini A, Diverio D, et al. TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. Haematologica 2005;90:612-624.

[144] Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, Lynch DH, Kubin MZ. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. J. Immunol 1998;161:2833-2840.

[145] Mérino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, Micheau O. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. Mol. Cell. Biol 2006;26:7046-7055. doi:10.1128/MCB.00520-06

[146] Mellier G, Huang S, Shenoy K, Pervaiz S. TRAILing death in cancer. Mol. Aspects Med 2010;31:93-112. doi:10.1016/j.mam.2009.12.002

[147] Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). EMBO J 1997;16:2794-2804. doi:10.1093/emboj/16.10.2794

[148] Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. Immunity 2000;12:611-620.

[149] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell 2004;116:205-219.

[150] Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. Cell Death Differ 2007;14:1237-1243. doi:10.1038/sj.cdd.4402148

[151] Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J 1998;17:1675-1687. doi:10.1093/emboj/17.6.1675

[152] Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell 1998;94:491-501.

[153] Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell 1998;94:481-490.

[154] Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell 1997;90:405-413.

[155] MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. Toxicol. Lett 2003;139:89-97.

[156] Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. Immunity 1997;7:813-820.

[157] Li H, Lin X. Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation. Cytokine 2008;41:1-8. doi:10.1016/j.cyto.2007.09.016

[158] Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, Sipos B, Egberts J, Zorenkov D, et al. TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. Oncogene 2006;25:7434-7439. doi:10.1038/sj.onc.1209719

[159] Ricci MS, Kim S-H, Ogi K, Plastaras JP, Ling J, Wang W, et al. Reduction of TRAIL-induced Mcl-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death. Cancer Cell 2007;12:66-80. doi:10.1016/j.ccr.2007.05.006

[160] Secchiero P, Gonelli A, Carnevale E, Milani D, Pandolfi A, Zella D, et al. TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. Circulation 2003;107:2250-2256. doi:10.1161/01.CIR.0000062702.60708.C4

[161] Belyanskaya LL, Ziogas A, Hopkins-Donaldson S, Kurtz S, Simon H-U, Stahel R, et al. TRAIL-induced survival and proliferation of SCLC cells is mediated by ERK and dependent on TRAIL-R2/DR5 expression in the absence of caspase-8. Lung Cancer 2008;60:355-365. doi:10.1016/j.lungcan.2007.11.005

[162] Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 2006;290:G129-136. doi:10.1152/ajpgi.00242.2005

[163] Gazitt Y. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. Leukemia 1999;13:1817-1824.

[164] Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. Nat. Med 1999;5:157-163. doi:10.1038/5517

[165] Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. J. Clin. Invest 1999;104:155-162. doi:10.1172/JCI6926

[166] Kelley SK, Harris LA, Xie D, Deforge L, Totpal K, Bussiere J, et al. Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. J. Pharmacol. Exp. Ther 2001;299:31-38.

[167] Pollack IF, Erff M, Ashkenazi A. Direct stimulation of apoptotic signaling by soluble Apo2l/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand leads to selective killing of glioma cells. Clin. Cancer Res 2001;7:1362-1369.

[168] Marini P, Schmid A, Jendrossek V, Faltin H, Daniel PT, Budach W, et al. Irradiation specifically sensitises solid tumour cell lines to TRAIL mediated apoptosis. BMC Cancer 2005;5:5. doi:10.1186/1471-2407-5-5

[169] Song K, Benhaga N, Anderson RL, Khosravi-Far R. Transduction of tumor necrosis

factor-related apoptosis-inducing ligand into hematopoietic cells leads to inhibition of syngeneic tumor growth in vivo. Cancer Res 2006;66:6304-6311. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3501

[170] Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. Nat. Med 2000;6:564-567. doi:10.1038/75045

[171] Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. Nat. Med 2001;7:383-385. doi:10.1038/86397

[172] Ganten TM, Koschny R, Sykora J, Schulze-Bergkamen H, Büchler P, Haas TL, et al. Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. Clin. Cancer Res 2006;12:2640-2646. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2635

[173] Hao C, Song JH, Hsi B, Lewis J, Song DK, Petruk KC, et al. TRAIL inhibits tumor growth but is nontoxic to human hepatocytes in chimeric mice. Cancer Res 2004;64:8502-8506. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2599

[174] Wu GS. TRAIL as a target in anti-cancer therapy. Cancer Lett 2009;285:1-5. doi:10.1016/j.canlet.2009.02.029

[175] Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK, Huang HJ. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. Cancer Res 2000;60:847-853.

[176] Cuello M, Ettenberg SA, Nau MM, Lipkowitz S. Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. Gynecol. Oncol 2001;81:380-390. doi:10.1006/gyno.2001.6194

[177] Tolcher AW, Mita M, Meropol NJ, von Mehren M, Patnaik A, Padavic K, et al. Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. J. Clin. Oncol 2007;25:1390-1395. doi:10.1200/JCO.2006.08.8898

[178] Mom CH, Verweij J, Oldenhuis CNAM, Gietema JA, Fox NL, Miceli R, et al. Mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets TRAIL-R1, in combination with gemcitabine and cisplatin: a phase I study. Clin. Cancer Res 2009;15:5584-5590. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0996

[179] Younes A, Vose JM, Zelenetz AD, Smith MR, Burris HA, Ansell SM, et al. A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. Br. J. Cancer 2010;103:1783-1787. doi:10.1038/sj.bjc.6605987

[180] Hotte SJ, Hirte HW, Chen EX, Siu LL, Le LH, Corey A, et al. A phase 1 study of mapatumumab (fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies. Clin. Cancer Res 2008;14:3450-3455. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1416

[181] Greco FA, Bonomi P, Crawford J, Kelly K, Oh Y, Halpern W, et al. Phase 2 study of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1, in patients with advanced non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2008;61:82-90. doi:10.1016/j.lungcan.2007.12.011

[182] Trarbach T, Moehler M, Heinemann V, Köhne C-H, Przyborek M, Schulz C, et al. Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer. Br. J. Cancer 2010;102:506-512. doi:10.1038/sj.bjc.6605507

[183] Leong S, Cohen RB, Gustafson DL, Langer CJ, Camidge DR, Padavic K, et al. Mapatumumab, an antibody targeting TRAIL-R1, in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced solid malignancies: results of a phase I and pharmacokinetic study. J. Clin. Oncol 2009;27:4413-4421. doi:10.1200/JCO.2008.21.7422

[184] Plummer R, Attard G, Pacey S, Li L, Razak A, Perrett R, et al. Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers. Clin. Cancer Res 2007;13:6187-6194. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0950

[185] Wakelee HA, Patnaik A, Sikic BI, Mita M, Fox NL, Miceli R, et al. Phase I and pharmacokinetic study of lexatumumab (HGS-ETR2) given every 2 weeks in patients with advanced solid tumors. Ann. Oncol 2010;21:376-381. doi:10.1093/annonc/mdp292

[186] Adams C, Totpal K, Lawrence D, Marsters S, Pitti R, Yee S, et al. Structural and functional analysis of the interaction between the agonistic monoclonal antibody Apomab and the proapoptotic receptor DR5. Cell Death Differ 2008;15:751-761. doi:10.1038/sj.cdd.4402306

[187] Scotlandi K, Benini S, Manara MC, Serra M, Nanni P, Lollini PL, et al. Murine model for skeletal metastases of Ewing's sarcoma. J. Orthop. Res 2000;18:959-966. doi:10.1002/jor.1100180616

[188] Van Valen F, Fulda S, Truckenbrod B, Eckervogt V, Sonnemann J, Hillmann A, et al. Apoptotic responsiveness of the Ewing's sarcoma family of tumours to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Int. J. Cancer 2000;88:252-259.

[189] Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades C, Tsokos M. Ewing's sarcoma family tumors are sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and express death receptor 4 and death receptor 5. Cancer Res 2001;61:2704-2712.

[190] Kumar A, Jasmin A, Eby MT, Chaudhary PM. Cytotoxicity of Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand towards Ewing's sarcoma cell lines. Oncogene 2001;20:1010-1014. doi:10.1038/sj.onc.1204154

[191] Kontny HU, Hämmerle K, Klein R, Shayan P, Mackall CL, Niemeyer CM. Sensitivity of Ewing's sarcoma to TRAIL-induced apoptosis. Cell Death Differ 2001;8:506-514. doi:10.1038/sj.cdd.4400836

[192] Merchant MS, Yang X, Melchionda F, Romero M, Klein R, Thiele CJ, et al. Interferon gamma enhances the effectiveness of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonists in a xenograft model of Ewing's sarcoma. Cancer Res 2004;64:8349-8356. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1705

[193] Vaculova A, Kaminskyy V, Jalalvand E, Surova O, Zhivotovsky B. Doxorubicin and etoposide sensitize small cell lung carcinoma cells expressing caspase-8 to TRAIL. Mol. Cancer 2010;9:87. doi:10.1186/1476-4598-9-87

[194] Lee ALZ, Dhillon SHK, Wang Y, Pervaiz S, Fan W, Yang YY. Synergistic anti-cancer

effects via co-delivery of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) and doxorubicin using micellar nanoparticles. Mol Biosyst 2011. doi:10.1039/c0mb00266f

[195] Aroui S, Mili D, Brahim S, De Waard M, Kenani A. Doxorubicin coupled to penetratin promotes apoptosis in CHO cells by a mechanism involving c-Jun NH2-terminal kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun 2010;396:908-914. doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.020

[196] El-Zawahry A, McKillop J, Voelkel-Johnson C. Doxorubicin increases the effectiveness of Apo2L/TRAIL for tumor growth inhibition of prostate cancer xenografts. BMC Cancer 2005;5:2. doi:10.1186/1471-2407-5-2

[197] Lu G, Punj V, Chaudhary PM. Proteasome inhibitor Bortezomib induces cell cycle arrest and apoptosis in cell lines derived from Ewing's sarcoma family of tumors and synergizes with TRAIL. Cancer Biol. Ther 2008;7:603-608.

[198] Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, Jong S de, Samali A. TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? Cancer Treat. Rev 2009;35:280-288. doi:10.1016/j.ctrv.2008.11.006

[199] Horak P, Pils D, Haller G, Pribill I, Roessler M, Tomek S, et al. Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. Mol. Cancer Res 2005;3:335-343. doi:10.1158/1541-7786.MCR-04-0136

[200] Jin Z, McDonald ER, Dicker DT, El-Deiry WS. Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. J. Biol. Chem 2004;279:35829-35839. doi:10.1074/jbc.M405538200

[201] Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. Cancer Gene Ther 2005;12:228-237. doi:10.1038/sj.cgt.7700792

[202] Dyer MJS, MacFarlane M, Cohen GM. Barriers to effective TRAIL-targeted therapy of malignancy. J. Clin. Oncol 2007;25:4505-4506. doi:10.1200/JCO.2007.13.1011

[203] LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. Cell Death Differ 2003;10:66-75. doi:10.1038/sj.cdd.4401187

[204] Zhang XD, Franco A, Myers K, Gray C, Nguyen T, Hersey P. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. Cancer Res 1999;59:2747-2753.

[205] Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature 1997;388:190-195. doi:10.1038/40657

[206] Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. J. Biol. Chem 1997;272:17255-17257.

[207] Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. Mol. Cell. Biol 2001;21:8247-8254. doi:10.1128/MCB.21.24.8247-8254.2001

[208] Thome M, Tschopp J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP.

Nat. Rev. Immunol 2001;1:50-58. doi:10.1038/35095508

[209] Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. Int. J. Biochem. Cell Biol 2010;42:210-213. doi:10.1016/j.biocel.2009.11.015

[210] Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. J. Biol. Chem 2005;280:14507-14513. doi:10.1074/jbc.M414425200

[211] Yu JW, Jeffrey PD, Shi Y. Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2009;106:8169-8174. doi:10.1073/pnas.0812453106

[212] Wang X, Chen W, Zeng W, Bai L, Tesfaigzi Y, Belinsky SA, et al. Akt-mediated eminent expression of c-FLIP and Mcl-1 confers acquired resistance to TRAIL-induced cytotoxicity to lung cancer cells. Mol. Cancer Ther 2008;7:1156-1163. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-2183

[213] Guseva NV, Rokhlin OW, Taghiyev AF, Cohen MB. Unique resistance of breast carcinoma cell line T47D to TRAIL but not anti-Fas is linked to p43cFLIP(L). Breast Cancer Res. Treat 2008;107:349-357. doi:10.1007/s10549-007-9563-2

[214] Panner A, James CD, Berger MS, Pieper RO. mTOR controls FLIPS translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells. Mol. Cell. Biol 2005;25:8809-8823. doi:10.1128/MCB.25.20.8809-8823.2005

[215] Grotzer MA, Eggert A, Zuzak TJ, Janss AJ, Marwaha S, Wiewrodt BR, et al. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. Oncogene 2000;19:4604-4610. doi:10.1038/sj.onc.1203816

[216] Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Bourloud KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N. Loss of caspase-8 expression in neuroblastoma is related to malignancy and resistance to TRAIL-induced apoptosis. Med. Pediatr. Oncol 2000;35:608-611.

[217] Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. Nat. Med 2000;6:529-535. doi:10.1038/75007

[218] Galligan L, Longley DB, McEwan M, Wilson TR, McLaughlin K, Johnston PG. Chemotherapy and TRAIL-mediated colon cancer cell death: the roles of p53, TRAIL receptors, and c-FLIP. Mol. Cancer Ther 2005;4:2026-2036. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0262

[219] Geserick P, Drewniok C, Hupe M, Haas TL, Diessenbacher P, Sprick MR, et al. Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis. Oncogene 2008;27:3211-3220. doi:10.1038/sj.onc.1210985

[220] Wilson TR, McLaughlin KM, McEwan M, Sakai H, Rogers KMA, Redmond KM, et al. c-FLIP: a key regulator of colorectal cancer cell death. Cancer Res 2007;67:5754-5762. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3585

[221] Longley DB, Wilson TR, McEwan M, Allen WL, McDermott U, Galligan L, et al. c-FLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death. Oncogene 2006;25:838-848. doi:10.1038/sj.onc.1209122

[222] Shirley S, Micheau O. Targeting c-FLIP in cancer. Cancer Lett 2010. doi:10.1016/j.canlet.2010.10.009

[223] Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. Nature 1997;388:300-304. doi:10.1038/40901

[224] Schimmer AD, Welsh K, Pinilla C, Wang Z, Krajewska M, Bonneau M-J, et al. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. Cancer Cell 2004;5:25-35.

[225] Fulda S, Meyer E, Debatin K-M. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. Oncogene 2002;21:2283-2294. doi:10.1038/sj.onc.1205258

[226] Taniai M, Grambihler A, Higuchi H, Werneburg N, Bronk SF, Farrugia DJ, et al. Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. Cancer Res 2004;64:3517-3524. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2770

[227] Wirth T, Kühnel F, Fleischmann-Mundt B, Woller N, Djojosubroto M, Rudolph KL, et al. Telomerase-dependent virotherapy overcomes resistance of hepatocellular carcinomas against chemotherapy and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by elimination of Mcl-1. Cancer Res 2005;65:7393-7402. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3664

[228] Kim J-Y, Lee J-Y, Kim D-G, Koo G-B, Yu J-W, Kim Y-S. TRADD is critical for resistance to TRAIL-induced cell death through NF-κB activation. FEBS Lett 2011. doi:10.1016/j.febslet.2011.05.034

[229] Abdulghani J, El-Deiry WS. TRAIL receptor signaling and therapeutics. Expert Opin. Ther. Targets 2010;14:1091-1108. doi:10.1517/14728222.2010.519701

[230] Wassenaar TA, Quax WJ, Mark AE. The conformation of the extracellular binding domain of Death Receptor 5 in the presence and absence of the activating ligand TRAIL: a molecular dynamics study. Proteins 2008;70:333-343. doi:10.1002/prot.21541

[231] Berger A, Quast S-A, Plötz M, Hein M, Kunz M, Langer P, et al. Sensitization of melanoma cells for death ligand-induced apoptosis by an indirubin derivative--Enhancement of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. Biochem. Pharmacol 2011;81:71-81. doi:10.1016/j.bcp.2010.09.010

[232] Shenoy K, Wu Y, Pervaiz S. LY303511 enhances TRAIL sensitivity of SHEP-1 neuroblastoma cells via hydrogen peroxide-mediated mitogen-activated protein kinase activation and up-regulation of death receptors. Cancer Res 2009;69:1941-1950. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1996

[233] Thorburn A, Behbakht K, Ford H. TRAIL receptor-targeted therapeutics: resistance mechanisms and strategies to avoid them. Drug Resist. Updat 2008;11:17-24. doi:10.1016/j.drup.2008.02.001

[234] Szliszka E, Mazur B, Zydowicz G, Czuba ZP, Król W. TRAIL-induced apoptosis and expression of death receptor TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in bladder cancer cells. Folia Histochem. Cytobiol 2009;47:579-585. doi:10.2478/v10042-009-0111-2

[235] Shen Y, Herde R, Doxey BW, Xu C, Gray PD, Kuwada SK. Pharmacologic downregulation of c-FLIP(L) restores juxtacrine death receptor-mediated apoptosis in cancer cells in a peritoneal carcinomatosis model. Int J Cancer 2011.

doi:10.1002/ijc.26119

[236] Bleumink M, Köhler R, Giaisi M, Proksch P, Krammer PH, Li-Weber M. Rocaglamide breaks TRAIL resistance in HTLV-1-associated adult T-cell leukemia/lymphoma by translational suppression of c-FLIP expression. Cell Death Differ 2011;18:362-370. doi:10.1038/cdd.2010.99

[237] Song JH, Song DK, Herlyn M, Petruk KC, Hao C. Cisplatin down-regulation of cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-like inhibitory proteins to restore tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human melanoma cells. Clin. Cancer Res 2003;9:4255-4266.

[238] Park S-J, Kim M-J, Kim H-B, Sohn H-Y, Bae J-H, Kang C-D, et al. Trichostatin A sensitizes human ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by down-regulation of c-FLIPL via inhibition of EGFR pathway. Biochem. Pharmacol 2009;77:1328-1336. doi:10.1016/j.bcp.2008.12.027

[239] Yano K, Horinaka M, Yoshida T, Yasuda T, Taniguchi H, Goda AE, et al. Chetomin induces degradation of XIAP and enhances TRAIL sensitivity in urogenital cancer cells. Int. J. Oncol 2011;38:365-374. doi:10.3892/ijo.2010.874

[240] Jeong J-K, Moon M-H, Seo J-S, Seol J-W, Park S-Y, Lee Y-J. Hypoxia inducing factor-1alpha regulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in tumor cells exposed to hypoxia. Biochem. Biophys. Res. Commun 2010;399:379-383. doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.082

[241] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 1997;89:309-319.

[242] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature 2003;423:337-342. doi:10.1038/nature01658

[243] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, et al. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. Bone 1999;25:109-113.

[244] Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 1998;93:165-176.

[245] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J. Bone Miner. Res 2000;15:2-12. doi:10.1359/jbmr.2000.15.1.2

[246] Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. J. Biol. Chem 1997;272:25190-25194.

[247] Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. Endocrinology 2001;142:1419-1426.

[248] Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H, Seki S, Kasai M, Utsuyama M, et al. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun 2004;314:1021-1027.

[249] Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. Cytokine Growth Factor Rev 2004;15:457-475. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.06.004

[250] Hikita A, Tanaka S. Ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. Adv. Exp. Med. Biol 2007;602:15-21.

[251] Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlöndorff J, et al. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. J. Biol. Chem 1999;274:13613-13618.

[252] Georges S, Ruiz Velasco C, Trichet V, Fortun Y, Heymann D, Padrines M. Proteases and bone remodelling. Cytokine Growth Factor Rev 2009;20:29-41. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.11.005

[253] Sabbota AL, Kim H-RC, Zhe X, Fridman R, Bonfil RD, Cher ML. Shedding of RANKL by tumor-associated MT1-MMP activates Src-dependent prostate cancer cell migration. Cancer Res 2010;70:5558-5566. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4416

[254] Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, et al. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. Cancer Cell 2005;7:485-496. doi:10.1016/j.ccr.2005.04.013

[255] Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. J. Biol. Chem 2001;276:20659-20672. doi:10.1074/jbc.M010153200

[256] Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, et al. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. Bone 1999;25:525-534.

[257] Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature 1997;390:175-179. doi:10.1038/36593

[258] Srivastava S, Matsuda M, Hou Z, Bailey JP, Kitazawa R, Herbst MP, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells. J. Biol. Chem 2003;278:46171-46178. doi:10.1074/jbc.M308545200

[259] Huang JC, Sakata T, Pfleger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. J. Bone Miner. Res 2004;19:235-244. doi:10.1359/JBMR.0301226

[260] Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. J. Immunol 2002;169:3353-3362.

[261] Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biochem. Biophys. Res. Commun 2000;275:768-775. doi:10.1006/bbrc.2000.3379

[262] Kim N, Odgren PR, Kim DK, Marks SC, Choi Y. Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2000;97:10905-10910. doi:10.1073/pnas.200294797

[263] Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. Cell 2000;103:41-50.

[264] Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr. Rev 1999;20:345-357.

[265] Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. J. Exp. Med 1998;188:997-1001.

[266] Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaia M, Hanafusa H, et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. Mol. Cell 1999;4:1041-1049.

[267] Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. J. Exp. Med 1997;186:2075-2080.

[268] Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A, et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. Blood 2001;98:3534-3540.

[269] Zhang J, Dai J, Qi Y, Lin DL, Smith P, Strayhorn C, et al. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. J. Clin. Invest 2001;107:1235-1244. doi:10.1172/JCI11685

[270] Michigami T, Ihara-Watanabe M, Yamazaki M, Ozono K. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) is a key molecule of osteoclast formation for bone metastasis in a newly developed model of human neuroblastoma. Cancer Res 2001;61:1637-1644.

[271] Lau YS, Adamopoulos IE, Sabokbar A, Giele H, Gibbons CLMH, Athanasou NA. Cellular and humoral mechanisms of osteoclast formation in Ewing's sarcoma. Br. J. Cancer 2007;96:1716-1722. doi:10.1038/sj.bjc.6603774

[272] Kim N-S, Kim H-J, Koo B-K, Kwon M-C, Kim Y-W, Cho Y, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. Mol. Cell. Biol 2006;26:1002-1013. doi:10.1128/MCB.26.3.1002-1013.2006

[273] Ando K, Mori K, Rédini F, Heymann D. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. Curr Drug Discov Technol 2008;5:263-268.

[274] Mori K, Ando K, Heymann D, Rédini F. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) stimulates bone-associated tumors through functional RANK expressed on bone-associated cancer cells? Histol. Histopathol 2009;24:235-242.

[275] Armstrong AP, Miller RE, Jones JC, Zhang J, Keller ET, Dougall WC. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. Prostate 2008;68:92-104.

doi:10.1002/pros.20678

[276] Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. Nature 2006;440:692-696. doi:10.1038/nature04524

[277] Mikami S, Katsube K-ichi, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mizuno R, et al. Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. J. Pathol 2009;218:530-539. doi:10.1002/path.2567

[278] Mori K, Le Goff B, Charrier C, Battaglia S, Heymann D, Rédini F. DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NFkappaB: new insights in the prostate cancer bone metastasis process. Bone 2007;40:981-990. doi:10.1016/j.bone.2006.11.006

[279] Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun 1998;253:395-400. doi:10.1006/bbrc.1998.9788

[280] Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. J. Exp. Med 2000;192:463-474.

[281] Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2000;97:1566-1571.

[282] Guerrini MM, Sobacchi C, Cassani B, Abinun M, Kilic SS, Pangrazio A, et al. Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations. Am. J. Hum. Genet 2008;83:64-76. doi:10.1016/j.ajhg.2008.06.015

[283] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. Endocrinology 1998;139:1329-1337.

[284] Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Kobayashi F, Tsuda E, Morinaga T, et al. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. J. Biol. Chem 1998;273:5117-5123.

[285] Holen I, Shipman CM. Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. Clin. Sci 2006;110:279-291. doi:10.1042/CS20050175

[286] Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. J. Biol. Chem 2005;280:41155-41164. doi:10.1074/jbc.M506366200

[287] Théoleyre S, Kwan Tat S, Vusio P, Blanchard F, Gallagher J, Ricard-Blum S, et al. Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK. Biochem. Biophys. Res. Commun 2006;347:460-467. doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.120

[288] Lamoureux F, Picarda G, Garrigue-Antar L, Baud'huin M, Trichet V, Vidal A, et al. Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma. Cancer Res 2009;69:526-536. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2648

[289] Holen I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. Cancer Res 2002;62:1619-1623.

[290] Holen I, Cross SS, Neville-Webbe HL, Cross NA, Balasubramanian SP, Croucher PI, et al. Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast tumours in vivo--a role in tumour cell survival? Breast Cancer Res. Treat 2005;92:207-215. doi:10.1007/s10549-005-2419-8

[291] Pettersen I, Bakkelund W, Smedsrød B, Sveinbjørnsson B. Osteoprotegerin is expressed in colon carcinoma cells. Anticancer Res 2005;25:3809-3816.

[292] Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, et al. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. J. Immunol 1998;161:6113-6121.

[293] Neville-Webbe HL, Cross NA, Eaton CL, Nyambo R, Evans CA, Coleman RE, et al. Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. Breast Cancer Res. Treat 2004;86:269-279.

[294] Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. Endocrinology 2001;142:2205-2212.

[295] Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, et al. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects. J. Biol. Chem 2001;276:36241-36250. doi:10.1074/jbc.M104319200

[296] Brändström H, Björkman T, Ljunggren O. Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun 2001;280:831-835. doi:10.1006/bbrc.2000.4223

[297] Gao YH, Shinki T, Yuasa T, Kataoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, et al. Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). Biochem. Biophys. Res. Commun 1998;252:697-702. doi:10.1006/bbrc.1998.9643

[298] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev 1998;12:1260-1268.

[299] Terpos E, Voskaridou E. Interactions between osteoclasts, osteoblasts and immune cells: implications for the pathogenesis of bone loss in thalassemia. Pediatr Endocrinol Rev 2008;6 Suppl 1:94-106.

[300] Mitchner NA, Harris ST. Current and emerging therapies for osteoporosis. J Fam Pract 2009;58:S45-49.

[301] Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin

(OPG) ratio is increased in severe osteolysis. Am. J. Pathol 2003;163:2021-2031.

[302] Morony S, Capparelli C, Sarosi I, Lacey DL, Dunstan CR, Kostenuik PJ. Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. Cancer Res 2001;61:4432-4436.

[303] Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. J. Bone Miner. Res 2001;16:348-360. doi:10.1359/jbmr.2001.16.2.348

[304] Body J-J. Effectiveness and cost of bisphosphonate therapy in tumor bone disease. Cancer 2003;97:859-865. doi:10.1002/cncr.11139

[305] Lamoureux F, Moriceau G, Picarda G, Rousseau J, Trichet V, Rédini F. Regulation of osteoprotegerin pro- or anti-tumoral activity by bone tumor microenvironment. Biochim. Biophys. Acta 2010;1805:17-24. doi:10.1016/j.bbcan.2009.08.004

[306] Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y, et al. Biology and action of colony--stimulating factor-1. Mol. Reprod. Dev 1997;46:4-10. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199701)46:1<4::AID-MRD2>3.0.CO;2-V

[307] Biskobing DM, Fan X, Rubin J. Characterization of MCSF-induced proliferation and subsequent osteoclast formation in murine marrow culture. J. Bone Miner. Res 1995;10:1025-1032. doi:10.1002/jbmr.5650100706

[308] Sarma U, Flanagan AM. Macrophage colony-stimulating factor induces substantial osteoclast generation and bone resorption in human bone marrow cultures. Blood 1996;88:2531-2540.

[309] Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. Nature 1990;345:442-444. doi:10.1038/345442a0

[310] Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, et al. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1990;87:4828-4832.

[311] Kodama H, Yamasaki A, Nose M, Niida S, Ohgame Y, Abe M, et al. Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (op/op) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. J. Exp. Med 1991;173:269-272.

[312] Felix R, Cecchini MG, Fleisch H. Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. Endocrinology 1990;127:2592-2594.

[313] Dai X-M, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, et al. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. Blood 2002;99:111-120.

[314] D'Amelio P, Roato I, D'Amico L, Veneziano L, Suman E, Sassi F, et al. Bone and bone marrow pro-osteoclastogenic cytokines are up-regulated in osteoporosis fragility fractures. Osteoporos Int 2010. doi:10.1007/s00198-010-1496-7

[315] Knowles HJ, Athanasou NA. Canonical and non-canonical pathways of

osteoclast formation. Histol. Histopathol 2009;24:337-346.

[316] Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. J. Exp. Med 1999;190:1741-1754.

[317] Ross FP, Teitelbaum SL. alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. Immunol. Rev 2005;208:88-105. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00331.x

[318] Vandyke K, Fitter S, Dewar AL, Hughes TP, Zannettino ACW. Dysregulation of bone remodeling by imatinib mesylate. Blood 2010;115:766-774. doi:10.1182/blood-2009-08-237404

[319] Vandyke K, Dewar AL, Diamond P, Fitter S, Schultz CG, Sims NA, et al. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib dysregulates bone remodeling through inhibition of osteoclasts in vivo. J. Bone Miner. Res 2010;25:1759-1770. doi:10.1002/jbmr.85

[320] Ohno H, Kubo K, Murooka H, Kobayashi Y, Nishitoba T, Shibuya M, et al. A c-fms tyrosine kinase inhibitor, Ki20227, suppresses osteoclast differentiation and osteolytic bone destruction in a bone metastasis model. Mol. Cancer Ther 2006;5:2634-2643. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0313

[321] Manthey CL, Johnson DL, Illig CR, Tuman RW, Zhou Z, Baker JF, et al. JNJ-28312141, a novel orally active colony-stimulating factor-1 receptor/FMS-related receptor tyrosine kinase-3 receptor tyrosine kinase inhibitor with potential utility in solid tumors, bone metastases, and acute myeloid leukemia. Mol. Cancer Ther 2009;8:3151-3161. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0255

[322] Kudo O, Fujikawa Y, Itonaga I, Sabokbar A, Torisu T, Athanasou NA. Proinflammatory cytokine (TNFalpha/IL-1alpha) induction of human osteoclast formation. J. Pathol 2002;198:220-227. doi:10.1002/path.1190

[323] Rübe CE, van Valen F, Wilfert F, Palm J, Schuck A, Willich N, et al. Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor cells produce large quantities of bioactive tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) after radiation exposure. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys 2003;56:1414-1425.

[324] Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. J. Biol. Chem 2000;275:4858-4864.

[325] Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J. Exp. Med 2000;191:275-286.

[326] Javelaud D, Wietzerbin J, Delattre O, Besançon F. Induction of p21Waf1/Cip1 by TNFalpha requires NF-kappaB activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. Oncogene 2000;19:61-68. doi:10.1038/sj.onc.1203246

[327] Lagirand-Cantaloube J, Laud K, Lilienbaum A, Tirode F, Delattre O, Auclair C, et al. EWS-FLI1 inhibits TNFalpha-induced NFkappaB-dependent transcription in Ewing sarcoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun 2010;399:705-710. doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.004

[328] Bachmann F, Nast A, Sterry W, Philipp S. Safety and efficacy of the tumor necrosis

factor antagonists. Semin Cutan Med Surg 2010;29:35-47. doi:10.1016/j.sder.2010.02.002

[329] Askling J, Fahrbach K, Nordstrom B, Ross S, Schmid CH, Symmons D. Cancer risk with tumor necrosis factor alpha (TNF) inhibitors: meta-analysis of randomized controlled trials of adalimumab, etanercept, and infliximab using patient level data. Pharmacoepidemiol Drug Saf 2010. doi:10.1002/pds.2046

[330] Bakewell SJ, Nestor P, Prasad S, Tomasson MH, Dowland N, Mehrotra M, et al. Platelet and osteoclast beta3 integrins are critical for bone metastasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2003;100:14205-14210. doi:10.1073/pnas.2234372100

[331] Body J-J, Lipton A, Gralow J, Steger GG, Gao G, Yeh H, et al. Effects of denosumab in patients with bone metastases with and without previous bisphosphonate exposure. J. Bone Miner. Res 2010;25:440-446. doi:10.1359/jbmr.090810

[332] Nanes MS. Preventing metastases to bone: denosumab or bisphosphonates? J. Bone Miner. Res 2010;25:437-439. doi:10.1002/jbmr.71

[333] Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. Curr Opin Pharmacol 2005;5:618-625. doi:10.1016/j.coph.2005.06.005

[334] Picarda G, Lamoureux F, Geffroy L, Delepine P, Montier T, Laud K, et al. Preclinical evidence that use of TRAIL in Ewing's sarcoma and osteosarcoma therapy inhibits tumor growth, prevents osteolysis, and increases animal survival. Clin. Cancer Res 2010;16:2363-2374. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1779

[335] Vitovski S, Phillips JS, Sayers J, Croucher PI. Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways. J. Biol. Chem 2007;282:31601-31609. doi:10.1074/jbc.M706078200

[336] Sordillo EM, Pearse RN. RANK-Fc: a therapeutic antagonist for RANK-L in myeloma. Cancer 2003;97:802-812. doi:10.1002/cncr.11134

[337] Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Rédini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. Cell. Mol. Life Sci 2007;64:2334-2350. doi:10.1007/s00018-007-7104-0

[338] Wittrant Y, Théoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. Biochim. Biophys. Acta 2004;1704:49-57. doi:10.1016/j.bbcan.2004.05.002

[339] Hernandez J, Cooper J, Babel N, Morton C, Rosemurgy AS. TNFalpha gene delivery therapy for solid tumors. Expert Opin Biol Ther 2010;10:993-999. doi:10.1517/14712598.2010.482925

[340] Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. Nat. Med 1999;5:828-831. doi:10.1038/10552

[341] Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic

colitis. J. Clin. Invest 2008;118:560-570. doi:10.1172/JCI32453

[342] Egberts J-H, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, Klose S, et al. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. Cancer Res 2008;68:1443-1450. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5704

[343] Li B, Vincent A, Cates J, Brantley-Sieders DM, Polk DB, Young PP. Low levels of tumor necrosis factor alpha increase tumor growth by inducing an endothelial phenotype of monocytes recruited to the tumor site. Cancer Res 2009;69:338-348. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1565

[344] Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. J. Leukoc. Biol 1998;64:275-290.

[345] Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, Charles KA, Kulbe H, Thompson RG, et al. « Re-educating » tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. J. Exp. Med 2008;205:1261-1268. doi:10.1084/jem.20080108

[346] Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. Nature 1968;217:370-371.

[347] Riggi N, Suvà M-L, Suvà D, Cironi L, Provero P, Tercier S, et al. EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. Cancer Res 2008;68:2176-2185. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1761

[348] Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. J. Biol. Chem 1998;273:32347-32352.

[349] Sturge J, Caley MP, Waxman J. Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. Nat Rev Clin Oncol 2011;8:357-368. doi:10.1038/nrclinonc.2011.67

[350] Mace TA, Yamane N, Cheng J, Hylander BL, Repasky EA. The potential of the tumor microenvironment to influence Apo2L/TRAIL induced apoptosis. Immunol. Invest 2006;35:279-296. doi:10.1080/08820130600745463

Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le sarcome d'Ewing par inhibition du cercle vicieux entre prolifération tumorale et résorption osseuse.

Mots-clés : sarcome d'Ewing, cercle vicieux, TRAIL, OPG, TNF-α, microenvironnement tumoral osseux

Le sarcome d'Ewing est la deuxième tumeur osseuse primitive la plus fréquente après l'ostéosarcome et touche préférentiellement une population jeune. Malgré les progrès réalisés dans sa prise en charge thérapeutique, les taux de survie à 5 ans pour les patients à hauts risques restent faibles et mettent en évidence la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Une voie de recherche prometteuse repose sur le ciblage du microenvironnement osseux et notamment du cercle vicieux qui s'établit entre le développement tumoral et la résorption osseuse au cours du développement tumoral en site osseux. L'objectif de cette thèse a été d'évaluer les effets de deux stratégies thérapeutiques pour briser ce cercle vicieux dans des modèles précliniques de xénogreffe de sarcome d'Ewing. Dans un premier temps, pour cibler directement le développement tumoral, nous avons étudié l'activité thérapeutique du TNF Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), cytokine à forte activité antitumorale, administré par transfert de gène non viral. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux potentiels effets thérapeutiques de l'inhibition de la résorption osseuse en ciblant spécifiquement les deux voies d'ostéoclastogenèse impliquées dans l'apparition des lésions osseuse associées au développement tumoral. Pour cela, nous avons choisi d'inhiber spécifiquement par transfert de gène non viral, les voies impliquant le Receptor Activator of NFκB Ligand (RANKL) et le Tumor Necrosis Factor α (TNF-α), respectivement par l'administration de l'ostéoprotégérine et de TNF-Receptor 1 (TNF-R1), deux antagonistes solubles de ces cytokines.

Development of new therapeutic strategies in Ewing sarcoma by inhibiting the vicious cycle between tumor proliferation and bone resorption

Key words : Ewing sarcoma, vicious cycle, TRAIL, OPG, TNF-α, bone tumor microenvironment

Ewing sarcoma is the second most common malignant primary bone tumor after osteosarcoma and develops mainly in young patients. Despite advances in treatment, survival rate for high risks patients remains low which underlines the necessity to find new therapeutic strategies. A promising approach consists in targeting the bone microenvironment and particularly the vicious cycle that occurs between bone resoprtion and tumor proliferation during tumor development in the bone site. The aim of this thesis was to evaluate the effects of two therapeutic strategies to break this vicious cycle using preclinical xenograft models of Ewing sarcoma. First, we studied the therapeutic activity of TNF Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), a cytokine with a strong antitumoral activity, administered by non viral gene transfer in order to target directly the tumor development. Next, we studied the potential therapeutic effects of the inhibition of bone resorption by targeting specifically the two osteoclastogenesis pathways implicated in bone lesion occurrence during tumor development, the Receptor Activator of NFκB Ligand (RANKL) and Tumor Necrosis Factor α (TNF-α) pathways. To this aim, we chose to inhibit specifically, by non viral gene transfer RANKL and TNF-α by administering respectively osteoprotegerin and TNF-Receptor 1 (TNF-R1), two soluble antagonists of these cytokines.

PICARDA Gaëlle
10 rue Lamoricière
44100 NANTES