

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Intérêts thérapeutiques des molécules d'ARN interférence dans deux pathologies osseuses rares

THESE DE DOCTORAT

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

*réalisée au sein du laboratoire INSERM U957 – Physiopathologie de la résorption
osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives*

présentée et soutenue publiquement par

Julie ROUSSEAU

le 3 Novembre 2010, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

M LE PAPE Alain

Directeur de recherche – CNRS TAAM-UPS44, Centre d'imagerie
du petit animal - Orléans

M ROSSET Philippe

Professeur des universités, Praticien hospitalier – Hôpital
Trousseau, service d'orthopédie – Tours

Examinatrice

Mme ESCRIOU Virginie

Chargée de recherche - UMR 8151, UMR-S 1022 – Paris V

Directrices de thèse

Mme REDINI Françoise

Directrice de recherche – INSERM U957 – Nantes

Mme TRICHET Valérie

Maître de conférences universitaires – INSERM U957 – Nantes

SOMMAIRE

- Liste des abréviations
- Liste des figures et tableaux

INTRODUCTION GENERALE	1
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. L'ARN interférence : principes et applications	7
1.1. Historique et découverte	7
1.2. Rôles et mécanismes physiologiques de l'ARNi	8
1.2.1. Rôles physiologiques de l'ARNi.....	8
1.2.2. Les siRNAs : molécules effectrices de la voie exogène de l'ARNi.....	11
1.2.3. Les microARNs (miRNAs) : ARNs endogènes non codants répresseurs de l'expression post-transcriptionnelle.....	12
1.3. Applications de l'ARNi en recherche.....	14
1.3.1. Les molécules de l'ARNi utilisées en recherche.....	14
1.3.2. Utilisation des molécules d'ARNi en génétique inversée	18
1.3.3. Outils thérapeutiques	19
2. Le tissu osseux	24
2.1. Organisation structurale du tissu osseux.....	26
2.2. La matrice extracellulaire composant la trame osseuse	27
2.2.1. La matrice extracellulaire organique	27
2.2.2. La fraction minérale	29
2.3. Les cellules osseuses	31
2.3.1. Les ostéoblastes et les ostéocytes	31
2.3.2. Les ostéoclastes	33
2.4. Le remodelage osseux	36
2.4.1. Les étapes du remodelage osseux.....	38
2.4.2. Régulation du remodelage osseux : la triade OPG / RANK / RANKL ...	40
3. L'ostéosarcome : une tumeur osseuse primitive	45
3.1. Données épidémiologiques et étiologie des ostéosarcomes.....	45
3.2. Diagnostic des ostéosarcomes : imagerie médicale et analyse anatomopathologique	47
3.3. Traitement conventionnel de l'ostéosarcome	51
3.4. Le cercle vicieux : développement tumoral en site osseux et ostéolyse	57
3.5. Inhibition de l'ostéolyse para-tumorale : nouvelle stratégie thérapeutique de l'ostéosarcome ?.....	58
3.5.1. Inhibition de l'activité biologique des ostéoclastes.....	58
3.5.2. Inhibition de RANKL.....	60
3.6. Développement de siRNAs à visée thérapeutique ciblant RANKL dans l'ostéosarcome.....	62

4. L'ostéogénèse imparfaite.....	65
4.1. Epidémiologie et classification	65
4.2. Problématique biologique de l'ostéogénèse imparfaite	68
4.3. Diagnostic	71
4.4. Prise en charge de l'OI par des traitements palliatifs	73
4.5. Nouvelles stratégies de thérapie.....	74
4.5.1. Greffes allogéniques de cellules souches issues de la moelle osseuse.....	76
4.5.2. Thérapies géniques : transfert stable d'un gène fonctionnel ou de molécules inhibant spécifiquement l'expression du transcrit muté.....	77
4.6. shRNAs thérapeutiques dans l'ostéogénèse imparfaite	79

RESULTATS	80
-----------------	----

CHAPITRE 1 : Développement d'un protocole d'administration efficace de siRNAs dans le microenvironnement de l'ostéosarcome..... 81

1. INTRODUCTION	82
1.1. Les modèles animaux d'ostéosarcome.....	83
1.2. Passage de la membrane cellulaire	86
1.3. La voie d'administration	92
1.4. Les effets non spécifiques des siRNAs	93
1.5. Choix d'investigations	94
2. ARTICLE 1	98
Avantages de l'imagerie par bioluminescence pour évaluer l'efficacité de traitement par des siRNAs ou par des agents de chimiothérapie dans des modèles murins d'ostéosarcome	98
3. CONCLUSIONS ET DISCUSSION.....	99

CHAPITRE 2 : Inhibition de Rankl par injection de siRNAs dans des modèles murins d'ostéosarcome..... 104

1. INTRODUCTION	105
1.1. RANKL : expression physiologique et fonctions biologiques	105
1.1.1. RANKL et tissu osseux	105
1.1.2. Autres fonctions biologiques de RANKL	107
1.2. RANKL et développement tumoral en site osseux.....	108
1.3. siRNAs dirigés contre le transcrit Rankl	111
1.3.1. Gène <i>Rankl</i>	111
1.3.2. Dessin des siRNAs ciblant <i>Rankl</i> de souris et de rat.....	112
1.4. Choix d'investigation.....	114
2. ARTICLE 2 : manuscrit en cours d'écriture	116
L'inhibition de l'expression de Rankl prévient les lésions ostéolytiques associées au développement tumoral et retarde la rechute associée à l'arrêt des traitements de chimiothérapie conventionnelle dans deux modèles murins d'ostéosarcome. 116	
3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	118
3.1. Source de Rankl dans les modèles murins d'ostéosarcome.....	120
3.2. Ciblage des lipoplexes et peptides RDG.....	123
4. DISCUSSION.....	125

4.1. Les inhibiteurs de RANKL	126
4.2. Les thérapies combinées	128
CHAPITRE 3 : Identification et clonage de séquences « shRNA » spécifiques d'un transcrit muté dans un modèle d'ostéogenèse imparfaite.....	130
1. INTRODUCTION	131
1.1. Le collagène de type I	131
1.2. Le modèle BrtlIV	134
1.3. Stratégies innovantes développées pour le traitement de l'ostéogenèse imparfaite	137
1.4. Développement d'une stratégie basée sur l'utilisation de molécules d'ARNi	139
1.4.1. Le gène <i>Colla1</i>	139
1.4.2. Développement de séquences siRNAs spécifiques du transcrit <i>Colla1</i> muté chez la souris BrtlIV	140
1.5. Stratégie d'étude	142
2. MATERIELS ET METHODES	143
2.1. Culture cellulaire.....	143
2.2. Transfection de siRNAs	144
2.2.1. Dessin des siRNAs ciblant spécifiquement le transcrit <i>Colla1</i> muté....	144
2.2.2. Clonage des séquences de l'exon 23 <i>Colla1</i> sauvage ou muté.....	145
2.2.3. Modification stable de cellules HEK	147
2.2.4. Transfection transitoire de siRNAs	149
2.3. Clonage de séquence shRNA.....	150
2.4. RT-qPCR <i>Colla1</i>	155
3. RESULTATS.....	157
3.1. Production de lignées cellulaires exprimant un transcrit luciférase couplé aux séquences <i>Colla1</i> WT ou Mut	157
3.2. Identification de siRNAs anti <i>Colla1</i> muté dans les modèles cellulaires HEK- <i>Colla1-exon23WT</i> et HEK- <i>Colla1-exon23Mut</i>	159
3.3. Validation des siRNAs anti <i>Colla1</i> muté dans des fibroblastes de souris BrtlIV 160	
3.4. Clonage de séquences « shRNA » à partir des siRNAs « e » et « f ».....	163
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	167
4.1. Thérapie cellulaire : les cellules souches mésenchymateuses	167
4.2. Thérapie génique : les vecteurs rétroviraux	169
5. DISCUSSION.....	172
CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALES.....	175
ANNEXES	182
Annexe 1.....	183
Annexe 2.....	184
BIBLIOGRAPHIE	185

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique	NB : nota bene
ALD : adrénoleucodystrophie	NCBI : National Center for Biotechnology Information
ARN : acide ribonucléique	NFκB : nuclear factor κ B
ARNdb : ARN double brin	OI : ostéogenèse imparfaite
ARNi : ARN interférence	OPG : ostéoprotégérine
ARNm : ARN messenger	ORF : cadre ouvert de lecture
ATP : adenosine tri-phosphate	OSM : oncostatine M
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool	PAL : phosphatase alcaline
BLI : bioluminescence <i>in vivo</i>	PAZ : piwi argonaute zwiille
BMP : bone morphogenetic protein	PCR : polymerase chain reaction
Brtl : brittle (fragile)	PEG : polyéthylène glycol
CLC : cardiotrophin-like cytokine	PET : tomographie à émission de positrons
Cl2Co : chlorure de cobalt	PGE2 : prostaglandine E2
CSM : cellules souches mésenchymateuses	PNP : polymorphisme nucléotidique ponctuel
CSH : cellules souches hématopoïétiques	PTH : hormone parathyroïdienne
CT : contrôle	PTH-rP : PTH-relatide peptide
DFO : desferoxamine	RANK : receptor activator of nuclear factor κB
DOPE : dioléylphosphatidyléthanolamine	RANKL : RANK ligand
EGFP : enhanced green fluorescent protein	Rb : retinoblastoma susceptibility tumor-supressor
FAK : focal adhesion kinase	RGD : peptide arginine, glycine, acide aspartique
FDG : fluorodésoxyglucose	RISC : RNA-inducing silencing complex
FGF : fibroblast growth factor	siRNA : small interfering RNA
FPPs : farnesyl diphosphate synthase	shRNA : short hairpin RNA
GAG : glycosaminoglycanes	SPECT : Single photon emission computed tomography
GFP : green fluorescent protein	STAT : signal transducer and activator of transcription
HEK : cellules humaines de rein foetal	TDM : Tomodensitométrie
HIF : hypoxia inducible factor	TGF : transforming growth factor
IFN : interferon	TLR : toll-like receptor
IGF : insulin like growth factor	TNF : tumor necrosis factor
IL- : interleukine	TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
IRM : imagerie par résonance magnétique	TRAF : TNF-receptor-associated-factor
JAK : janus kinase	TRAP : tartrate resistant acidic protein
JNK : c-jun N-terminal kinase	UTR : région non traduite
LacZ : β-galactosidase	VEGF : vascular endothelial growth factor
LucF : luciférase <i>firefly</i>	WT : sauvage
MAPK : mitogen activated protein kinase	
M-CSF : macrophage-colony stimulating factor	
MDA : melanoma differentiation associated gene	
MDP : méthylène disphosphonate	
miRNA : micro-RNA	
MMPs : matrix metalloproteinases	
MUT : muté	

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Mécanismes de l'ARN interférence : la voie endogène des miRNA et la réponse à l'entrée d'ARNdb exogènes	10
Figure 2 : Les différentes molécules utilisées pour induire de manière artificielle la répression de l'expression des gènes par ARN interférence..	15
Figure 3 : Séquences d'ADN pour le clonage de séquences de type shRNA sous le contrôle du promoteur H1	17
Figure 4 : Répartition des essais cliniques en cours chez l'Homme.	21
Figure 5 : Représentation schématique de la structure d'un os..	25
Figure 7 : Les cellules de la lignée ostéoblastique..	30
Figure 8 : Coloration d'ostéocytes figés dans les lamelles concentriques de l'unité structurale de l'os compact : l'ostéon.	32
Figure 9 : Les ostéoclastes : différenciation et mécanisme d'action.....	34
Figure 10 : Les différentes étapes du remodelage osseux.....	37
Figure 11 : La triade moléculaire OPG/RANK/RANKL et la différenciation ostéoclastique.	39
Figure 12 : Données radiographiques de souris sauvages, surexprimant la cytokine pro-résorptive Rankl ou inactivées pour le gène <i>Rankl</i>	41
Figure 13 : Clichés radiographiques d'une cage thoracique chez un patient sain et un patient atteint d'ostéopétrose caractérisée par une mutation dans le gène codant le récepteur RANK.....	41
Figure 14 : Analyses microscanner de fémurs chez des souris sauvages et des souris transgéniques surexprimant l'ostéoprotégérine	41
Figure 15 : Clichés radiographiques présentant les lésions osseuses associées au développement d'un ostéosarcome.....	45
Figure 16 : Détection macroscopique d'une tuméfaction sur l'humérus gauche.....	47
Figure 18 : Scintigraphie osseuse des ostéosarcomes chez l'Homme..	48
Figure 17 : Images de l'ostéosarcome de la figure 16 obtenues par IRM	49

Figure 19 : Coloration hématoxyline, éosine, safran d'un ostéosarcome télangiectasique.	51
Figure 20 : Schéma de prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome par la chimiothérapie en France.....	52
Figure 21 : Exemple d'analyse pour l'estimation du nombre de cellules tumorales résiduelles sur une pièce de résection d'un ostéosarcome de la hanche.).	54
Figure 22 : Cercle vicieux entre prolifération tumorale et hyper-résorption osseuse d'origine maligne.	56
Figure 23 : Schéma de prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome dans le protocole OS2006 associant traitement conventionnel et acide zolédronique (Zometa®)..	59
Figure 24 : Signes cliniques observés chez les patients atteints d'ostéogénèse imparfaite..	64
Figure 25 : Maturation des chaînes de collagène de type I et minéralisation osseuse.	69
Figure 26 : Représentation schématique des gènes COL1A1 et COL1A2 et structure du collagène de type I sauvage ou muté.	70
Figure 27 : Stabilisation chirurgicale du membre inférieur par introduction d'une tige intramédullaire (système télescopique de Sheffield) chez un patient atteint d'ostéogénèse imparfaite	72
Figure 28 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuses.....	75
Figure 29 : Caractéristiques du modèle d'ostéosarcome OSRGA induit par transplantation chez le rat Sprague-Dawley.....	84
Figure 30 : Caractéristiques du modèle d'ostéosarcome POS-1 induit par transplantation chez la souris C3H/HeN.....	84
Figure 31 : Administration de siRNAs <i>in vivo</i> et principaux obstacles physiologiques. .	86
Figure 32 : Endocytose non conventionnelle de liposome en thérapie génique.	89
Figure 33 : Le liposome cationique RPR209120/DOPE. Il est chimiquement composé d'un lipide cationique (le RPR209120) associé à un co-lipide neutre (la DOPE) de manière à former une sphère entourée d'une bicouche lipidique.....	90
Figure 34 : Utilisation de la BLI pour le suivi de progéniteurs ostéoblastiques <i>in vivo</i>	100
Figure 35 : Validation d'un transfert de gène dans le muscle par bioluminescence <i>in vivo</i>	100
Figure 36 : Exemple de détection du développement tumoral de l'ostéosarcome par	

bioluminescence <i>in vivo</i>	102
Figure 37 : Augmentation de l'expression de Rankl dans les tumeurs d'ostéosarcome.	109
Figure 38 : Alignement de séquence des transcrits codant Rankl de souris (<i>Mus musculus</i>), de rat (<i>Rattus norvegicus</i>) et RANKL humain (<i>Homo sapiens</i>).....	110
Figure 39 : Positionnement et séquences des siRNA-749 et -795 ciblant les transcrits Rankl de souris et de rat..	113
Figure 40 : Analyse de l'expression de Rankl dans la tumeur POS-1 exprimant l'EGFP par cytométrie en flux.....	119
Figure 42 : Détection de Rankl par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs.	121
Figure 41 : Induction de la transcription de Rankl dans une lignée d'ostéoblastes (MC3T3) et dans une lignée d'ostéosarcome (POS-1).....	122
Figure 43 : Induction de l'expression de Rankl dans des conditions mimant l'hypoxie.	123
Figure 44 : Comparaison de séquences de l'exon 23 Wild Type et Muté.....	133
Figure 45 : Comparaison par analyse radiographique de souris sauvages et du modèle d'ostéogenèse imparfaite BrtlIV en croissance et à l'âge adulte.....	135
Figure 46 : Alignement d'une partie des séquences des transcrits codant Col1a1 chez la souris (<i>Mus musculus</i>) et chez l'Homme (<i>Homo sapiens</i>)..	138
Figure 47 : Structure des gènes codant les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I.	139
Figure 48 : Positionnement des séquences de siRNA ciblant le transcrit Col1a1 muté chez la souris BrtlIV.....	141
Figure 49 : Stratégie de clonage des séquences codant une partie de l'exon 23 du gène Col1a1 sauvage ou muté dans un vecteur lentiviral : le pLNT-LucF.....	145
Figure 50 : Schéma de la cassette ADN pour la production de séquences shRNA. .	151
Figure 51 : Représentation schématique de l'appariement des oligonucléotides pour le clonage de séquences servant à la production de shRNAs selon la stratégie établie par Chang et al.....	151
Figure 52 : Première étape du clonage des duplex d'oligonucléotides dans le plasmide pSUPER.....	152
Figure 53 : Deuxième étape du clonage de la cassette promoteur H1 + cassette ADN pour la production des shRNAs dans le vecteur lentiviral pFG12.....	154
Figure 54 : Stratégie mise en place pour évaluer l'effet des 6 séquences de siRNA	

anti- <i>Colla1</i> muté sur une partie du transcrit muté lui-même ou du transcrit sauvage codant la luciférase.....	157
Figure 55 : Mesure de l'activité luciférase après transduction par des volumes croissants de particules lentivirales LucF-WT et LucF-Mut dans les cellules HEK.....	158
Figure 56 : Inhibition de l'activité luciférase après transfection transitoire de siRNAs dans les modèles cellulaires HEK exprimant la luciférase.....	160
Figure 57 : Niveau d'expression des ARNm <i>Colla1</i> endogènes évalués par qPCR après transfection transitoire de siRNAeWT par deux agents de transfection : la lipofectamine et l'interféline.	162
Figure 58 : Expression relative des transcrits <i>Colla1</i> sauvage et muté dans les fibroblastes de souris BrlIV mesurée par qPCR allèle spécifique.....	163
Figure 59 : Exemple d'une délétion révélée par le séquençage d'une minipréparation de plasmide pSUPER-shRNAColl1eWT.....	1654
Figure 60: Analyse par cytométrie en flux de l'expression de l'EGFP après transduction par les particules lentivirales « shRNA » des fibroblastes mutés.....	166
Figure 61 : Principales caractéristiques des deux classes d'agents pharmacologiques utilisés en clinique : les agents chimiques et les agents biologiques (protéines recombinantes et anticorps) comparées aux propriétés des molécules thérapeutiques dérivées de l'ARNi ³⁵	177

Tableaux :

Tableau 1 : Exemples de transcrits ciblés par les miRNAs endogènes.....	13
Tableau 2 : Organes et pathologies ciblées pour le développement de stratégies basées sur l'utilisation de molécules d'ARNi.....	20
Tableau 3 : Classification des ostéogénèses imparfaites.....	67
Tableau 4 : Liste des principaux vecteurs synthétiques et/ou chimiques utilisés pour le transfert de molécules d'ARNi dans des études précliniques.....	87
Tableau 5 : Exemples de stratégies basées sur l'administration locale de molécules d'ARNi synthétiques complexées à des systèmes lipidiques	91
Tableau 6 : Exemples d'utilisation des techniques d'imagerie pour la mise au point de protocoles basés sur l'injection de molécules d'ARNi.. ..	95
Tableau 7 : Analyses des deux séquences de siRNA dessinées de manière à inhiber les transcrits <i>Rankl</i> de rat et de souris selon les recommandations de Reynolds et al.	113

Tableau 8 : Résultats obtenus par qPCR allèle spécifique après transfection des siRNAs anti *Col1a1* muté « e » et « f » dans les fibroblastes de souris BrtlIV. 161

Tableau 9 : Relation entre le nombre de mutation et leur positionnement sur les séquences siRNA anti-*Col1a1* Mut avec leur effet d'inhibition du transcrit LucF-WT et LucF-Mut. 173

INTRODUCTION GENERALE

L'ARN interférence est un mécanisme physiologique d'inhibition post-transcriptionnelle de l'expression des gènes basé sur une complémentarité de séquence entre de petits ARNs double brin, les siRNAs et l'ARN messager cible. Depuis la découverte de ce mécanisme dans les cellules de mammifères en 2001, l'utilisation de siRNA synthétiques est apparue comme une nouvelle stratégie thérapeutique en visant l'expression de gènes impliqués dans le développement de pathologies. En effet, de nombreuses études en cours visent à tester le potentiel thérapeutique de siRNAs transitoirement injectés ou l'intégration de séquences shRNA pour corriger stablement l'expression de transcrits au sein de cellules cibles. Mon travail de thèse a pour but d'évaluer ces deux aspects du potentiel thérapeutique de l'ARN interférence (1) par injection de siRNAs anti-résorption osseuse dans un contexte tumoral : l'ostéosarcome, (2) par modification stable de cellules par des séquences shRNA dans un contexte de pathologie génétique à caractère dominant : l'ostéogenèse imparfaite.

Dans le cadre du développement tumoral en site osseux (tumeurs primaires et métastases osseuses), un cercle vicieux s'établit entre la prolifération tumorale et la résorption osseuse. Cette ostéolyse est due à l'activation et la différenciation des ostéoclastes via la reconnaissance de la cytokine RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) par son récepteur RANK. Ainsi, des études précliniques dans un modèle d'ostéosarcome (la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives), ont montré que l'inactivation de Rankl par des récepteurs leurres était une stratégie efficace pour prévenir les liaisons ostéolytiques et ainsi ralentir la prolifération de la tumeur. Une nouvelle stratégie thérapeutique consisterait donc à bloquer directement l'expression de RANKL de façon transitoire par injection de siRNAs dans le microenvironnement tumoral.

L'ostéogenèse imparfaite est une maladie génétique à caractère dominant due à une mutation sur les gènes COL1A1/COL1A2 codant les chaînes α 1 et α 2 du collagène de type I. La triple hélice de collagène comportant une chaîne anormale présente alors un défaut quantitatif et qualitatif engendrant une fragilité osseuse. Les traitements actuels sont des traitements palliatifs, aucun d'eux ne visant les causes de la maladie elles-mêmes. C'est pourquoi des stratégies de thérapie cellulaire et génique sont envisagées. Plusieurs essais cliniques ont notamment été réalisés tels que des allogreffes de cellules souches mésenchymateuses (cellules progénitrices des

cellules de la matrice extracellulaire de l'os). Malgré la faible prise de greffe et les effets bénéfiques transitoires, ces allogreffes de cellules souches mésenchymateuses permettent une nette amélioration du tableau clinique. Afin que cette maladie ne soit plus considérée comme incurable, une nouvelle stratégie thérapeutique consisterait donc à inhiber stablement et spécifiquement l'expression de la chaîne mutée tout en préservant l'expression de la chaîne normale directement dans les cellules du patient pour diminuer les risques de rejet de greffe. Pour se faire, il suffirait d'intégrer dans le génome de ces cellules souches mésenchymateuses une cassette génomique « codant » des shRNAs spécifiques de la chaîne mutée.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

La fonction du génome de tout être vivant est de permettre la synthèse de protéines essentielles au bon fonctionnement de l'organisme. Cependant le génome peut présenter des altérations innées et/ou acquises qui lorsqu'elles ne sont pas corrigées sont à l'origine d'anomalies génétiques pouvant entraîner une pathologie.

Dans le cas où cette anomalie génétique est héréditaire, on parle de maladies à caractère génétique. Elles sont dues à une ou plusieurs anomalies sur un ou plusieurs gènes. Ces remaniements génétiques peuvent être de différentes natures, on observe ainsi des délétions, des duplications et des insertions mutationnelles mettant en jeu un seul nucléotide ou un fragment d'ADN de plusieurs nucléotides décalant ainsi le cadre de lecture. Quelque soit la cause de l'anomalie génétique, les maladies se traduisent par la perte d'expression d'une protéine ou l'expression d'une molécule non fonctionnelle et/ou présentant une fonction différente de l'originale. On différencie également les maladies génétiques à caractère dominant ou récessif. Mis à part les chromosomes sexuels chez les garçons, chaque gène est présent en double exemplaire. Dans le cas des maladies à caractère dominant, une seule copie du gène muté suffit à ce que la maladie se déclare ; autrement dit, les cellules du patient expriment à la fois la protéine mutée et la protéine sauvage. Dans le cas des maladies génétiques à caractère récessif, les deux copies du gène sont mutées chez le patient ; un sujet hétérozygote pour le gène en question sera dit porteur sain car exprimant une protéine fonctionnelle mais la copie mutée pourra être transmise à la descendance.

La thérapie génique recouvre toute approche visant à prévenir ou à traiter une maladie par transfert de matériel génétique. Le principe consiste en l'expression d'un gène ou d'une séquence nucléotidique thérapeutique directement par les cellules à traiter ou par un organe sécréteur à distance du site pathologique, sous réserve que le matériel introduit permette l'expression d'une molécule « médicament » sécrétée dans la circulation sanguine. Le matériel génétique peut être introduit dans les cellules *ex vivo* impliquant dès lors une greffe de cellules autologues génétiquement modifiées. L'approche de thérapie génique *in vivo* est quant à elle fondée sur l'apport du matériel génétique par voie systémique (le plus souvent par voie sanguine) ou directement au sein du tissu à traiter. Quelque soit l'approche choisie, ces stratégies permettent au patient de produire lui-même son facteur thérapeutique. Les stratégies développées visent à introduire une copie fonctionnelle du gène déficient à l'aide d'une cassette génomique de type ADN, à inhiber le fonctionnement du gène muté et/ou inactiver son produit protéique

anormal, à restaurer un cadre de lecture normal ou supprimer un exon possédant une mutation.

Initialement développé pour les maladies génétiques, le transfert de gène est désormais envisagé pour de nombreuses autres applications telles que des maladies acquises. Il est notamment très utilisé en oncologie où de nombreuses études ont été rapportées dans des modèles animaux. Le développement tumoral se caractérise par la perte de contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire, se traduisant par la formation d'une tumeur bénigne ou maligne. Cette perte de contrôle peut être due à des mutations entraînant une surexpression d'oncogènes ou une diminution de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur. Le microenvironnement tumoral constitué par le tissu dans lequel se développe initialement la tumeur peut également contribuer à la croissance de celle-ci via des cytokines, facteurs de croissance ou encore la néo-angiogenèse tumorale. Enfin la dissémination métastatique de la tumeur primaire en un ou plusieurs autres sites au sein de l'organisme ne fait qu'aggraver le tableau clinique du patient. C'est pourquoi les stratégies de thérapie génique développées en cancérologie sont basées sur l'expression par transfert de gène de protéines à visée thérapeutique inhibant les différents éléments permettant au cancer de se développer.

Aujourd'hui, le terme de thérapie génique ne désigne plus uniquement le remplacement d'un gène défectueux par une copie fonctionnelle mais bien l'utilisation d'acides nucléiques (ADN et ARN) pour prévenir ou traiter des pathologies. Une nouvelle approche largement développée depuis les dix dernières années repose non plus sur la surexpression d'une molécule « médicament » mais sur l'inhibition de l'expression de gènes impliqués dans le développement des pathologies et ce grâce à un mécanisme d'inhibition post-transcriptionnelle : l'ARN interférence.

1. L'ARN interférence : principes et applications

L'ARN interférence (ARNi) est un mécanisme physiologique d'inhibition post-transcriptionnelle de l'expression des gènes basé sur une complémentarité de séquence entre de petits ARNs double brin et l'ARN messager (ARNm) cible. L'ARNi est une approche attractive pour inhiber l'expression d'une protéine de manière spécifique offrant ainsi des perspectives thérapeutiques innovantes par ciblage de l'expression de gènes impliqués dans le développement de pathologies.

1.1. Historique et découverte

En 1990, Richard Jorgensen introduisit une copie supplémentaire du gène impliqué dans la pigmentation pourpre des pétunias. Contre toute attente, certaines de ces plantes transgéniques donnaient des fleurs blanches ¹. Ainsi l'introduction d'une copie supplémentaire d'un gène n'avait pas augmenté la quantité de protéines produites mais complètement inhibé son expression, même endogène. Les analyses moléculaires démontrèrent que ce phénomène était lié à une dégradation spécifique de l'ARN messager codant la protéine de pigmentation des pétunias, l'hypothèse avancée était basée sur l'interaction possible du gène introduit avec le gène endogène.

Il fallut attendre quelques années et des études d'extinction de l'expression de gènes par injection d'ARNs antisens dirigés contre l'ARNm de *par-1* chez le ver *Caenorhabditis elegans* avant de mettre en évidence le mécanisme d'inhibition post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. En effet, les travaux de Fire et Mello ont montré que l'introduction d'ARNs double brin (ARNdb) dans des cellules du nématode pouvait induire de manière spécifique l'inhibition de l'expression d'un gène cible et ce en se liant par complémentarité de séquence à son ARNm ². Cette découverte fut récompensée par le prix Nobel de médecine en 2006. Ces résultats furent confirmés ensuite chez la mouche (*drosophile*). Ce mécanisme fût appelé ARN interférence (ARNi) ou inhibition post-transcriptionnelle de l'expression des gènes.

Cependant, jusqu'en 2001, toutes les tentatives pour transposer cet outil dans

les cellules de mammifères s'avèrent infructueuses. En effet, l'introduction d'ARNdb conduisait à une réponse de type interféron (réponse naturellement induite par des mécanismes de protection cellulaire associés à la reconnaissance d'ARN viraux) bloquant ainsi toute synthèse protéique et provoquant un arrêt général de la machinerie de traduction, autrement dit de l'ensemble des ARNm et pas uniquement de l'ARNm ciblé. Les travaux de Elbashir et *al* publiés dans Nature en 2001 montrent l'inhibition spécifique de l'expression d'une protéine par introduction d'ARNdb sans réponse interféron, mais ces ARNs sont beaucoup plus petits : 19 à 21 nucléotides ce qui correspond à la taille des molécules effectrices de l'ARNi découvertes chez le nématode et la drosophile. Ces petits ARNs double brins ont été appelés siRNA pour « small interfering RNA »³.

1.2. Rôles et mécanismes physiologiques de l'ARNi

L'ARNi est à la base un mécanisme naturel de défense, conservé chez la plupart des eucaryotes pour lutter contre l'invasion par des agents étrangers capables d'entrer dans la cellule tels que les virus. Ce processus est en effet déclenché par la présence d'ARNdb exogènes dans la cellule provenant soit de transposons⁴ soit de virus à ARN tels que les rétrovirus⁵. Ce mécanisme intervient également dans la régulation de l'expression des gènes notamment lors du développement et ce grâce à une classe d'ARN régulateurs non-codants endogènes nouvellement découverts : les microARNs (miRNAs⁶). Ainsi on distingue deux voies d'activation de la répression post-transcriptionnelle de l'expression des gènes par l'ARNi : la voie exogène générant les siRNAs et la voie endogène assurée par les miRNAs.

1.2.1. Rôles physiologiques de l'ARNi

Le mécanisme physiologique de l'ARNi est activé par la présence d'ARNdb dans le noyau et/ou le cytoplasme cellulaire conduisant à la production de petits ARNs non codants : les siRNAs ou les miRNAs capables d'inhiber la traduction d'ARNm cibles. Ces ARNdb peuvent être générés de plusieurs manières et correspondent aux différentes fonctions de l'ARNi :

- Défense face aux infections virales : dans le cas d'une infection virale, l'entrée dans la cellule des ARNs viraux conduisant à la présence d'ARNdb peut activer le mécanisme de l'ARNi. En effet, à partir de l'ARNdb des séquences de type siRNA sont alors produites et deviennent des outils de répression de l'expression des ARNs viraux ⁷. Ahlquist a notamment montré en 2002 que des plantes déficientes pour l'ARNi étaient effectivement plus sensibles aux infections virales que les plantes sauvages ⁸.
- Répression de la transposition de l'ADN : les ARNm aberrants issus de l'expression d'un transposon activent l'ARNi lorsqu'ils sont rendus double brin par la synthèse du brin complémentaire via des ARN polymérases. Ainsi, une déficience dans le mécanisme de répression post-transcriptionnelle chez le vers *Caenorhabditis elegans* se traduit par une augmentation du taux de transposition de l'ADN ⁹.
- Inhibition de l'expression des ARNs aberrants : les anomalies de transcription d'un transgène donné peuvent conduire à la synthèse d'ARNs simple brin non fonctionnels de type insertion inversée-répétée, autrement dit permettant l'appariement de séquences complémentaires au sein du même transcrit. Cet appariement peut être reconnu par la machinerie de l'ARNi conduisant à la répression de l'expression du transgène ¹⁰.
- Régulation de l'expression de gènes endogènes : la voie endogène de l'ARNi assurée par les miRNAs est majoritairement associée au contrôle des événements indispensables au bon développement de l'organisme. Les miRNAs sont également exprimés pendant la différenciation de la cellule et autres événements cellulaires telle que la signalisation hormonale ¹¹. L'activation du mécanisme assuré par les miRNAs peut donc être considérée comme une boucle de rétrocontrôle de l'expression de gènes.

A court terme, l'ARNi est un mécanisme d'adaptation rapide et efficace pour inhiber l'expression de transcrits cibles. Dans le cas où cette répression doit être maintenue à plus long terme, une deuxième stratégie cellulaire est mise en place et ce grâce à la méthylation de l'ADN. En effet, des études ont montré que le mécanisme de l'ARNi pouvait également réguler l'expression des gènes en affectant non plus l'ARNm mais en agissant directement sur le génome par un mécanisme d'extinction transcriptionnel : le *Transcriptional Gene Silencing* (TGS) ¹³. Récemment démontré chez l'Homme ¹⁴, ce mécanisme relie l'entrée d'ARNdb dans la cellule à sa méthylation. En effet, les protéines mises en jeu dans le mécanisme de l'ARNi

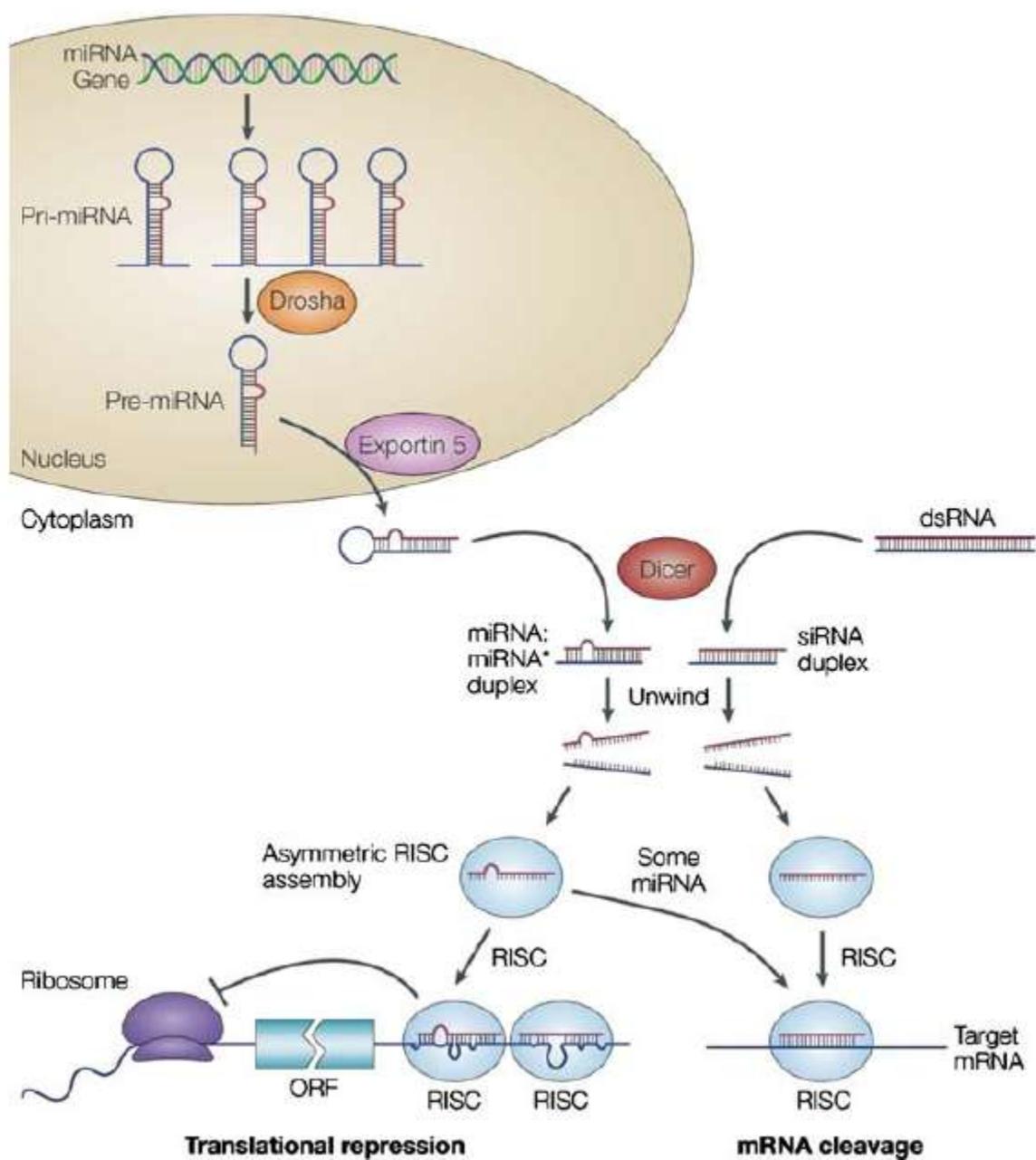


Figure 1 : Mécanismes de l'ARN interférence : la voie endogène des miRNA (à gauche) et la réponse à l'entrée d'ARNdb exogènes (à droite). Les miRNAs sont de longs ARN simple brin synthétisés par l'ARN polymérase II sous forme de pri-miRNAs en structure tige boucle reconnus par les enzymes DROSHA puis DICER pour générer des petits ARN double brin les miRNAs. Les siRNAs sont quant à eux générés à partir de longs ARNdb exogènes. Les molécules effectrices se fixent via le complexe RISC sur l'ARNm complémentaire, cette complémentarité pouvant être parfaite (dans le cas des siRNAs) ou partielle (les miRNAs pouvant présenter les deux). Une complémentarité parfaite conduit le plus souvent à une destruction du messager cible alors qu'une complémentarité partielle se traduit par un blocage de la traduction. D'après Deiters ¹².

joueraient également un rôle dans le réarrangement du génome ¹⁵, la répression de l'expression des gènes ¹⁶ et la ségrégation des chromosomes ¹⁷.

1.2.2. Les siRNAs : molécules effectrices de la voie exogène de l'ARNi

Au niveau post-transcriptionnel, la reconnaissance de molécules d'ARNdb exogènes conduit à l'activation d'une ribonucléase III, de la même famille que la RNase III, nommée DICER ¹⁸ localisée dans le cytoplasme (Figure 1). Cette enzyme possède un domaine PAZ (Piwi Argonaute Zwill), un domaine hélicase dans sa région N-terminale avec un motif de liaison à l'ATP nécessaire au déplacement de DICER le long de l'ARN, deux domaines RNase III (IIIa et IIIb en tandem) qui clivent l'ARN tous les 22 nucléotides et enfin un motif de liaison à l'ARN (dsRBD) en C-terminal. Les ARNdb sont alors clivés en fragments de 19 à 23 nucléotides avec 2 nucléotides débordants en 3' qui correspondent aux siRNAs.

Ces molécules vont alors être reconnues et incluses dans un complexe multiprotéique : le RNA-inducing silencing complex (RISC) composé de 4 sous unités : une hélicase ATPase dépendante, une exonucléase, une endonucléase et des domaines responsables de la recherche de séquences homologues ¹⁹ : son domaine PAZ lui permet de se lier à DICER mais également de s'accrocher plus particulièrement sur des ARNm. Ce complexe cytoplasmique va permettre de dérouler le siRNA et d'en séparer les deux brins d'ARN. Le brin dont la stabilité est la plus faible en 5' sera alors incorporé dans le complexe RISC ²⁰ au détriment du second brin d'ARN. Cette molécule d'ARN simple brin sert de guide au complexe RISC pour la fixation sur l'ARNm possédant une séquence complémentaire. Il en résulte un arrêt de la traduction voire une dégradation du messenger par clivage endonucléique catalysé par le complexe RISC qui s'effectue en un seul point entre le brin de siRNA et l'ARNm, 10 nucléotides en aval de l'extrémité 5' du siRNA ²⁰. Le messenger ainsi coupé est ensuite entièrement dégradé par l'action des endo et exonucléases cytoplasmiques. Cependant le brin de siRNA est quant à lui protégé de cette dégradation par le complexe RISC permettant ainsi le ciblage et l'inhibition de plusieurs molécules d'ARNm complémentaire.

1.2.3. Les microARNs (miRNAs) : ARNs endogènes non codants répresseurs de l'expression post-transcriptionnelle

Les miRNAs et les siRNAs sont des molécules d'ARNi double brin non codants de 21 à 23 paires de bases qui régulent négativement l'expression des gènes. Les siRNAs sont considérées principalement comme des molécules exogènes issues de la dégradation des ARNdb alors que les miRNAs représentent une classe de régulateurs endogènes de l'expression des gènes récemment découverts (Figure 1, p10). Les miRNAs représentent la famille de gènes générant des ARNs non codants la plus vaste dans le génome animal, avec plus de 600 membres identifiés chez l'Homme.

Les miRNAs sont initialement transcrits par une ARN polymérase de type II sous forme de pri-miRNAs simple brin d'une centaine à un millier de nucléotides et possédant une coiffe 7-méthylguanosine en 5' et une queue poly-adenylée en 3'. Le repliement de la molécule crée des zones d'ARNdb dues à des complémentarités de séquence. Dans le noyau cellulaire, ces pri-miRNAs sont pris en charge par un complexe enzymatique composé de DROSHA (RNase de type III) et de DGCR8 chez les vertébrés (Pasha chez les invertébrés, protéine possédant un domaine de liaison aux séquences de type ARNdb) qui les convertit en des molécules plus courtes possédant une structure tige-boucle de 70 à 80 nucléotides appelés les pré-miRNAs. Ils possèdent une extrémité 5' phosphatée et 2 nucléotides débordant en 3' avec un groupement hydroxyle et sont capables de traverser l'enveloppe nucléaire via l'Exportine 5²¹. De par leur structure tige-boucle, la partie double brin de ces pré-miRNAs est reconnue par DICER qui après clivage génère des miRNAs matures ayant les mêmes propriétés structurales que les siRNAs décrits précédemment¹².

Comme pour les siRNAs, les miRNAs peuvent être incorporés dans un complexe RISC pour cibler des séquences d'ARNm complémentaires se situant principalement dans les régions 3' et 5' UTR (régions non traduites) de ces derniers. En général, l'appariement incomplet entre le miRNA et son ARNm cible dû à un non appariement de certaines bases par manque de complémentarité peut conduire à un arrêt de la traduction plutôt qu'à une dégradation du messager comme c'est le cas pour les siRNAs. Plusieurs mécanismes ont été suggérés afin d'expliquer cet arrêt de la traduction : un blocage de la phase d'initiation ou d'élongation de la traduction ou encore un transport du messager via des « P-bodies » assuré par le miRNA induisant une répression de la traduction¹².

miRNA	Selected targets	Presumed target function
miR-21↑	TPM1, PDCD4	Tumor suppressors
miR-221↑	p27 ^{kip1}	Tumor suppressor, cell cycle inhibitor
miR-378↑	Sufu, Fus-1	Tumor suppressors
miR-138↓	hTERT	Oncogenic activity
miR-221/222↑	p27 ^{kip1}	Tumor suppressor, cell cycle inhibitor
miR-10b↑	HOXD10	Inhibition of breast cancer metastasis
miR-21↑	TPM1, PDCD4	Tumor suppressors
miR-27a↑	ZBTB10, Myt1	Tumor suppressors
miR-125a/b↓	HER2, HER3	Oncogenes, EGF receptor family members
miR-206↓	ER α	Promoter of cell proliferation
let-7/miR-98↓	HMGA2, RAS, c-Myc	Oncogene, related to metastasis, promoter of carcinogenesis
miR-29↓	DNMT3A/B	Oncogenic activity, DNA methyltransferase
miR-34↑	Bcl2	Anti-apoptotic factor, promoter of proliferation
miR-221/222↑	p27 ^{kip1}	Cell cycle inhibitor, cell growth inhibitor
miR-21↑	PTEN	Tumor suppressor, negative regulation of PI3k
miR-122↓	Cyclin G, Bcl-w	Anti-apoptotic factor
miR-21↑	PTEN	Tumor suppressor, negative regulation of PI3k
miR-29↓	Mcl-1	Oncogene, anti-apoptotic factor
miR-155↑	TP53INP1	Induction of growth arrest, apoptosis
miR-143↓	ERK5	Promoter of cell growth and proliferation
miR-145↓	IRS1	Oncogene, strong mitogenic activity
miR-20a↓	E2F1, E2F3, E2F3	Pro-apoptotic factors, regulation of cell cycle
miR-125b↓	Bak1	Pro-apoptotic factors, induction of apoptosis
miR-126↓	SLC45A3	Oncogene
miR-221/222↑	p27 ^{Kip1}	Tumor suppressor, cell cycle inhibitor
miR-127↓	BCL6	Proto-oncogene, suppression of p53
miR-372/373↑	LATS2	Tumor suppressor
let-7/miR-98↓	HMGA2, RAS, c-Myc	Oncogene, related to metastasis, promoter of carcinogenesis
miR-210↓	E2F3	Pro-apoptotic factor, regulation of cell cycle
miR-214↑	PTEN	Tumor suppressor, negative regulation of PI3k
miR-218↓	LAMB3	Promoter of cell migration and tumorigenicity
miR-143↓	ERK5	Promoter of cell proliferation and cell growth
miR-15/16↓	Bcl2	Anti-apoptotic factor, promoter of cell growth
miR-29/181↓	Tcl1	Oncogene, co-activator of the Akt oncoprotein
miR-221/222↑	Kit	Proto-oncogene, tyrosine-protein kinase

Tableau 1 : Exemples de transcrits ciblés par les miRNAs endogènes ¹². Ce tableau, issu de la revue de Deiters, montre certains miRNAs impliqués dans des processus pathologiques de par leur augmentation (↑) ou diminution (↓) de synthèse.

Les miRNAs possèdent un large spectre de cible (Tableau 1 ci-contre) défini par 7 nucléotides complémentaires avec un ARNm en position 2 à 8 du miRNA ²². La transcription de ce type de molécule étant assurée par une ARN polymérase de type II, leur expression est soumise à une régulation par des facteurs de transcription (activateurs ou répresseurs) ²³.

1.3. Applications de l'ARNi en recherche

Par le simple fait de pouvoir inhiber de manière spécifique l'expression de gène cible, l'ARNi est apparue depuis les dix dernières années comme une méthode attractive offrant de nouvelles perspectives pour l'étude de l'implication des gènes dans les processus physiologiques et pour le développement de nouvelles stratégies de thérapie.

1.3.1. Les molécules de l'ARNi utilisées en recherche

Du mécanisme de l'ARNi en général, 4 types de molécules distinctes intervenant dans ce processus physiologique ont été étudiées et copiées afin de générer des molécules synthétiques efficaces pour inhiber de manière spécifique et artificielle l'expression de transcrits par complémentarité de séquences : les ARNdb, les siRNAs, les shRNAs, les miRNAs.

Les ARNdb sont de longs ARNs composés de deux brins présentant une complémentarité de séquence sur toute leur longueur (Figure 2A au dos de cette page). Après transfection au sein de la cellule ils sont pris en charge par DICER de manière à générer un ou plusieurs siRNAs. En effet, de par leur longueur on peut imaginer faire produire par la cellule plusieurs molécules effectrices permettant d'inhiber plusieurs transcrits cibles. Cependant, dans les cellules de mammifères l'entrée de ces longues molécules a pour conséquence d'une part un arrêt total et non spécifique de la traduction conduisant à la mort cellulaire et d'autre part une activation du système immunitaire. Ainsi, l'entrée d'ARNdb active la protéine kinase R ²⁵ qui phosphoryle eIF2a qui en se liant à eIF2β entraîne sa séquestration. Ceci a

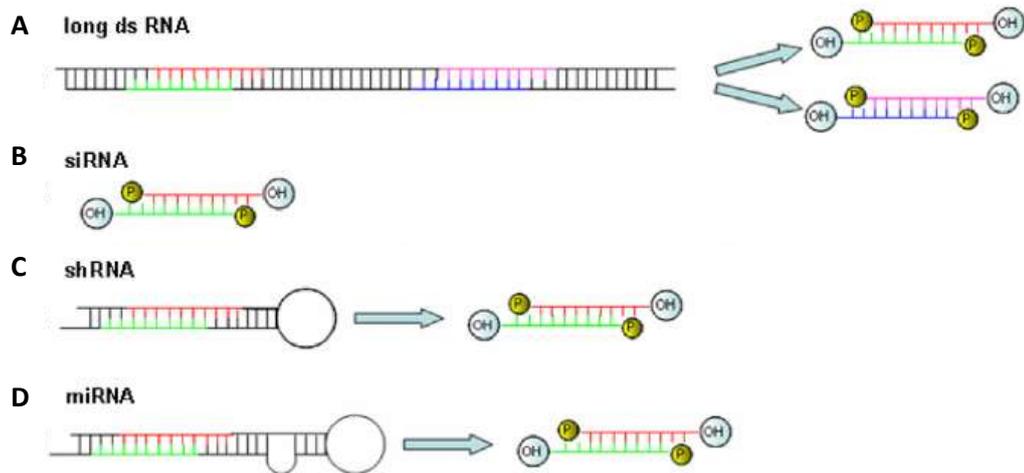


Figure 2 : Les différentes molécules utilisées pour induire de manière artificielle la répression de l'expression des gènes par ARN interférence. Les siRNAs synthétiques sont les effecteurs terminaux de l'ARNi, ils sont directement incorporés dans les complexes RISC après entrée dans la cellule cible. **(A)** les ARNdb sont de longs ARNs pris en charge dans le cytoplasme cellulaire par l'enzyme DICER afin de générer des siRNAs **(B)**. **(C)** Les shRNAs sont des duplexes tige-boucle de complémentarité parfaite, ils sont synthétisés dans le noyau par l'ARN polymérase III, puis exportés vers le cytoplasme pour donner via DICER des siRNAs présentant une parfaite complémentarité de séquence avec le transcrit cible. **(D)** Les duplexes imparfaits dérivés des pré-miRNAs naturels sont synthétisés par l'ARN polymérase de type II et pris en charge par la machinerie enzymatique de la cellule (DROSHA et DICER) pour donner des complexes RISC comportant le brin antisens du miRNA. D'après Masiero et al ²⁴.

pour conséquence une inhibition de l'étape d'initiation de la traduction par les ribosomes empêchant ainsi toute synthèse protéique. S'ajoute à cette inhibition une dégradation des ARNm par des dimères de RNase L, cette dimérisation étant induite via l'activation de la 2'-5' Oligoadénylate synthétase. De plus, l'entrée de ces molécules peut conduire à une réponse immunitaire de type interféron (IFN) via MDA-5 (melanoma differentiation associated gene 5) dans les cellules non immunes²⁶ et via la voie des Toll Like Receptor (TLR) 3, 7 et 8 dans les cellules du système immunitaire²⁷. Autrement dit ces molécules s'avèrent efficaces pour cibler des transcrits chez le ver *Caenorabditis elegans* ou encore la drosophile mais entraînent des réponses non spécifiques dans les cellules de mammifères.

La structure des siRNAs synthétiques est calquée sur celle des siRNAs naturels intervenant dans la voie exogène de l'ARNi. Leur taille n'excède pas 22 paires de base de manière à éviter la réponse cellulaire face à l'entrée de ce matériel génétique (réponse observée avec les ARNdb). Les deux brins « sens » et « antisens » sont appariés sur 19 paires de bases laissant déborder en 3' deux uraciles²⁸ (Figure 2B). Ils sont faciles à produire chimiquement par simple assemblage de nucléotides. Après entrée dans la cellule à transfecter, les siRNAs vont être pris en charge par la machinerie cellulaire de l'ARNi. Ils sont dessinés de telle sorte que le brin antisens (dont la séquence est complémentaire à l'ARNm ciblé) soit celui qui soit pris en charge par les complexes RISC²⁹. Cependant leurs effets ne sont que transitoires après transfection, notamment pour des cellules en mitose. En effet, ces molécules ne sont pas intégratives au sein du génome cellulaire, elles sont donc diluées au fur et à mesure des divisions voire perdues lors de la mort cellulaire. Dans des lignées à forte prolifération comme les cellules cancéreuses, on observe un pic d'inhibition de l'ARNm cible entre 24 et 72h, la durée d'extinction de la protéine qui en découle dépend de sa durée de vie et de sa vitesse de renouvellement. En effet, si la cible correspond à une protéine avec une longue demi-vie, les effets du siRNA n'en seront que plus tardifs car seules les nouvelles synthèses protéiques seront inhibées alors que les protéines déjà produites seront conservées. *In vivo*, les effets d'inhibition post-transcriptionnelle après injection de siRNAs sont visibles entre quelques jours et une semaine mais ne dépassent jamais plus de 2 semaines. C'est pourquoi pour maintenir la répression du transcrit les injections doivent être répétées à intervalle de temps régulier³⁰.

Les shRNAs pour « short hairpin RNA » possèdent une structure mimant celle des pré-miRNAs naturels. En effet, ils possèdent une structure tige boucle mais à la différence des pré-miRNAs, la partie double brin est parfaitement complémentaire et plus courte. La boucle est inspirée des séquences naturelles formant celles des pré-miRNAs et peut être clivée par DICER générant ainsi une molécule double brin de type siRNA. Leur séquence ADN est donc dessinée de telle sorte à générer les siRNAs synthétiques décrits précédemment (Figure 2C). Le plus souvent ces molécules sont injectées sous forme vectorisées dans des plasmides ou des vecteurs viraux possédant une cassette ADN qui après transcription donnera les shRNAs correspondants (Figure 3).

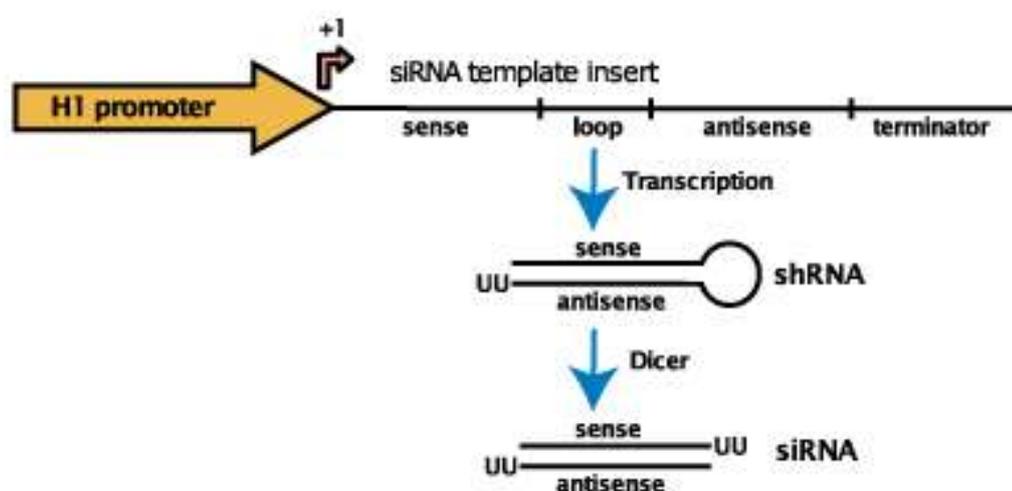


Figure 3 : Séquences d'ADN pour le clonage de séquences de type shRNA sous le contrôle du promoteur H1. D'après SBI system bioscience.

L'intérêt de la vectorisation virale de ces molécules est l'intégration de la cassette ADN au sein du génome cellulaire. Cette intégration permet à la cellule de produire elle-même son propre shRNA sous contrôle de promoteurs ubiquitaires tels que U6 (promoteur d'un ARN non codant de type snRNA pour « small nuclear RNA » impliqué dans la mise en place du spliceosome lors de l'épissage) ou H1 (composant de la RNase P), promoteurs compatibles avec l'ARN polymérase III donc non régulables. Cette stratégie permet de pallier les effets transitoires de l'injection de siRNAs synthétiques.

La seconde génération de vecteurs vise à produire des séquences directement inspirées des séquences naturelles codant des miRNAs. Ces miRNAs synthétiques possèdent la même structure que les shRNAs à la différence qu'ils sont synthétisés par une ARN polymérase de type II (leur expression peut ainsi être

contrôlée par des facteurs de transcription activateurs ou inhibiteurs) et qu'ils présentent une ou plusieurs bases non complémentaires entre le brin sens et l'antisens. De même, ces deux brins sont séparés par une boucle (Figure 2D). La séquence globale de ce type de miRNAs artificiels est généralement copiée sur celle du miR-30 ou du miR-155³¹, deux miRNAs naturels, dont on ne conserve que la séquence correspondant à la boucle, les séquences sens et antisens étant remplacées de manière à permettre un ciblage d'un transcrit donné différent de leurs cibles naturelles. Ce changement de séquence n'affecte pas la maturation des miRNAs synthétiques par DROSHA puis DICER ni leur efficacité au sein des complexes RISC. Après maturation, si le miRNA généré possède une complémentarité parfaite avec un ARNm, il induira sa dégradation alors qu'un simple blocage de la traduction sera mis en place avec une complémentarité partielle.

Le choix de l'une ou l'autre de ces molécules diffère selon la finalité. Elles représentent un outil indispensable, désormais utilisé en routine pour éteindre de manière spécifique l'expression de gènes.

1.3.2. Utilisation des molécules d'ARNi en génétique inversée

L'analyse du génome chez les souris et chez l'Homme a permis de découvrir un certain nombre de gènes jusqu'alors inconnus. L'étude du phénotype associé à l'inhibition de l'expression d'un gène donné permet de définir sa fonction, cette méthodologie est appelée génétique inverse car s'oppose à la démarche de génétique classique qui pour un phénotype mutant cherche à identifier le gène responsable. Des études expérimentales de génétique inverse passent par l'analyse phénotypique de cellules ou organisme entier invalidés pour l'expression d'un gène donné par recombinaison homologue (technique du « knockout »). Cependant ces méthodes sont longues, coûteuses et difficiles à mettre en œuvre. En effet, la genèse d'un tel modèle animal nécessite la modification de cellules souches embryonnaires (cellules ES), leur sélection et l'injection de ces cellules modifiées chez des embryons réimplantés *in utero*. La mère porteuse donne alors naissance à des individus dont les tissus sont en partie issus des cellules ES modifiées. Il faut alors sélectionner ceux dont la lignée germinale dérive de la différenciation de ces cellules, car eux seuls pourront transmettre la modification génétique à la descendance. Enfin, plusieurs croisements

sont nécessaires à l'obtention d'un modèle homozygote pour le gène invalidé. L'étude de cellules isolées et modifiées s'avère être plus facile à mettre en œuvre mais ces cellules sont le plus souvent issues du modèle transgénique car seules ces cellules ES ne sont pas réfractaires à la recombinaison homologue *in vitro*.

De par la possibilité des molécules d'ARNi de pouvoir inhiber de manière spécifique l'ARNm d'un gène donné et ce dans une grande variété de types cellulaires, ces molécules sont vite devenues une alternative à la technique du « knockout » permettant l'extinction d'un gène par recombinaison homologue. En effet, l'introduction de séquences de type siRNA ou shRNA s'est avérée plus simple, plus efficace et moins coûteuse à mettre en place chez la cellule isolée (quelque soit son origine) ou l'organisme vivant ³². Ces molécules sont en effet simples à produire et permettent des investigations plus rapides que le développement d'un modèle animal invalidé pour l'expression d'un gène. De plus, lorsque la mutation est létale au moment du développement embryonnaire, le modèle animal ne peut être obtenu que par contrôle de la modification génétique dans le temps. Or, la possibilité d'obtenir après injection des effets transitoires par simple transfection de siRNAs ou stables par intégration de séquences ADN transcrites sous forme de shRNAs, permet de contrôler les périodes d'inactivation du gène sans passer par une lourde sélection d'animaux transgéniques. C'est pourquoi cette technologie représente de nos jours une véritable innovation au service de la génétique inverse. Enfin, ces études sont également importantes pour mettre en évidence la relation entre un gène et une pathologie ³³ de par le phénotype anormal voire symptomatique développé chez l'animal ou après modification de cellules en culture ³⁴.

1.3.3. Outils thérapeutiques

Depuis la découverte en 2001 de ce mécanisme de l'ARNi, plusieurs équipes ont cherché à détourner ce processus naturel afin d'inhiber l'expression de protéines impliquées dans le développement de pathologies. En effet, les molécules de l'ARNi que sont les siRNAs ou les shRNAs offrent la possibilité d'inhiber de manière spécifique l'expression d'un gène donné. Plusieurs stratégies ont dès lors été mises au point afin de contrecarrer le développement pathologique de la maladie associée.

L'efficacité de ces stratégies basées sur l'ARNi repose en grande partie sur la

ORGANE / TISSU	PATHOLOGIE	ADMINISTRATION
Poumons	Virus respiratoire syncytial	Locale
	Syndrome de détresse respiratoire sévère Influenza	
	Influenza	Locale et systémique
Œil	Dégénération maculaire liée à l'âge	Locale
Système nerveux	Dépression	Locale
	Maladie d'Alzheimer	
	Chorée de Huntington	
	Ataxies spinocérébrales	
	Sclérose latérale amyotrophique	
	Douleurs neuropathiques	
Système digestif	Encéphalite virale	Locale
	Syndrome du colon irritable	
Foie	Hypercholestérolémie	Systémique
	Hépatite B	
Vagin	HIV	Locale
Articulation	Polyarthrite rhumatoïde	Locale et systémique
Tous	Cancer	Locale et systémique

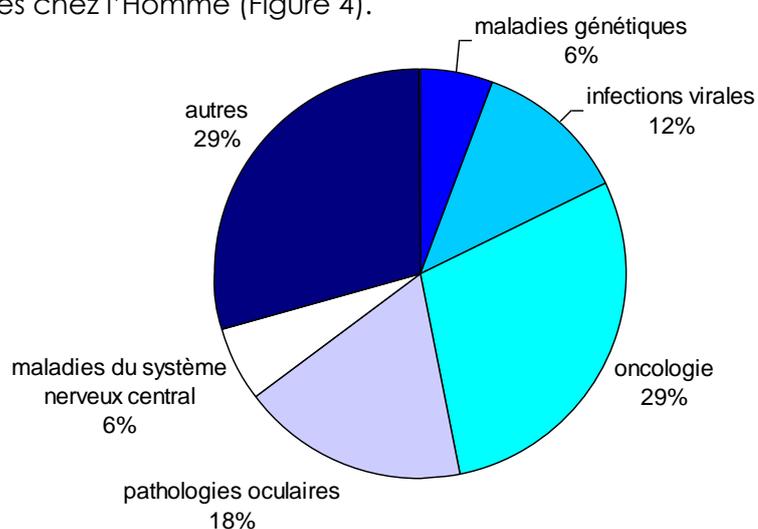
Tableau 2 : Organes et pathologies ciblées pour le développement de stratégies basées sur l'utilisation de molécules d'ARNi. Les stratégies d'injection locale se sont avérées efficaces dans des tissus tels que les poumons, les yeux, le système nerveux central, le vagin ou encore les tumeurs solides. L'injection systémique est le plus souvent réalisée par voie intraveineuse. Adapté de Bumcrot et *al.* ³⁵.

connaissance de la pathologie ciblée pour un transfert de gène adapté : choix de la séquence d'ARNm cible, choix adéquat du type de molécule d'ARNi à visée thérapeutique, entrée efficace au sein de la cellule cible, expression stable ou transitoire du transgène. Trois types de méthodes pour la transfection de cellules cibles ont été développées :

- La méthode *ex vivo* : elle est actuellement la plus utilisée et consiste en une allogreffe de cellules du patient modifiées pour une expression stable et constitutive de shRNAs ou miRNAs à visée thérapeutique.
- La méthode *in vivo* consiste à injecter dans l'organisme par voie systémique (le plus souvent directement dans la circulation sanguine) une cassette ADN pour la production de siRNAs thérapeutiques ou les siRNAs eux mêmes. Ce genre de stratégie pose le problème de la protection du matériel nucléaire afin d'éviter toute dégradation, l'adressage des molécules au niveau du site lésé et enfin le passage efficace de la membrane cellulaire d'où le développement de vecteurs adaptés pour le transfert de gène améliorant ces différents paramètres (point développé dans le chapitre 1 des résultats). Les acides nucléiques peuvent également être injectés localement, directement dans le tissu ou organe à traiter, on parlera alors de voie d'injection *in situ*.

Ainsi, l'injection de ces molécules dans des modèles animaux mimant une pathologie humaine a démontré l'efficacité de l'inhibition post-transcriptionnelle de gènes endogènes ou exogènes et ce dans des tissus et/ou organes différents (Tableau 2 ci-contre). Certaines de ces études ont notamment conduit au développement d'essais cliniques chez l'Homme (Figure 4).

Figure 4 : Répartition des essais cliniques en cours chez l'Homme. Sur les 18 essais utilisant des molécules d'ARNi, 17 testent l'efficacité de stratégies basées sur l'injection de siRNAs synthétiques et 1 vise à démontrer les effets thérapeutiques d'une molécule de type shRNA. D'après <http://clinicaltrials.gov>.



La première des applications thérapeutiques dérive d'une fonction naturelle de l'ARNi vis-à-vis de la protection de la cellule face à l'entrée d'acides nucléiques viraux. En effet, l'administration de siRNAs ou de plasmides contenant des cassettes de type shRNA ont montré leur efficacité pour inhiber l'expression de génomes viraux tel que celui du virus respiratoire syncytial au niveau pulmonaire, ou encore le virus parainfluenza dont le nombre de particules virales est réduit de 99% après injection intra-nasale de siRNAs ³⁶. Une étude clinique de phase II est actuellement en cours chez des patients atteints par ce virus. Ces études démontrent la faisabilité d'un traitement pour des infections virales localisées. En ce qui concerne des infections systémiques telles que celles induites par le HIV (Human immunodeficiency virus) ou les hépatites B et C, les molécules d'ARNi doivent être administrées par voie systémique ce qui complique la mise au point des protocoles mais plusieurs stratégies se sont avérées être efficaces. Une seconde étude de phase I a notamment été mise en place pour des patients atteints du HIV ³⁷.

Une deuxième application vise à inhiber le développement de pathologies oculaires telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge, maladie de la rétine provoquée par la dégénérescence progressive de la macula provoquant un affaiblissement important des capacités visuelles, sans toutefois les anéantir. Ce phénomène est dû à l'accumulation d'un dépôt rétinien avec un processus inflammatoire stimulant la sécrétion du « Vascular Endothelial growth factor » (VEGF). Ceci a pour conséquence des micro-hémorragies et des exsudations de liquide pouvant conduire à une fibrose. Ainsi, l'injection de siRNAs visant le transcrite codant le VEGF, directement dans la cavité oculaire, a montré des résultats satisfaisants ³⁸ qui sont actuellement évalués dans un essai clinique chez l'Homme (premier essai clinique mis en place avec l'utilisation de siRNAs comme outils thérapeutiques).

A ces deux applications visant à injecter localement des molécules effectrices de l'ARNi, s'y ajoute une troisième ciblant le système nerveux central par injection via le parenchyme, la cavité centroventriculaire ou par des infusions intrathécales. En effet, l'injection de siRNAs s'est avérée efficace dans des modèles animaux pour inhiber l'expression d'ARNm neuraux ³⁹ offrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques. La transfection de cellule neurales par des molécules ciblant spécifiquement l'expression de l'huntingtine mutée (toxique pour les neurones et impliquée dans le développement de la chorée de Huntington) tout en préservant l'expression de l'allèle sauvage s'avère être une stratégie plus intéressante que les traitements palliatifs actuels ⁴⁰. Les molécules d'ARNi ont également été testées dans des stratégies de thérapie visant à inhiber le

développement de la maladie d'Alzheimer, l'ataxie spinocérébelleuse, la sclérose latérale amyotrophique, l'encéphalite à virus du Nil occidental, les douleurs neuropathiques ou encore la dépression ³⁵.

L'accumulation de complexes immuns au niveau des membranes basales des glomérules est la principale cause de maladies chroniques des reins. Ce phénomène s'accompagne de la surexpression de protéines inflammatoires telles que le TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) qui interagit entre autre avec le TNF-receptor-associated-factor (TRAF)-2. La répression de l'expression de TRAF-2 par transfection de siRNAs dans des cultures de cellules mésangiales *in vitro* atténue les effets prolifératifs et proinflammatoires de l'accumulation de complexes immuns sur ces cellules rénales de rat ⁴¹. De même, l'administration de siRNAs *in vivo* par voie rectale ciblant l'expression du TNF α protège de l'inflammation des parois coliques induite de manière expérimentale chez l'animal ⁴².

Une des stratégies très étudiée à l'heure actuelle vise à inhiber le développement de tumeurs solides par inhibition de gènes impliqués dans la prolifération, la dissémination métastatique ou l'angiogenèse tumorale ¹⁹. Hormis les poumons, l'œil, le système digestif, le système nerveux central, ou encore les tumeurs solides, d'autres parties anatomiques ont fait l'objet de stratégies basées sur l'utilisation des molécules d'ARNi tel que le foie (hypercholestérolémie ou l'hépatite ³⁵) ou le tissu osseux (polyarthrite rhumatoïde ⁴³).

2. Le tissu osseux

Le tissu osseux revêt une importance capitale pour l'organisme tant sur le plan biomécanique que sur le plan métabolique. Ce tissu hautement spécialisé est caractérisé par sa dureté et son apparente rigidité mais il n'est pas pour autant figé. Au contraire, c'est une structure dynamique en perpétuel remaniement. En effet, la matrice osseuse est continuellement produite par les ostéoblastes, modifiée par les ostéocytes et détruite par les ostéoclastes. Le tissu osseux est capable de s'autoréparer, d'adapter sa masse, sa forme, et ses propriétés intrinsèques à des modifications d'ordre biomécanique, de supporter une activité physique tout au long de la vie sans pour autant se fracturer ou être source de douleur.

Sa croissance est sous le contrôle d'éléments environnementaux tels que les variations de contraintes qui lui sont appliquées, le statut hormonal et cytokinique avec en premier les hormones stéroïdiennes sexuelles et le statut énergétique incluant les effets complexes des médiateurs du contrôle de l'appétit. Le squelette a un rôle :

- de protection des organes vitaux tels que les hémisphères cérébraux et le cervelet protégés par les os du crân), la moelle épinière renfermée par le rachis et le système cœur - poumons préservé par la cage thoracique.
- métabolique par le maintien de l'homéostasie phosphocalcique sous le contrôle des hormones calcitropiques, parathormone, vitamine D et calcitonine, car il est un réservoir métabolique de sels minéraux. Il renferme notamment 99% du calcium et 90% du phosphore de l'organisme qui jouent un rôle biologique prépondérant dans la vie cellulaire, la transmission nerveuse et la coagulation sanguine.
- hématopoïétique : la moelle osseuse contient les cellules souches hématopoïétiques qui après différenciation donnent naissance aux cellules de la lignée rouge (globules rouges) et la lignée blanche (globules blancs).
- biomécanique. Malgré sa rigidité et sa résistance, l'os possède une certaine élasticité de par la présence des fibres de collagène de type I lui permettant de supporter les effets de la pesanteur, de résister aux contraintes mécaniques externes mais également aux forces de

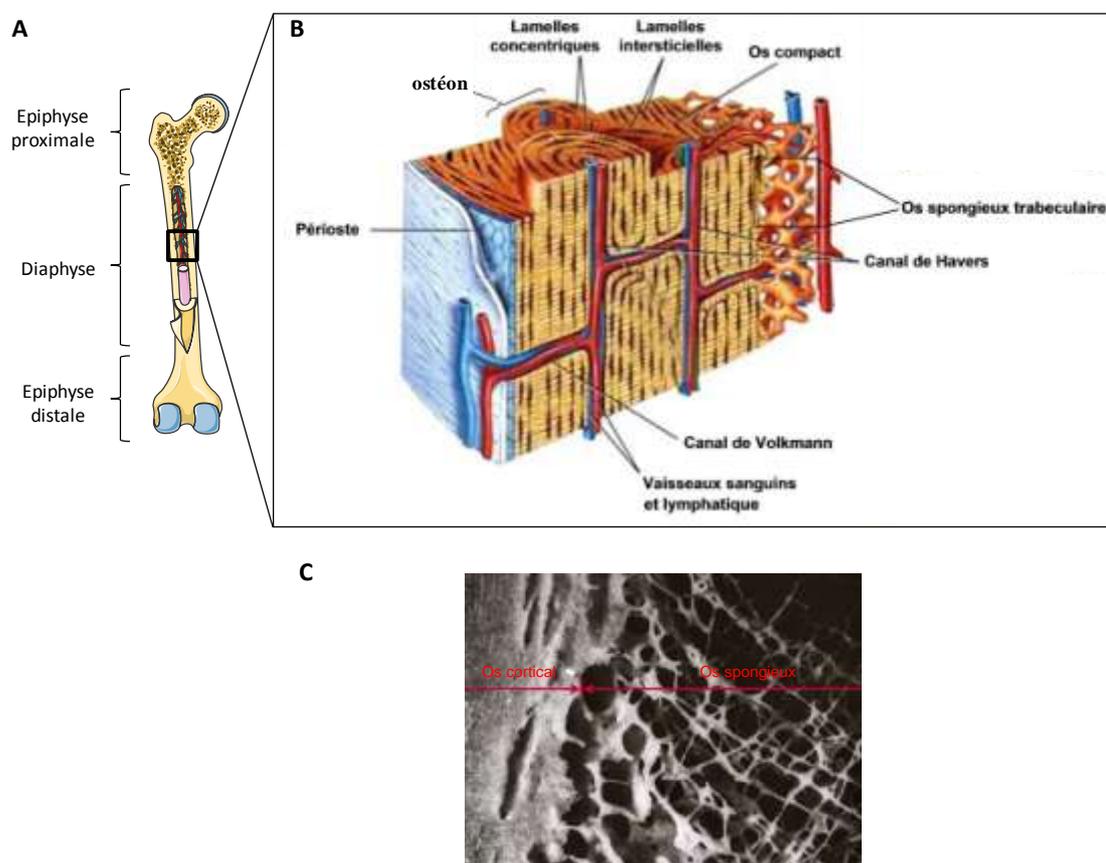


Figure 5 : Représentation schématique de la structure d'un os. Exemple de la composition d'un fémur au niveau anatomique (**A**) et macroscopique (**B**). Le tissu osseux comprend l'os trabéculaire et l'os cortical, qui est le résultat de la juxtaposition d'ostéons cylindriques centrés sur un canal qui contient des vaisseaux. Il est nourri par le périoste richement vascularisé. Adapté d'après les représentations d'Elaine Marieb ⁴⁴. (**C**) Aspect en microscopie électronique à balayage de la jonction entre os spongieux et os cortical (grossissement $\times 4$) d'après <http://www.unifr.ch/anatomy>.

contraction musculaire. En effet, le squelette permet la locomotion, transmet les forces issues de la contraction musculaire d'une partie du corps à une autre pendant le mouvement maintenant ainsi l'équilibre.

2.1. Organisation structurale du tissu osseux

Les 206 os du squelette humain sont classés selon 3 sous-types :

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

Les os longs sont classiquement utilisés pour décrire la structure anatomique des os. Ils sont constitués d'une partie centrale cylindrique, la diaphyse, qui présente à ses extrémités une structure plus large et arrondie : l'épiphyse couverte de cartilage articulaire (Figure 5A). Ces épiphyses sont reliées à la diaphyse par des régions coniques appelées métaphyses. La forme très allongée de ce type d'os leur confère une grande capacité de résistance aux forces de tension, de traction et de cisaillement.

Le rôle de soutien du squelette est étroitement lié à la nature du tissu osseux, à sa structure intime, à l'association des différents éléments qui le composent et à l'agencement des deux modèles architecturaux qui le constituent : l'os cortical (ou compact) et l'os trabéculaire (ou spongieux). Cette trame osseuse est entourée par une fine couche externe fibreuse permettant notamment l'insertion des tendons et ligaments : le périoste (Figure 5B).

Le périoste est une membrane vascularisée, résistante, qui recouvre la pièce osseuse sur toute sa surface, à l'exception du cartilage articulaire. Le périoste contient les vaisseaux sanguins qui apportent les nutriments indispensables à la réparation de l'os. Il facilite également le remaniement de l'os en servant de membrane de confinement pour le dépôt de nouvelles cellules osseuses et en s'assurant que l'os nouvellement formé s'ajoute au tissu osseux déjà existant. Seuls les os du crâne en sont dépourvus.

Sous le périoste se trouve l'os cortical (dont l'unité de structure est l'ostéon) qui représente environ 80 % du squelette et constitue la paroi externe de toute pièce osseuse, ainsi que de la diaphyse des os longs ⁴⁵. Ses ostéons sont cylindriques, de 200 à 300 µm de diamètre, et centrés par un canal de Havers plus ou moins ouvert de 50

µm de diamètre en moyenne dont l'orientation est grossièrement parallèle à l'axe de la diaphyse (Figure 5C). Ils sont reliés par des canaux transversaux de Volkmann. La résistance de l'os cortical dépend de plusieurs paramètres : extrinsèques (direction et vitesse d'application des contraintes exercées) ou intrinsèques (géométrie de la pièce osseuse et propriétés de la matrice minéralisée).

L'os trabéculaire constitue la partie plus interne de la paroi osseuse et ne représente que 20 % du squelette adulte (Figure 5C). Il est constitué de travées en forme de plaques ou de colonnes reliées entre elles par du tissu adipeux et hématopoïétique richement vascularisé. Les travées forment ainsi un réseau tridimensionnel dont l'orientation est ajustée par les sollicitations mécaniques. Il représente une surface d'échange considérable avec les liquides interstitiels, avec un renouvellement plus rapide que celui de l'os cortical, jouant ainsi un rôle majeur dans l'équilibre phosphocalcique. Il participe d'autre part à la résistance aux contraintes mécaniques, notamment en compression, des épiphyses et des métaphyses des os longs et des corps vertébraux qu'il compose principalement. L'unité de base est cette fois un hémistéron en forme de croissant ouvert sur la moelle osseuse.

2.2. La matrice extracellulaire composant la trame osseuse

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé dont la matrice extracellulaire est composée d'une fraction organique et d'une fraction minérale qui lui confèrent ses propriétés de rigidité et d'élasticité. La fraction organique est produite par des cellules spécialisées et est constituée d'une substance fondamentale glycoprotéique (protéoglycanes, ostéocalcine, facteurs de croissance, ...) et de fibres de collagènes, principalement de type I. La fraction minérale est quant à elle composée de calcium et de phosphate assemblés sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

2.2.1. La matrice extracellulaire organique

Elle représente 22% de la masse osseuse et forme ce que l'on appelle l'ostéoïde ou substance préosseuse. Les principales classes de macromolécules qui

la composent forment la substance fibrillaire (90 %) contenant des protéines fibreuses structurales (collagène et élastine) ou adhérentes (fibronectine) ainsi que la substance interfibrillaire (10 %) englobant les glycosaminoglycanes (GAG) et protéoglycanes, des petites protéines non collagéniques comme l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine et les sialoprotéines osseuses ainsi que des lipides en petites quantités. Dans le tissu osseux, ces molécules peuvent induire ou inhiber la minéralisation (Figure 6).

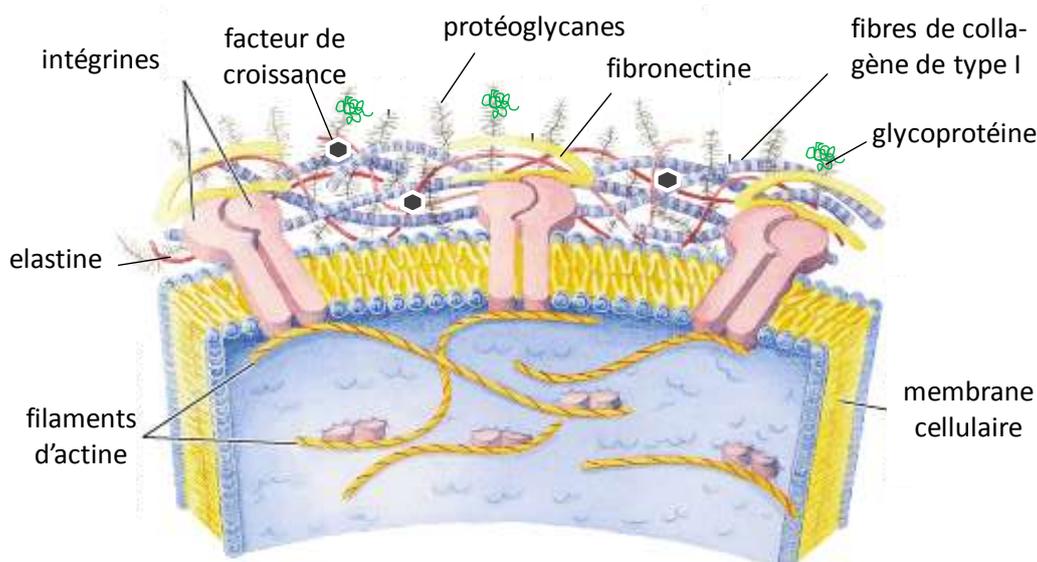


Figure 6 : Matrice extracellulaire organique. Adapté à partir de <http://www.biochem.arizona.edu>.

Le constituant essentiel de l'ostéoïde est le collagène de type 1 qui représente un peu moins de 90 % des macromolécules de la matrice organique. Appelé aussi collagène fibrillaire, il est formé de l'assemblage de trois chaînes alpha (α) de polypeptides, deux chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$. Le réseau fibreux formé par l'assemblage des molécules de collagène favorise la minéralisation du tissu osseux par la fixation, sur les fibres de collagène, de cristaux d'hydroxyapatite qui confèrent sa dureté au tissu osseux. Tout défaut qualitatif et/ou quantitatif du collagène de type I entraîne une désorganisation de la matrice extracellulaire et un défaut de minéralisation conduisant à une fragilité osseuse. Ce désordre correspond au phénotype osseux des enfants atteints d'ostéogénèse imparfaite, maladie plus connue sous le nom de « maladie des os de verre » (voir paragraphe 4 de cette introduction).

Bien que le collagène de type I soit un composant de la peau, des tendons, de la cornée et des organes internes, sa minéralisation n'est observée qu'au niveau

du tissu osseux (dans des conditions non pathologiques) et ce grâce à la présence de protéines annexes tels que les GAG et les protéines conjuguées.

Les GAG sont de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées composées d'unités disaccharidiques répétitives, on parle de protéoglycanes lorsqu'ils sont liés de façon covalente à une protéine. Ces molécules, dotées d'un grand pouvoir osmotique, attirent et retiennent les molécules d'eau pour former des gels fortement hydratés. La phase aqueuse de ces gels permet la diffusion rapide des nutriments, des métabolites et des hormones entre le sang et les cellules du tissu, ainsi que la migration cellulaire. Cependant, dans le tissu osseux, la phase aqueuse sera rapidement remplacée par les minéraux qui vont durcir la matrice. Les phénomènes de diffusion seront donc fortement amoindris. Enfin, certains protéoglycanes peuvent être associés à la membrane plasmique où ils jouent un rôle de co-récepteur dans l'initiation de la réponse cellulaire à certains facteurs hormonaux et locaux qui influencent directement ou indirectement l'ostéogenèse.

Les petites protéines conjuguées sont la fibronectine (intervenant dans l'adhérence cellule-matrice), l'ostéopontine (se lie à aux ostéoclastes pour faciliter leur adhésion à la matrice), l'ostéocalcine (riche en acide γ -carboxyglutamique et liée aux cristaux de la phase minérale, synthétisée par les ostéoblastes, elle attire et active les ostéoclastes et joue donc un rôle dans le renouvellement osseux), l'ostéonectine, les sialoprotéines osseuses, les collagénases. Certaines de ces protéines, dont l'ostéopontine, l'ostéonectine, les sialoprotéines et les phosphoprotéines possèdent des sites de liaison au calcium, ce qui contribue à l'initiation de la minéralisation de la matrice.

2.2.2. La fraction minérale

La minéralisation nécessite des concentrations adéquates en minéraux et l'existence de sites de nucléation localisés dans des zones particulières des fibres de collagène de type I, permettant la formation des cristaux d'hydroxyapatite. Ils sont formés de petites plaques hexagonales organisées en lamelles sur lesquelles se répartissent les ions OH^- , Ca^{2+} et PO_4^{3-} .

L'action enzymatique de la phosphatase alcaline est responsable du clivage des liaisons organophosphates qui libère le phosphate inorganique dans le milieu. Elle participe vraisemblablement au processus de minéralisation. Elle est localisée

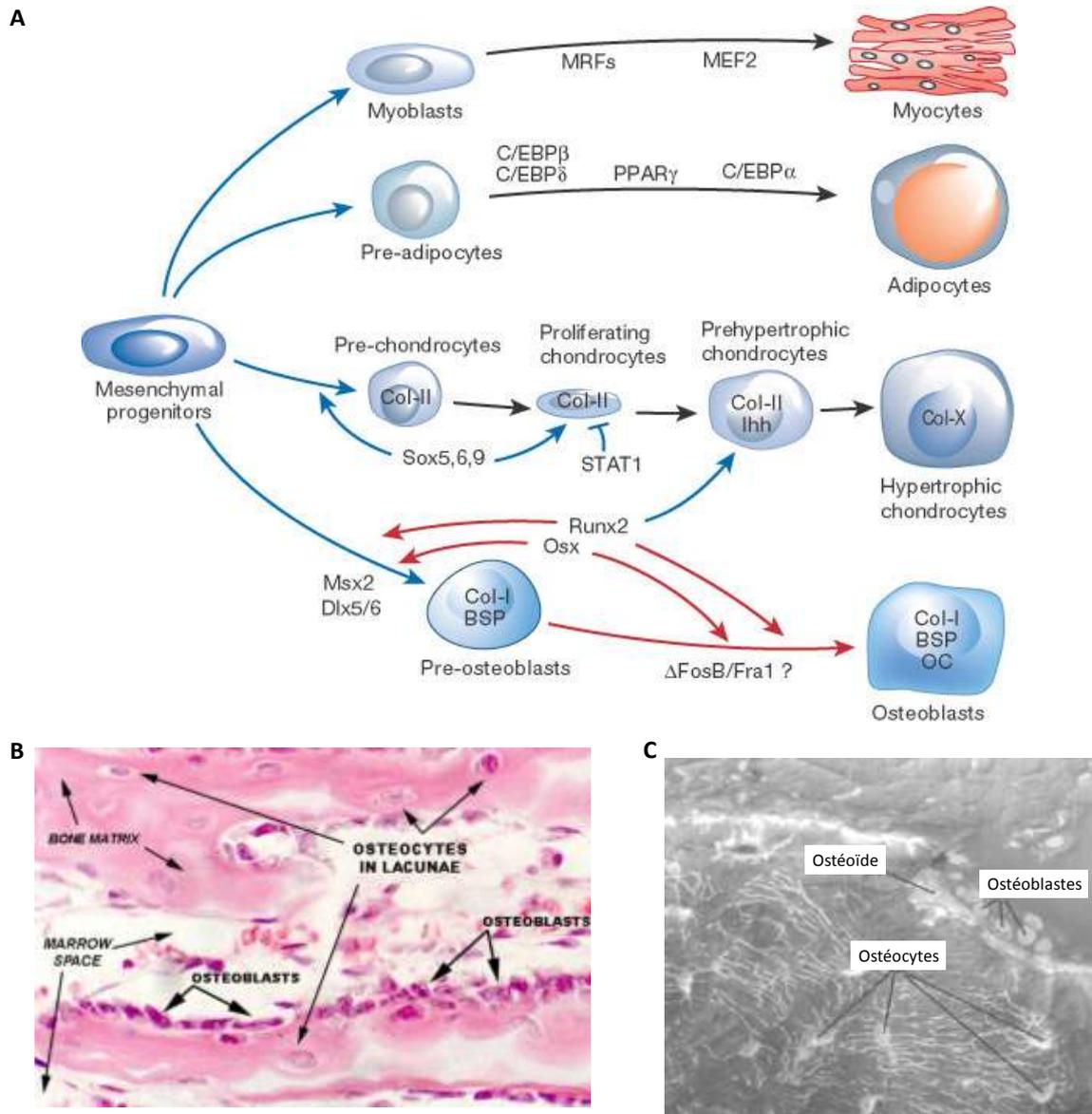


Figure 7 : Les cellules de la lignée ostéoblastique. Les ostéoblastes sont issus de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses sous l'influence de différents facteurs tels que Runx2 et Ostérix (Osx) (A), d'après Harada et Rodan ⁴⁶. Ces cellules sont alignées sur la matrice osseuse et ont pour fonction de minéraliser la matrice osseuse (B), d'après <http://education.vetmed.vt.edu>. En effet, les oséoblastes synthétisent l'ostéoïde durant la phase de formation osseuse, une fois emmurés dans la matrice osseuse, ils se différencient en ostéocytes (C). Ces ostéocytes possèdent de fins prolongements cytoplasmiques assurant une communication entre eux mais également avec les ostéoblastes, d'après Knothe Tate et al ⁴⁷.

dans la membrane plasmique des ostéoblastes et son site actif est accessible à partir de la surface extracellulaire. Le minéral osseux se dépose sous la forme d'une apatite très peu cristalline qui se transforme en un cristal ayant la configuration de la brushite (précurseur de l'apatite) pour prendre peu à peu celle du phosphate d'octacalcium avant de devenir de l'hydroxyapatite pure avec un rapport Ca/P égal à 1,66.

La présence de cristaux d'hydroxyapatite sur des sites de minéralisation entraîne une concentration en calcium et phosphate suffisamment élevée pour permettre la précipitation du phosphore et du calcium amorphe. La liaison du calcium aux protéines non collagéniques permet la poursuite de la maturation cristalline.

2.3. Les cellules osseuses

Les cellules osseuses trouvent leur origine dans la moelle qui produit trois types cellulaires directement impliqués dans la biologie du tissu osseux : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes sont responsables de la formation de la matrice organique du tissu osseux, matrice qui après minéralisation renferme les ostéocytes. Les ostéoclastes présentent quant à eux une activité résorptive. Ces cellules permettent ainsi la formation et la dégradation de l'os, ainsi que son remodelage.

2.3.1. Les ostéoblastes et les ostéocytes

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ou stromales sont les précurseurs des fibroblastes, des adipocytes, des cellules endothéliales ⁴⁸ et de la lignée ostéoformatrice comprenant les ostéoblastes et les chondroblastes ⁴⁹. Cette différenciation vers l'une ou l'autre de ces voies est sous le contrôle de l'expression de facteurs de transcription spécifiques. En ce qui concerne la différenciation ostéoblastique, les facteurs RUNX2 (CBFA1) et OSTERIX sont indispensables à l'engagement des CSM dans cette voie ⁵⁰ et sont eux-mêmes sous contrôle de cytokines et hormones telles que les BMPs (Bone morphogenetic proteins), le TGF- β (Transforming growth factor β), la voie WNT (Wingless-type)/ β -caténine ou encore les

oestrogènes ⁵¹ (Figure 7A). Des études ont également suggéré l'implication de miRNAs endogènes dans la régulation de la différenciation ostéoblastique ⁵²⁻⁵⁴. Récemment, Li et *al.* ont mis en évidence l'implication du miR-2861 dans la différenciation d'ostéoblastes primaires de souris, ce miRNA endogène cible l'expression de HDAC5 (histone deacetylase 5) ⁵⁵.

Les ostéoblastes matures sont des cellules cuboïdales mononucléées polyédriques ou vésiculeuses de 20 µm de diamètre (Figure 7B p31), alignées et attachées sur la matrice osseuse, et caractérisées par une activité phosphatase alcaline importante. L'ostéoblaste est limité par une membrane plasmique classique polarisée. En effet, la portion de membrane plasmique adjacente à l'os en développement se trouve hérissée d'un nombre important de prolongements cytoplasmiques qui peuvent s'étendre profondément entre les fibrilles de collagène de l'ostéoïde (Figure 7C p31). Par contre, la portion de membrane plasmique située au pôle opposé de la cellule, c'est-à-dire celui qui n'est pas en contact avec l'os en formation, possède peu d'expansions.

Leur fonction principale est de synthétiser la matrice (ou tissu ostéoïde) et de participer à sa minéralisation. Au fur et à mesure que la matrice est synthétisée et minéralisée, une large part des ostéoblastes meurent, d'autres retournent à un état de repos, principalement sur les surfaces osseuses (cellules bordantes), d'autres encore sont emprisonnés dans la matrice qu'ils ont synthétisée et deviennent des ostéocytes (ils représentent environ 1/10^{ème} des ostéoblastes matures) (Figure 8).

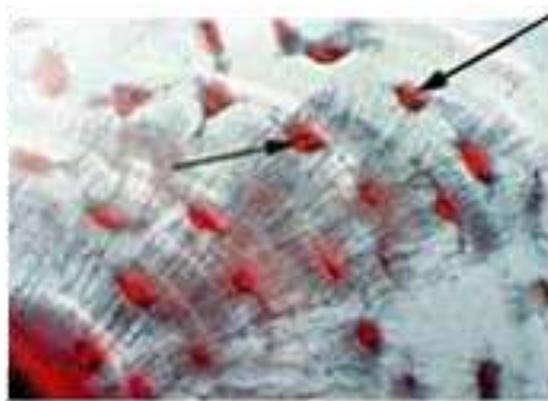


Figure 8 : Coloration d'ostéocytes figés dans les lamelles concentriques de l'unité structurale de l'os compact : l'ostéon. D'après Marieb ⁴⁴.

Cette formation osseuse assurée par les ostéoblastes peut être mesurée *in vivo* par dosages biochimiques de l'expression de molécules synthétisées spécifiquement par ces cellules telles que la phosphatase alcaline ou le propeptide N-terminal (PINP) reflétant la synthèse du collagène de type I.

L'ostéocyte est une cellule étoilée possédant de très nombreux

prolongements cytoplasmiques qui cheminent à travers un réseau de canalicules creusé dans la matrice osseuse et baigné de liquide extracellulaire. Ce réseau permet de relier les ostéocytes entre eux et aux cellules de la surface (ostéoblastes et cellules bordantes), assurant ainsi la transmission de diverses informations chimiques (ions, hormones) et mécaniques (mouvement de fluides, déformations, gravité) par le biais de jonctions communicantes intercellulaires. De ce fait, les ostéocytes sont de bons candidats au rôle de « mécanosenseur »⁵⁶. En effet, plusieurs études montrent que ces cellules sont sensibles au stress mécanique et aux mouvements de fluides⁵⁷. Ces cellules sont également capables de synthétiser certaines molécules, notamment en réponse à un stimulus mécanique et de jouer un rôle dans les échanges calciques entre le tissu osseux et le sang. Enfin, les ostéocytes expriment spécifiquement la sclérostine, puissant agent inhibiteur de la formation osseuse⁵⁸ ainsi que des protéines matricielles.

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes devenus progressivement aplatis pour former une couche cellulaire attachée et alignée le long de surfaces osseuses dites inactives. Différents rôles leur sont attribués. Unies entre elles et aux ostéocytes, elles pourraient ainsi participer au réseau de communications intercellulaires. Elles pourraient également constituer une barrière fonctionnelle entre la moelle osseuse et l'os calcifié. Les cellules bordantes seraient une source de cellules ostéoblastiques de réserve capables de se transformer en cellules ostéogéniques sous l'action de certains stimuli comme la PTH (hormone parathyroïdienne⁵⁹). Enfin, elles pourraient jouer un rôle déterminant dans la modulation de l'activité ostéoclastique en libérant lors de l'activation d'un cycle de remodelage des substances chimiotactiques reconnues par les précurseurs ostéoclastiques. L'exposition de l'os à la résorption ostéoclastique serait par ailleurs facilitée par les rétractations cytoplasmiques des cellules bordantes sous l'action de certaines hormones comme la PTH.

2.3.2. Les ostéoclastes

Les cellules souches de la lignée hématopoïétique sont les précurseurs des cellules sanguines et immunitaires, dont la lignée monocyte-macrophage à l'origine des ostéoclastes. En effet, la lignée ostéoclastique dérive de précurseurs circulants, apparentés à la lignée monocyttaire, qui colonisent la moelle osseuse et se différencient au contact des cellules stromales préostéoblastiques. La différenciation de ces précurseurs en ostéoclastes se fait sous l'influence de facteurs de transcription

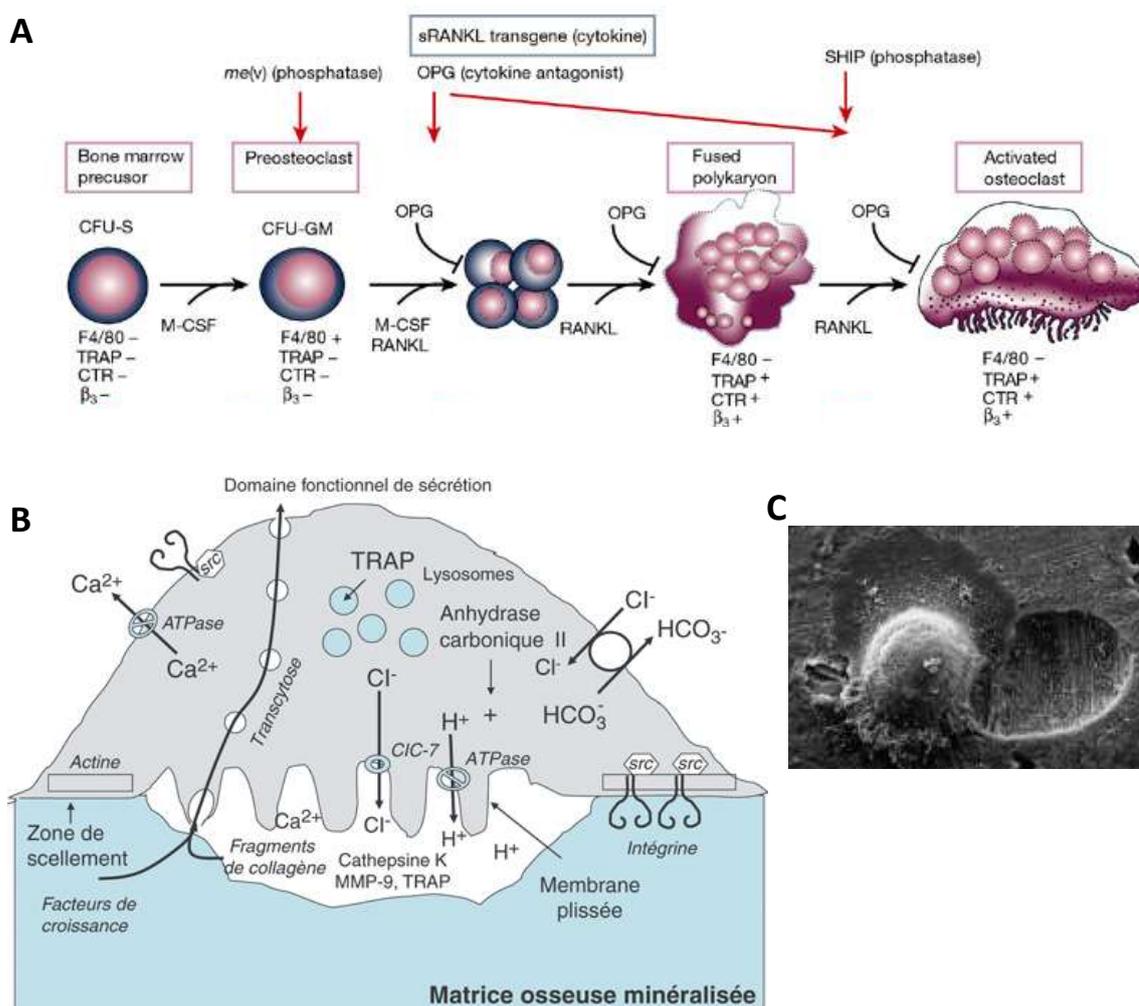


Figure 9 : Les ostéoclastes : différenciation et mécanisme d'action. (A) Les ostéoclastes dérivent de précurseurs issus de la lignée hématopoïétique sous l'influence de facteurs tels que RANKL et le MCSF pour former des cellules géantes multinucléées, d'après Boyle et al ⁶⁰. (B) Les ostéoclastes sont caractérisés par la présence de phosphatase acide tartrate résistante (TRAP) contenue dans leurs nombreux lysosomes et par leur capacité à résorber la matrice osseuse minéralisée. Après constitution d'une « poche » hermétique entre membrane plissée et os, l'ostéoclaste assure la dissolution de la phase minérale du tissu osseux, notamment grâce à la libération d'ions H⁺, puis la digestion de la matrice collagénique sous l'effet d'enzymes lysosomiales telles que la cathepsine K et les matrice-métallo-protéases (MMP ou collagénases) libérées par exocytose. (C) Cette dégradation a pour conséquence la formation de lacunes de résorption mises en évidence par microscopie électronique, d'après Chambers ⁶¹.

(*PU-1*, *c-fos*, *NFκB*) et de facteurs de croissance dont les principaux sont le M-CSF et RANKL. Le macrophage colony stimulating factor (M-CSF) en se liant à son récepteur *c-fms* stimule la prolifération et la survie des précurseurs monocytaires. Le receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (TNFSF11 ou RANKL), exprimé à la membrane des ostéoblastes ou des cellules stromales ou libéré sous forme soluble dans le compartiment extracellulaire, se lie à son récepteur RANK exprimé par les cellules de la lignée ostéoclastique ⁶². Ceci a pour conséquence d'activer la survie et la différenciation des progéniteurs en préostéoclastes mononucléés ainsi que leur fusion pour former des ostéoclastes matures multinucléés capables de résorber la matrice osseuse. Une telle association de M-CSF et d'une forme recombinante soluble de RANKL est apparue nécessaire et suffisante pour obtenir des ostéoclastes matures *in vitro*, en l'absence de cocultures avec des ostéoblastes ou des cellules stromales jusque là indispensables ⁶³ témoignant de l'importance de ces deux facteurs dans la différenciation ostéoclastique. L'ostéoprotégérine (OPG), synthétisée par les ostéoblastes, agit comme un récepteur leurre de RANKL inhibant ainsi la liaison du facteur pro-résorptif à son récepteur. Autrement dit, l'OPG prévient la naissance et la maturation des ostéoclastes (Figure 9A).

L'ostéoclaste mature est une cellule géante multinucléée (100 μm de diamètre en moyenne). Elle est caractérisée par la présence de phosphatase acide tartrate résistante (TRAP) contenue dans ses nombreux lysosomes, de récepteurs de la calcitonine, et par sa capacité à résorber la matrice osseuse minéralisée. Le pôle basal présente une membrane plissée appelée bordure en brosse au contact de laquelle la matrice est résorbée. La résorption débute par l'adhérence de l'ostéoclaste sur la travée osseuse (via les intégrines) avec constitution d'une « poche » hermétique entre la membrane plissée et l'os. Dans ces sites d'adhérence on retrouve de nombreuses molécules impliquées dans la transduction du signal tel que *c-Src*, *Pyk2* ou *FAK* (focal adhesion kinase), *PI3* kinase qui jouent un rôle déterminant dans l'assemblage et le désassemblage des structures d'adhérence (processus nécessaire au déplacement de l'ostéoclaste le long de la matrice). La voie *FAK* est notamment régulée par un mécanisme d'inhibition post-transcriptionnelle via l'action du *miRNA-138* (*miRNA* endogène) sur *Pyk2* ⁶⁴. L'ostéoclaste relargue dans la poche hermétique des ions H^+ grâce à une pompe à protons ce qui acidifie le milieu. Il s'en suit 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 telles que la cathepsine K et les métalloprotéases matricielles (ou collagénases)

libérées par exocytose (Figure 9B p35).

L'os résorbé laisse peu à peu la place à une lacune de résorption appelée lacune de Howship (Figure 9C p35). Le pH acide de cette lacune favorise l'activité de ces enzymes. Certains débris protéiques, incluant les produits de dégradation du collagène, sont transportés grâce au trafic vésiculaire à travers la cellule et sont ensuite excrétés dans le milieu extracellulaire. Ainsi la résorption osseuse peut être mesurée par des dosages biochimiques comme le taux des molécules de pontage du collagène et de leurs peptides associés : CTX ou le NTX (télopeptides du collagène). La durée de vie moyenne d'un ostéoclaste humain est de 2 semaines après lesquelles il entre en apoptose ⁶⁵.

2.4. Le remodelage osseux

Pour répondre à ses différentes fonctions, l'os est remodelé en permanence grâce à une activité couplée des ostéoclastes résorbant l'os ancien ⁶⁶ et des ostéoblastes synthétisant une matrice osseuse nouvelle ⁴⁸. Ce remodelage osseux accomplit trois principales fonctions. Il permet tout d'abord à l'organisme de réguler l'équilibre minéral (homéostasie du calcium et du phosphate). Il constitue ensuite un mécanisme d'adaptation du squelette à son environnement mécanique, réduisant ainsi le risque de fracture. C'est enfin un mécanisme de renouvellement tissulaire, très intense lors de la croissance, et de réparation des dommages osseux créés notamment lors des contraintes.

Ce processus peut être divisé en 4 grandes étapes et est hautement régulé. L'ostéoblaste apparaît comme la cellule cible des voies de régulation. Cette cellule a notamment la capacité de moduler l'ostéoclastogenèse grâce à la voie RANK/RANKL/OPG, fondamentale dans l'équilibre formation/résorption. Elle est elle-même sous la dépendance de nombreux facteurs de transcription, notamment les membres du complexe AP1 et la voie canonique Wnt- β -caténine.

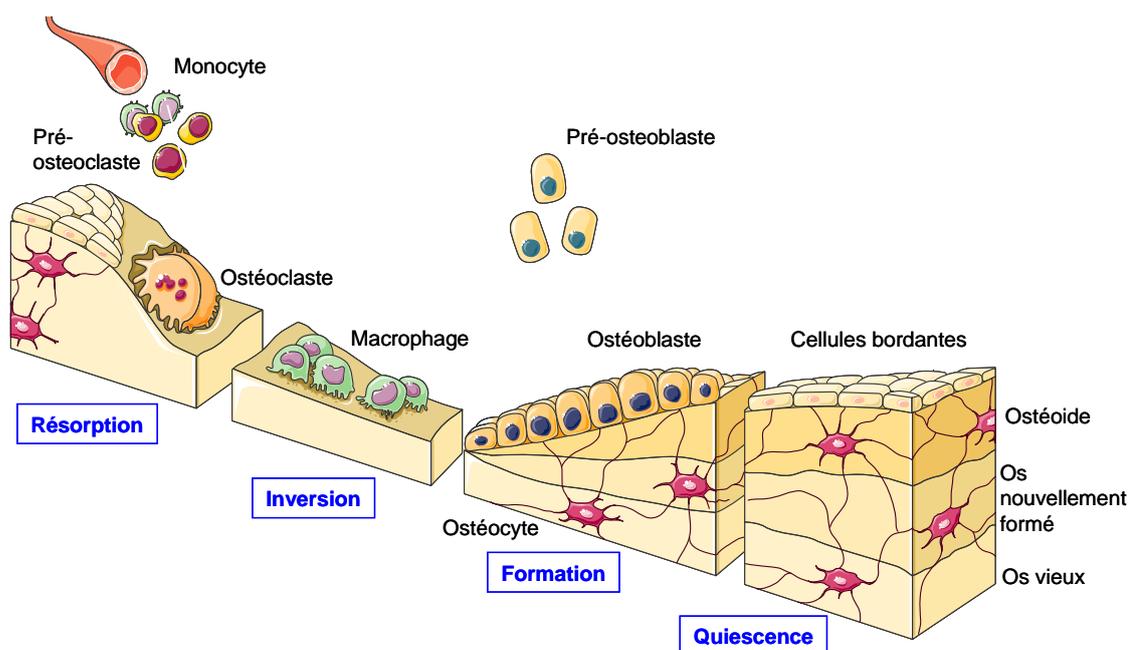


Figure 10 : Les différentes étapes du remodelage osseux. Divers stimuli amènent les préostéoclastes sur une surface osseuse qui devient le siège d'une résorption ostéoclastique. Dans la lacune formée, des ostéoblastes viennent déposer la matrice collagénique qui se minéralise dans un second temps. Adapté de la publication de Lerner. D'après Lerner ⁶⁷.

2.4.1. Les étapes du remodelage osseux

Le remodelage commence par une activation des cellules bordantes qui recouvrent une surface osseuse inactive. Ces cellules, tout en se rétractant, dégradent la couche collagénique sous-jacente et attirent par chimiotactisme les préostéoclastes sur la zone osseuse ainsi exposée : c'est la phase d'« activation ». Ces préostéoclastes fusionnent pour devenir des ostéoclastes actifs et adhérents à la surface osseuse : c'est la phase de « résorption » du minéral osseux et de la matrice organique. La phase d'« inversion » correspond au remplacement des ostéoclastes par des cellules mononucléées de type macrophagique. Elles seraient responsables de la préparation au comblement de la lacune, avec notamment le dépôt de la ligne cémentante au fond de celle-ci. Puis survient le recrutement des ostéoblastes dans cette lacune qu'ils comblent en apposant une nouvelle matrice organique, le tissu ostéoïde, qui sera ensuite minéralisé : c'est la phase de « formation ». L'activité de formation dépend d'avantage du nombre initial d'ostéoblastes que de l'activité propre de chaque cellule. La vitesse d'apposition de la matrice osseuse est initialement élevée, puis fléchit lorsque la lacune de résorption se comble. La durée de ce cycle de remodelage dure environ de 3 à 6 mois chez l'homme adulte. Vient enfin une phase de « quiescence » pendant laquelle la minéralisation secondaire de la matrice est parachevée. Cette étape correspond à une accumulation de minéral dans la matrice indépendamment des cellules osseuses, avec un rôle fondamental dans la résistance mécanique des os (Figure 10).

La mise en place de ce processus naît à un moment et en un point donné qui se déplace sur la surface osseuse à une vitesse évaluée à 25 $\mu\text{m}/\text{jour}$ sur une distance variable qu'il est impossible d'évaluer sur le plan histologique et disparaît une fois l'os remplacé. Ceci nécessite ainsi un apport constant de cellules précurseurs ostéoclastiques à l'avant du front de progression et ostéoblastiques à l'arrière ⁶⁸. La nouvelle unité structurale osseuse issue de cette reconstruction correspond à un ostéon. Chez l'adulte, le nombre d'unités actives à un instant donné est d'environ 1 million. Dans l'os cortical, ces ostéons s'organisent autour de cylindres, les canaux de Havers, plus ou moins ouverts suivant leur stade fonctionnel. Dans l'os trabéculaire, ces mêmes structures sont ouvertes sur la moelle et, chez l'Homme, son taux de renouvellement est cinq à huit fois plus rapide que l'os cortical. Ainsi on considère que 4% de l'os cortical et 25% du trabéculaire sont renouvelés par an.

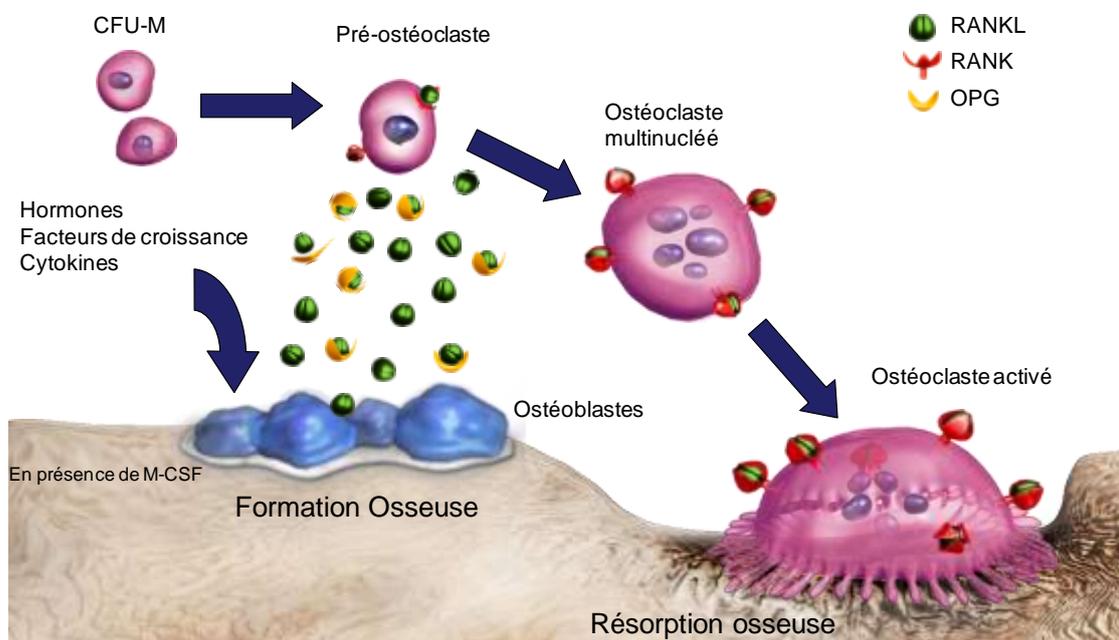


Figure 11: La triade moléculaire OPG/RANK/RANKL et la différenciation ostéoclastique. D'après Amgen et adapté de Boyle et al ⁶⁰.

Le mécanisme cellulaire de renouvellement du tissu osseux est soumis à l'influence de facteurs exogènes et endogènes dont les plus importants, capables de moduler l'activité des cellules osseuses, sont un certain nombre de facteurs hormonaux et locaux, ainsi que les contraintes mécaniques. Les hormones calciotropes (PTH, vitamine D) modulent le remodelage osseux, soit directement, soit en modifiant la production des facteurs locaux de régulation du métabolisme osseux.

2.4.2. Régulation du remodelage osseux : la triade OPG / RANK / RANKL

Les protéines RANK (TNFRSF11a ou receptor activator of NFκB) / RANKL (TNFSF11 ou RANK ligand) / OPG (TNFRSF11b ou ostéoprotégérine) sont essentiellement produites par les ostéoblastes et les cellules du microenvironnement osseux. Elles constituent des effecteurs terminaux locaux issus de l'action de certaines hormones systémiques telles que la PTH, la vitamine D3 et les prostaglandines E2 (PGE2). Les ostéoblastes sont nécessaires à la différenciation des ostéoclastes. Le système RANK/RANKL/OPG, médiateur de cette communication intercellulaire entre ostéoblastes et ostéoclastes, exerce un rôle fondamental dans le contrôle de l'ostéoclastogénèse, la plupart des hormones et cytokines modulant la résorption osseuse agissant au moins en partie à travers cette voie (Figure 11).

RANKL est une cytokine transmembranaire avec un court domaine N-terminal intracytoplasmique, pouvant être clivé par des protéases de manière à générer une forme soluble, et une longue portion extracytoplasmique C-terminale. Le domaine extracytoplasmique de RANKL est capable de reconnaître de manière sélective des cellules progénitrices hématopoïétiques engagées dans la différenciation ostéoclastique sous l'influence du M-CSF (voir chapitre 2.3.2). Le récepteur de RANKL est RANK, une protéine transmembranaire, auquel il se lie avec une forte affinité. Dans l'os l'expression de RANK est limitée aux ostéoclastes. Dans les autres tissus, RANK est exprimé surtout par les fibroblastes, les cellules dendritiques et les lymphocytes T et B. RANK est essentiel à la différenciation et à la survie des ostéoclastes⁶⁹ par l'activation de voies de signalisation telles que PI3K, p38, ERK, JNK, Akt ou NFκB.

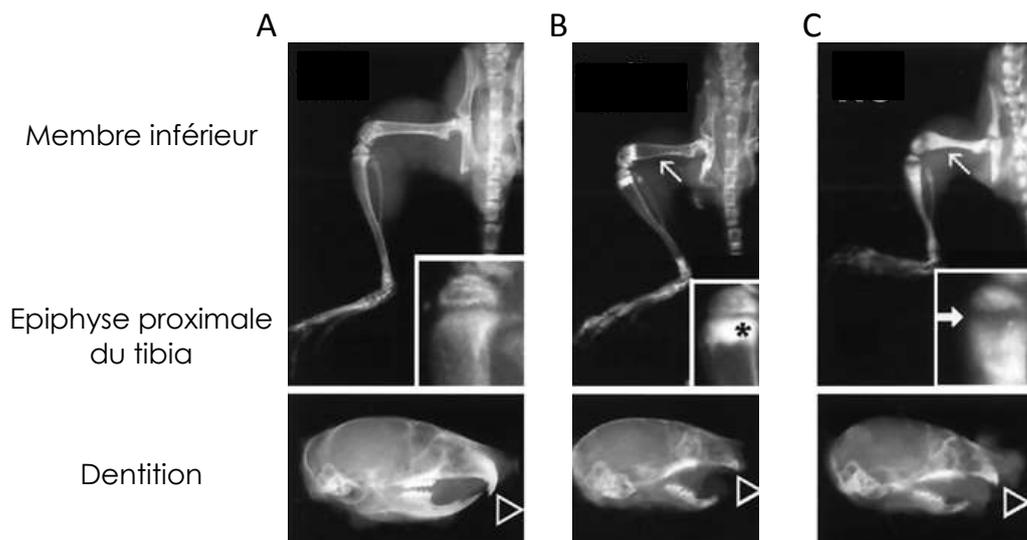


Figure 12 : Données radiographiques de souris sauvages (A), surexprimant la cytokine pro-résorptive Rankl (B) ou inactivées pour le gène *Rankl* (C). D'après Kim et al ⁷⁰.

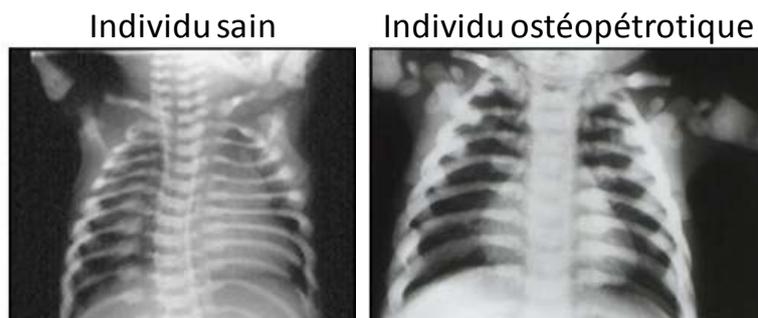


Figure 13 : Clichés radiographiques d'une cage thoracique chez un patient sain et un patient atteint d'ostéopétrose caractérisée par une mutation dans le gène codant le récepteur RANK. D'après Guerrini et al ⁷¹.

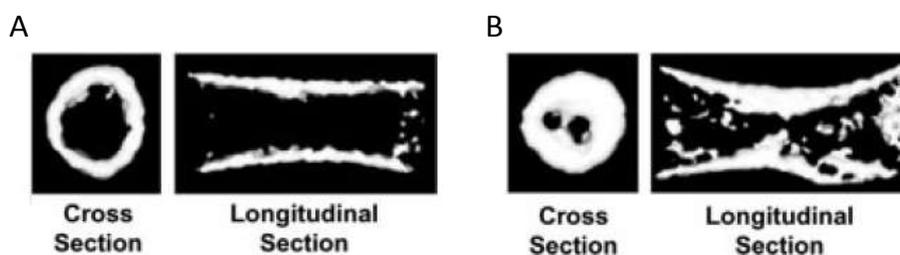


Figure 14 : Analyses microscanner de fémurs chez des souris sauvages (A) et des souris transgéniques surexprimant l'ostéoprotégérine (B). D'après Stolina et al ⁷².

Chez les souris invalidées pour les gènes RANKL ou RANK, l'activation des ostéoclastes est défectueuse, autrement dit, la formation osseuse ne peut plus être contrebalancée par la résorption (Figure 12). Ceci se traduit par une masse osseuse plus dense associée à une fragilité du squelette mais aussi par un comblement des cavités médullaires osseuses ayant pour conséquence une diminution de l'espace attribué au tissu hématopoïétique, ce qui entraîne une forme d'anémie progressive. Ce phénotype correspond à celui de l'ostéopétrose chez l'Homme, maladie caractérisée par une perte de l'activité des ostéoclastes au cours de leur différenciation ou de leur activité. Cette perte d'activité ostéoclastique est également retrouvée chez des patients présentant une ostéopétrose « génétique » car associée à des mutations dans les gènes codant RANKL ⁷³ ou RANK ⁷¹ (Figure 13). Dans le cas où RANK est défectueux, une greffe de cellules souches hématopoïétiques est envisageable. Inversement, les souris traitées avec du RANKL exogène ⁷⁴, ou transgénique pour la cytokine ⁷⁰ présentent une perte osseuse et une hypercalcémie proche d'une ostéoporose chez l'Homme (Figure 12).

Plus récemment, il a été montré que RANKL pouvait être exprimé par d'autres cellules, notamment par les lymphocytes T activés et les synoviocytes au cours de rhumatismes inflammatoires tels que la polyarthrite rhumatoïde, induisant ainsi les phénomènes de résorption osseuse périarticulaire ⁷⁵.

L'OPG est une glycoprotéine produite en particulier par les ostéoblastes et aussi par d'autres cellules de la moelle osseuse. À l'inverse des autres membres de la famille des récepteurs au TNF, elle ne possède pas de domaine transmembranaire et agit donc comme un récepteur soluble dans le milieu extracellulaire. L'OPG agit comme un récepteur piège de RANKL dont elle inhibe ainsi l'action. Plus précisément, c'est le ratio entre le niveau d'expression de RANKL et de son récepteur leurre OPG par les ostéoblastes qui contrôle la résorption ostéoclastique ⁷⁶. De façon intéressante, Runx2, le facteur de transcription qui induit le phénotype des ostéoblastes et contrôle leur activité, régule directement l'expression des gènes de RANKL et de l'OPG, constituant ainsi un lien moléculaire entre formation et résorption osseuses.

Il a par ailleurs été montré que la délétion génique d'OPG entraînait une ostéoporose sévère caractérisée par une résorption excessive ⁷⁷, alors qu'une surexpression d'OPG entraîne une ostéopétrose ⁷⁸, confirmant ainsi le rôle crucial du système RANKL/OPG dans la détermination de la masse osseuse (Figure 14).

Toutes les hormones et les facteurs locaux qui agissent sur les ostéoclastes et sur leur activité de destruction de l'os ont une action sur le système RANKL, RANK, OPG. La PTH augmente la résorption osseuse en se liant à son récepteur sur les précurseurs ostéoblastiques du stroma médullaire. Elle inhibe la sécrétion de l'OPG et active l'expression de RANKL ⁷⁹. La 1,25(OH)vit2D (25-hydroxyvitamin D), à dose physiologique, inhibe la stimulation de l'expression de RANKL par la PTH et donc augmente la formation osseuse. Les cytokines inflammatoires, Interleukine (IL) -1 et TNF- α augmentent la destruction osseuse en stimulant la synthèse de M-CSF et de RANKL par les précurseurs ostéoblastiques médullaires, ce qui renforce le nombre et l'activité des ostéoclastes ⁸⁰. L'expression de RANKL est stimulée également par l'IL-6 et les glucocorticoïdes. Le TGF- β , les œstrogènes et les BMPs augmentent l'expression de l'OPG. Ainsi lors de la ménopause, le taux d'œstrogène chute ce qui favorise le développement de l'ostéoporose par diminution des taux d'OPG circulants.

En résumé, RANKL et OPG sont les effecteurs pivots du système agoniste – antagoniste qui régule tout le devenir des ostéoclastes : différenciation, fusion, activation, survie et apoptose. Les premiers rôles dans cette régulation semblent être tenus par les cellules préostéoblastiques du stroma médullaire notamment via le contrôle de l'activité de RANKL. En effet, RANKL exerce un rétrocontrôle négatif sur son expression par les précurseurs ostéoblastiques médullaires et stimule la synthèse d'OPG. Cette triade moléculaire contribue au bon déroulement du remodelage osseux et permet ainsi de maintenir l'équilibre entre les phases d'apposition et de résorption osseuse. Tout dérèglement de cet équilibre via la modification du ratio RANKL / OPG est lié à l'apparition de pathologies. Elles sont dites ostéocondensantes (telle que l'ostéopétrose) lorsque ce ratio est diminué entraînant ainsi une diminution de l'activité des ostéoclastes mais ce phénomène est rare. Le plus souvent les pathologies associées à une modification de ce ratio vont en faveur d'une augmentation de l'activité ostéoclastique et sont dites ostéolytiques entraînant une perte de la masse osseuse telle que l'ostéoporose. Dans ce cas, les traitements actuels visent à inhiber la suractivation des ostéoclastes par des molécules chimiques tels que les bisphosphonates (voir chapitre 3.5.1) ou par inactivation de la protéine RANKL par injection de récepteurs solubles (injection d'OPG recombinante) ou d'anticorps (Denosumab®, voir chapitre 3.5.2). Des modifications du ratio RANKL / OPG ont également été décrites dans des pathologies d'origine tumorale associées à un fort remodelage osseux ⁸¹. En effet, le microenvironnement osseux pourrait également participer à l'initiation et au développement de tumeurs ostéolytiques

primaires (comme l'ostéosarcome) ou secondaires (comme les métastases osseuses)⁸². Ainsi les stratégies développées dans le cadre du traitement de l'ostéoporose pourraient s'avérer efficaces dans le traitement des tumeurs osseuses. Plusieurs investigations sont déjà menées chez des patients atteints de myélome multiple ou présentant des métastases osseuses (comme pour le cancer de la prostate) pour diminuer l'incidence de la maladie sur le tissu osseux⁸³.

3. L'ostéosarcome : une tumeur osseuse primitive

L'ostéosarcome est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales ⁸⁴ qui dérivent donc, de près ou de loin, de la lignée ostéoblastique. Le développement de ces tumeurs se caractérise par un remodelage osseux de l'os adjacent à la tumeur. On distingue ainsi des tumeurs dites ostéolytiques, ostéocondensantes ou mixtes (Figure 15).

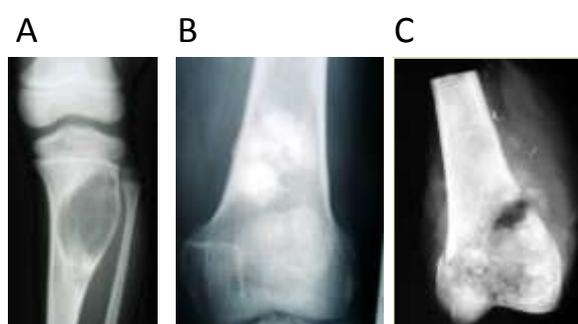


Figure 15 : Clichés radiographiques présentant les lésions osseuses associées au développement d'un ostéosarcome. Les lésions peuvent être uniquement ostéolytiques (A) ou associées à la formation d'os ectopique tumoral (la tumeur est dans ce cas qualifiée d'ostéocondensante) (B). Enfin certains patients présentent une forme mixte (C) associant ostéolyse et ostéocondensation. Clichés obtenus par le service d'orthopédie du CHU Hotel Dieu de Nantes (Professeur François Guoin).

3.1. Données épidémiologiques et étiologie des ostéosarcomes

Avec 4,8 nouveaux cas par an et par million d'enfants de moins de 20 ans aux Etats-unis ⁸⁵ et 3,6 nouveaux cas par million d'enfants de moins de 15 ans en France ⁸⁶ et par an, l'ostéosarcome est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente. Elle représente la moitié des cas de tumeurs osseuses diagnostiquées mais reste une pathologie rare (5% des cancers de l'enfant soit 0,2% de toutes les néoplasies malignes). Cette tumeur osseuse touche plus généralement une population jeune ; en effet, 75% des ostéosarcomes sont diagnostiqués entre 8 et 25 ans (avec une médiane d'âge de 18 ans) et est plus fréquente chez les garçons que chez les filles ⁸⁷. Chez l'enfant, l'ostéosarcome est considéré comme rare avant l'âge de 10 ans et exceptionnel avant 5 ans. Quelques cas sont également diagnostiqués après 60 ans mais les patients présentent le plus souvent un terrain favorable.

Le site préférentiel du développement de l'ostéosarcome se situe au niveau des os longs tels que ceux des membres supérieurs et inférieurs avec une localisation métaphysaire. Cette localisation ainsi que l'âge de survenue de l'ostéosarcome suggère un lien entre la croissance osseuse et l'initiation de la tumeur ⁸⁸. Cette hypothèse est notamment confirmée par l'incidence élevée des ostéosarcomes chez les chiens de grande taille. Le site métastatique préférentiel des cellules d'ostéosarcome est le poumon, le développement de nodules pulmonaires entraîne une insuffisance respiratoire causant le décès du patient. La présence de ces nodules au moment du diagnostic diminue fortement les chances de survie des patients.

L'étiologie de l'ostéosarcome reste à ce jour inconnue. En effet, les ostéosarcomes ne sont pas associés à une anomalie moléculaire contrairement à d'autres types de cancers tels que le sarcome d'Ewing induit par une translocation spécifique. Plusieurs observations expérimentales ont mis en évidence une possible relation entre la survenue des ostéosarcomes et une origine virale, traumatique, voire chimique, mais aucune de ces hypothèses n'a pu être confirmée chez l'Homme. Certaines prédispositions peuvent cependant être associées à l'apparition de ce type de tumeur comme chez des sujets ayant préalablement développé une maladie de Paget (maladie chronique associant des anomalies de l'architecture de l'os et une fibrose de la moelle) ou un syndrome de Rothmund-Thompson ⁸⁹ (généodermatose caractérisée par une poïkilodermie associée à une petite taille). D'autres sont observées chez des patients ayant déjà développé une tumeur de quelque origine que ce soit. C'est le cas de patients diagnostiqués pour un rétinoblastome en bas âge ⁹⁰ (où les ostéosarcomes s'observent 100 fois plus fréquemment que dans la population normale ⁹¹) ou encore le syndrome de Li-Fraumeni ⁹² (anomalie innée de l'un des allèles du gène p53, où l'enfant développe de multiples tumeurs aussi bien sarcomateuses que carcinomateuses). Ces ostéosarcomes résultant d'une première pathologie sont qualifiés de secondaires. Quelques cas d'ostéosarcome congénitaux ont pu être décrits mais trop peu pour considérer cette tumeur comme familiale ⁹³.

Malgré le fait qu'aucune lésion génétique spécifique n'ait été reconnue, de fréquentes anomalies cytogénétiques sont observées dans les ostéosarcomes avec une atteinte de certains loci comme ceux de p53 chez environ 50% des patients ⁹⁴ ou Rb (gène du rétinoblastome) chez 70% d'entre eux ^{95,96}. Une étude réalisée sur

une cohorte réduite de 29 patients atteints d'ostéosarcome a également montré que 38% des tumeurs présentent une ou plusieurs altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle de la transition G1-S, et donc dans l'entrée dans le cycle cellulaire ⁹⁷, ces altérations étant des facteurs de mauvais pronostic en terme de survie des patients. Il s'agit principalement de mutations du gène Rb, p53, et/ou de l'amplification des gènes MDM2 (inhibiteur de p53) et CDK4 (Cycline Dépendant Kinase 4, nécessaire à la transition G1-S). Certains ostéosarcomes ont également montré une dérégulation en faveur d'une surexpression du proto-oncogène c-myc ⁹⁴ ainsi que du facteur de transcription Ap-1 ⁹⁸ ou encore du gène c-kit contrôlant tous trois la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Enfin, une délétion chez 45,6% des patients de cette cohorte du gène *TWIST* impliqué dans le développement embryonnaire s'est avérée être également un facteur de mauvais pronostic ⁹⁹. Au niveau chromosomique, l'analyse des caryotypes a révélé de nombreux réarrangements ainsi que des variations dans le nombre de chromosomes, mais n'a conduit à l'identification d'aucune spécificité.

Ce manque de données sur les mécanismes moléculaires rend plus difficile le diagnostic ainsi que le développement d'approches thérapeutiques ciblées pour cette pathologie.

3.2. Diagnostic des ostéosarcomes : imagerie médicale et analyse anatomopathologique

Les signes cliniques des tumeurs osseuses primitives n'ont aucune spécificité, la douleur étant le symptôme initial le plus fréquent. La survenue de cette douleur peut être aussi bien diurne que nocturne et son allure aussi bien mécanique qu'inflammatoire. Cette douleur est la conséquence d'une atteinte osseuse pouvant aller jusqu'à la fracture. L'existence d'une tuméfaction palpable est une autre circonstance révélatrice mais ne s'observe que dans les régions où les éléments osseux sont superficiels (Figure 16).

Figure 16 : Détection macroscopique d'une tuméfaction sur l'humérus gauche d'une patiente prise en charge au CHU Hôtel Dieu de Nantes (Annexe 1, Perrot et al, 2010).



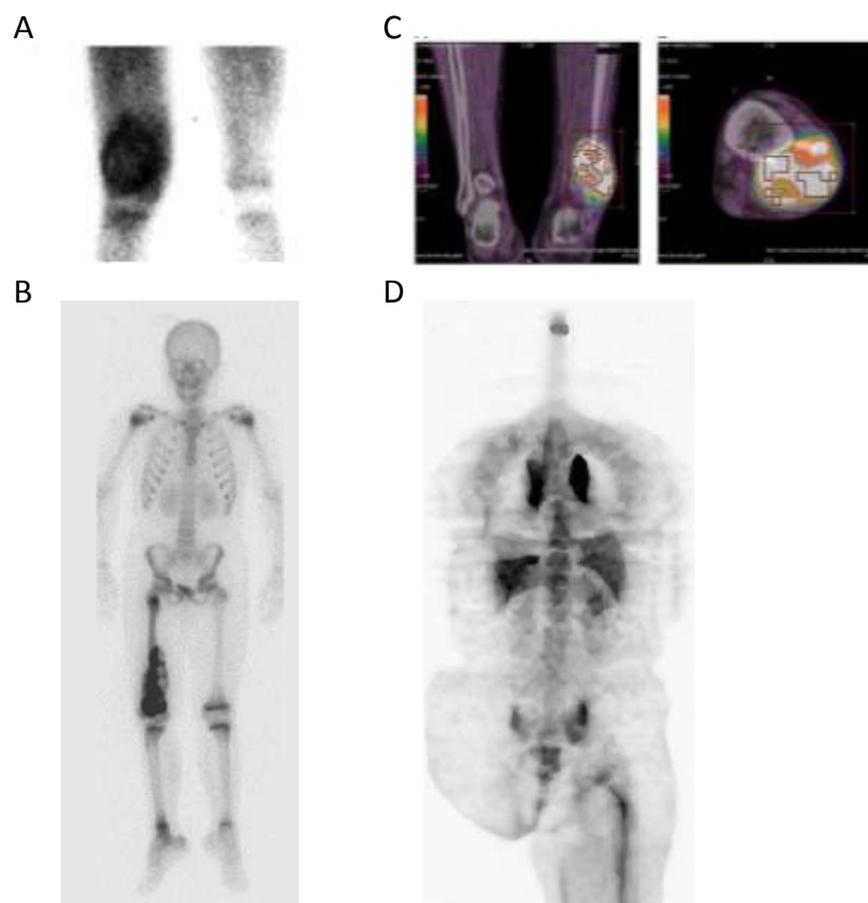


Figure 18 : Scintigraphie osseuse des ostéosarcomes chez l'Homme. Utilisation du ^{99}Tc -MDP pour la mise en évidence d'un ostéosarcome au niveau du genou par scintigraphie planaire (A, d'après Gorlick et al ¹⁰¹ et B, d'après <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/92/Osteosarcoma-003.jpg>).

La grande partie du diagnostic repose sur l'analyse anatomopathologique d'une biopsie et sur l'imagerie médicale. Hormis la radiographie conventionnelle qui révèle les lésions ostéolytiques et/ou ostéocondensantes sur le site tumoral, les deux principales techniques utilisées dans l'imagerie des tumeurs osseuses sont la scintigraphie osseuse pour la visualisation de lésions multiples et l'imagerie en coupe de type résonance magnétique (IRM) ou tomodensitométrie (TDM) qui sont utiles pour déterminer la nature de la tumeur, son extension locale et la présence de métastases, notamment dans les poumons qui constituent le site de dissémination métastatique privilégié des ostéosarcomes.

Après analyse de l'atteinte osseuse sur les clichés radiographiques, l'invasion des tissus mous est déterminée par des techniques d'imagerie en coupes telle que l'IRM. Cette technique permet l'étude de la tumeur en elle-même et des structures adjacentes, elle précise les rapports exacts de la tumeur avec les organes et/ou tissus avoisinants (muscles, vaisseaux, nerfs) ainsi que son étendue ¹⁰⁰ : c'est ce que l'on appelle le bilan d'extension local ou à distance (Figure 17). A ces techniques d'imagerie conventionnelle permettant une visualisation anatomique précise des lésions, des techniques d'imagerie fonctionnelle sont associées afin de distinguer les régions présentant un déséquilibre de la balance ostéolyse-ostéogénèse.



Figure 17 : Images de l'ostéosarcome de la figure 16 obtenues par IRM (Annexe 1, Perrot et al. 2010).

La scintigraphie osseuse utilisant le méthylène disphosphonate de Technétium (⁹⁹Tc-MDP) est l'examen radio-isotopique classique (Figure 18A et 18B). Ces dérivés phosphorés entrent dans le métabolisme phospho-calcique, leur fixation au tissu osseux est donc liée à l'activité de la résorption de la matrice osseuse. La fixation du MDP étant proportionnelle au flux vasculaire et au métabolisme osseux local ¹⁰⁴, l'activité de remodelage osseux ainsi que la présence de métastases peuvent être déterminées ¹⁰⁵.

A l'heure actuelle une autre technique de scintigraphie qui apparaît plus efficace dans le diagnostic et le suivi de l'ostéosarcome est en cours d'évaluation clinique : la scintigraphie au ¹⁸F-FDG ¹⁰⁶ (Figure 18C et 18D). Le fluorodésoxyglucose marqué au fluor 18 ([¹⁸F]-fluoro-2-déoxy-D-glucose ou ¹⁸F-FDG) est un traceur

biologique aspécifique dont la fixation est accrue dans les conditions pathologiques comportant une augmentation de la consommation de glucose ce qui est le cas pour les tumeurs. Cette technique d'imagerie est basée sur la différence de consommation de glucose entre les tissus sains et tumoraux. Le ^{18}F -FDG est un radionucléide émetteur de positon, analogue du glucose de demi-vie courte (109 min). Après injection intraveineuse, ce glucose modifié est capté de façon analogue au glucose par les cellules consommatrices. Dans la cellule, le ^{18}F -FDG transformé en ^{18}F -FDG -6 phosphate est incapable de passer la membrane cellulaire. Il ne subit pas les autres étapes de la glycolyse et s'accumule dans les cellules. Le ^{18}F -FDG permet d'effectuer une imagerie du métabolisme glucidique. L'augmentation du métabolisme glucidique par les cellules tumorales résulte de l'augmentation du nombre de transporteurs du glucose (par surexpression des gènes codant ces transporteurs) et de l'amplification des voies enzymatiques de la glycolyse. Cette technique d'imagerie fonctionnelle et métabolique a l'avantage de permettre le suivi de l'évolution tumorale *in vivo*. Elle est la plus sensible et la plus précoce pour évaluer la réponse thérapeutique car les modifications morphologiques de la tumeur apparaissent après les modifications métaboliques ¹⁰⁷. En effet, des zones de nécrose induite par les traitements de chimiothérapie peuvent être mises en évidence facilitant ainsi le suivi de la réponse thérapeutique. De plus, la grande résolution d'image générée par cette méthode d'imagerie permet de visualiser des foyers métastatiques qui n'apparaissent pas en utilisant d'autres méthodes de détection.

Ces différentes techniques d'imagerie sont indispensables à l'établissement du diagnostic, au suivi de la réponse aux traitements et des rechutes. Mais seule l'analyse histologique pourra poser le diagnostic final. La biopsie est obligatoire et reste essentielle dans le diagnostic de l'ostéosarcome et pour le distinguer d'autres tumeurs osseuses (telles que le sarcome d'Ewing, le chondrosarcome), c'est ce que l'on appelle le diagnostic différentiel. Histologiquement, la lésion apparaît comme une prolifération d'ostéoblastes plus ou moins bien différenciés, produisant une matrice osseuse d'architecture anarchique, plus ou moins abondante (Figure 19). Cette matrice osseuse peut être isolée, ou associée à une production de matrice le plus souvent osseuse (ostéosarcome de type ostéoblastique), cartilagineuse (ostéosarcome de type chondroblastique) ou fibreuse (ostéosarcome de type fibroblastique) ¹⁰⁸. Il existe un désordre architectural du tissu néoformé qui de plus s'infiltré dans les espaces médullaires de l'os qui abrite la tumeur, envahissant ses travées. Les vaisseaux de l'ostéosarcome sont souvent des sinusoides ou de véritables

cavités cavernueuses sans paroi propre. L'aspect histologique des tumeurs définit en partie la classification des ostéosarcomes, on distingue ainsi la forme commune, l'ostéosarcome télangiectasique (Figure 19), l'ostéosarcome à petites cellules rondes et l'ostéosarcome bien différencié intramédullaire ⁸⁸.

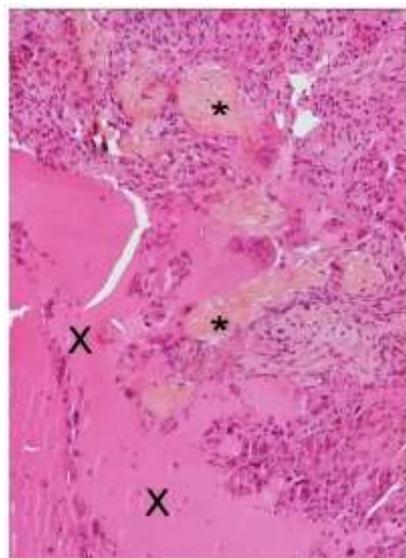


Figure 19 : Coloration hématoxyline, éosine, safran (HES) d'un ostéosarcome télangiectasique. L'analyse histologique de la biopsie montre des zones de prolifération cellulaire avec un fort indice mitotique, la formation de plaques d'ostéoïde (*) ainsi que des espaces télangiectasiques contenant du sang (X). L'image est obtenue par microscopie optique au grossissement x100. Annexe 1, Perrot et al., 2010

Les examens biologiques viennent en complément et sont le plus souvent normaux en dehors d'une augmentation des PHA (phosphatases alcalines sériques) traduisant un remaniement osseux.

3.3. Traitement conventionnel de l'ostéosarcome

Avant l'avènement de la chimiothérapie dans les années 1970, le traitement de l'ostéosarcome consistait principalement en une résection chirurgicale de la tumeur conduisant le plus souvent à une amputation du membre atteint. Le taux de survie à 5 ans était alors faible, de l'ordre de 10 à 20 % ¹⁰⁹. Les progrès réalisés dans le développement de la polychimiothérapie pré- et post-opératoire ont permis d'allonger le délai de survie et de guérir au moins 2/3 des patients. En effet, mise en place à partir de 1978, la chimiothérapie a métamorphosé le traitement de l'ostéosarcome et a permis d'envisager des techniques chirurgicales conservatrices afin de remplacer l'amputation ¹¹⁰. A l'inverse de la chimiothérapie dont l'usage s'est

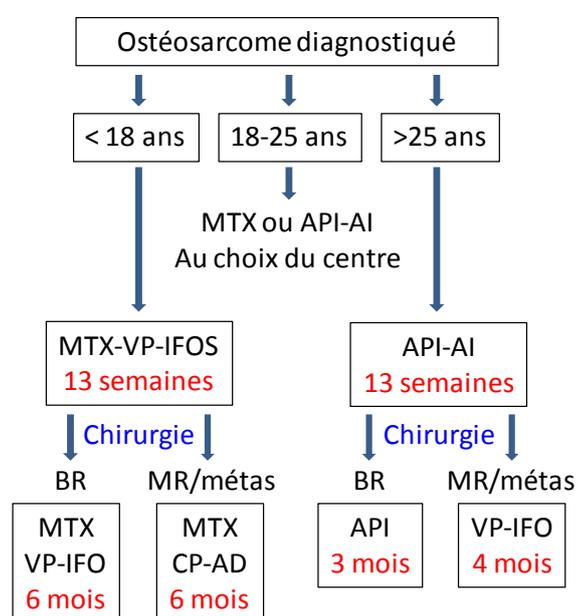


Figure 20 : Schéma de prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome par la chimiothérapie en France. BR : bon répondeur (<10% de cellules tumorales résiduelles), MR : mauvais répondeur (>10% de cellules tumorales résiduelles ou patient non opérable ou métastatique), MTX : méthotrexate, VP : VP-16, IFO : ifosfamide, API ; adriamycine + cis-platinum + ifosfamide, AI : adriamycine + ifosfamide, CP-AD ; cis-platinum + adriamycine. D'après le service d'oncopédiatrie du CHU Hotel Dieu de Nantes.

développé, les autres traitements complémentaires proposés, en particulier la radiothérapie de la tumeur primitive, ou l'irradiation prophylactique des poumons se révèlent peu efficaces ¹¹¹.

Le traitement général de l'ostéosarcome comprend une résection chirurgicale de la tumeur associée à des cures de polychimiothérapie généralement pré- et post-opératoires ¹¹². En effet, les protocoles associant une chimiothérapie néoadjuvante à une chimiothérapie adjuvante montrent une efficacité supérieure aux protocoles de chimiothérapie adjuvante seule ¹⁰⁴. La combinaison des molécules de chimiothérapie, les doses et la fréquence des injections dépendent des données histologiques de la biopsie qui déterminent la nature et le grade de l'ostéosarcome et de l'âge du patient (Figure 20 ci-contre). En règle générale, 4 cures de chimiothérapie sont réalisées avant la résection chirurgicale de la tumeur puis 6 cures en post-opératoire pour une durée de traitement de 10 mois au total. Les molécules les plus utilisées dans la prise en charge des patients en France sont les suivantes :

- le méthotrexate : dans la cellule il inhibe une enzyme, la dihydrofolate réductase provoquant un déficit en une base azotée (la thymine) ce qui ralentit fortement la synthèse de l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire. Il est administré à haute dose sous forme de perfusion pendant 24h puis 3 jours d'hospitalisation afin de s'assurer de son élimination. En effet, ce produit présente une certaine toxicité qui, si besoin, peut être contrecarrée par un antidote : la carboxypeptidase.

- Etoposide (VP16) / Ifosfamide : cette combinaison permet d'inhiber d'une part la kinase p34 « cdc2 » de façon irréversible par l'étoposide, bloquant la cellule en phase G2 du cycle cellulaire ainsi que la formation des microtubules par fixation du VP16 sur la tubuline. D'autre part, l'ifosfamide entraîne la libération d'ions éthylène-iminium bloquant la réplication de l'ADN d'où un effet cytostatique conduisant à une nécrose cellulaire. Ils sont administrés par 3 injections et entraînent de fortes aplasies médullaires (baisse des globules rouges et des globules blancs).

- La doxorubicine est un agent intercalant qui en se liant à la topoisomérase II forme un complexe avec l'ADN inhibant ainsi toute synthèse d'ARN ribosomiaux.

- Le cisplatine est un complexe organométallique qui se fixe sélectivement sur les bases puriques de l'ADN (A ou G) et induit une variation de la conformation locale du double brin d'ADN empêchant la transcription. Ceci a pour conséquence finale la mort de la cellule.

Au moment de l'exérèse chirurgicale, la sensibilité de la tumeur à la chimiothérapie pré-opératoire est déterminée par l'appréciation du pourcentage de cellules tumorales résiduelles sur la pièce de résection (Figure 21). Cette analyse se révèle être un facteur pronostique en corrélation avec la survie globale du patient. La nécrose tumorale est évaluée par la classification mondialement reconnue et établie en 1977 par Huvos ¹¹³ qui détermine le pourcentage moyen de cellules viables sur la pièce opératoire. Un patient est considéré comme « bon répondeur » à un traitement néoadjuvant lorsque 90 à 95 % de nécrose est observé sur la pièce de résection ¹¹¹. Un patient présentant une bonne réponse lors du protocole de chimiothérapie pré-opérative recevra le même traitement en post-opératoire alors qu'un mauvais répondeur se verra augmenter ses doses de médicaments ou proposer un autre protocole. La combinaison chimiothérapie d'induction, chirurgie et chimiothérapie adjuvante a transformé le pronostic de cette lésion auparavant gravissime. En effet, le taux de survie est maintenant de 70% à 5 ans pour les formes localisées mais reste cependant faible (20%) lorsque des métastases pulmonaires sont détectées au moment du diagnostic ¹¹⁴.

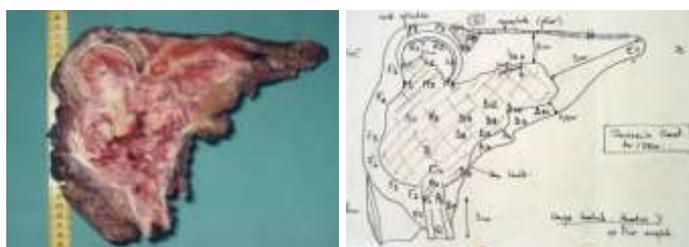


Figure 21 : Exemple d'analyse pour l'estimation du nombre de cellules tumorales résiduelles sur une pièce de résection d'un ostéosarcome de la hanche. Photo du service d'orthopédie du CHU Hotel Dieu de Nantes (Pr Gouin).

Cependant, une absence de réponse aux drogues anti-tumorales est encore observée et demeure un problème majeur conduisant au développement de métastases puis au décès du patient. De plus, les séquences de traitement, les hospitalisations répétées font de la chimiothérapie un traitement difficile à supporter, dégradant la qualité de vie du patient. Enfin, ces molécules présentent un certain nombre de limites, à savoir :

- des effets secondaires sur les tissus sains. Ces molécules n'étant pas spécifiques des cellules tumorales, elles entraînent à court et à long terme des effets toxiques sur les tissus sains. A court terme, les patients présentent des nausées voir des vomissements, une mort de cellules à forte réplication

entraînant une perte des cheveux, une aplasie médullaire. A long terme, les fortes doses d'ifosfamide peuvent entraîner une infertilité, l'utilisation du VP16 peut induire des leucémies secondaires, enfin la doxorubicine est toxique pour le cœur. Les patients ayant reçu une chimiothérapie peuvent également présenter une toxicité rénale, une puberté retardée, des dérégulations endocriniennes (thyroïde), une croissance retardée. Tous ces effets secondaires peuvent entraîner un mal-être psychologique non négligeable.

- un développement de phénomènes de résistance dus à la diminution de l'accumulation intracellulaire des médicaments, à l'activation des mécanismes de réparation, à la modification de la cible des médicaments anticancéreux, à la modification de l'expression des gènes et enfin au phénomène de résistance multi-drogues (MDR).

- les éventuelles récidives. En cas de récidive, les patients considérés comme des bons répondeurs lors de la première intervention recevront le traitement à plus haute dose des mauvais répondeurs. Cependant un cas d'ostéosarcome ne répondant pas bien aux protocoles de chimiothérapie sera traité par de la radiothérapie ou par de nouvelles molécules en essais cliniques lors de la rechute.

L'ensemble de ces données montre l'évolution apportée par la polychimiothérapie dans le traitement des ostéosarcomes en terme de survie mais met également en évidence l'agressivité de ce genre de traitement qui nécessite de fortes doses d'agent cytostatique ayant beaucoup d'effets secondaires. De plus, certains patients ne répondent pas du tout à ce genre de traitement et/ou présentent des rechutes. C'est pourquoi de nouvelles stratégies sont développées afin d'améliorer le bien être du patient et la réponse au traitement tout en diminuant les doses de chimiothérapie.

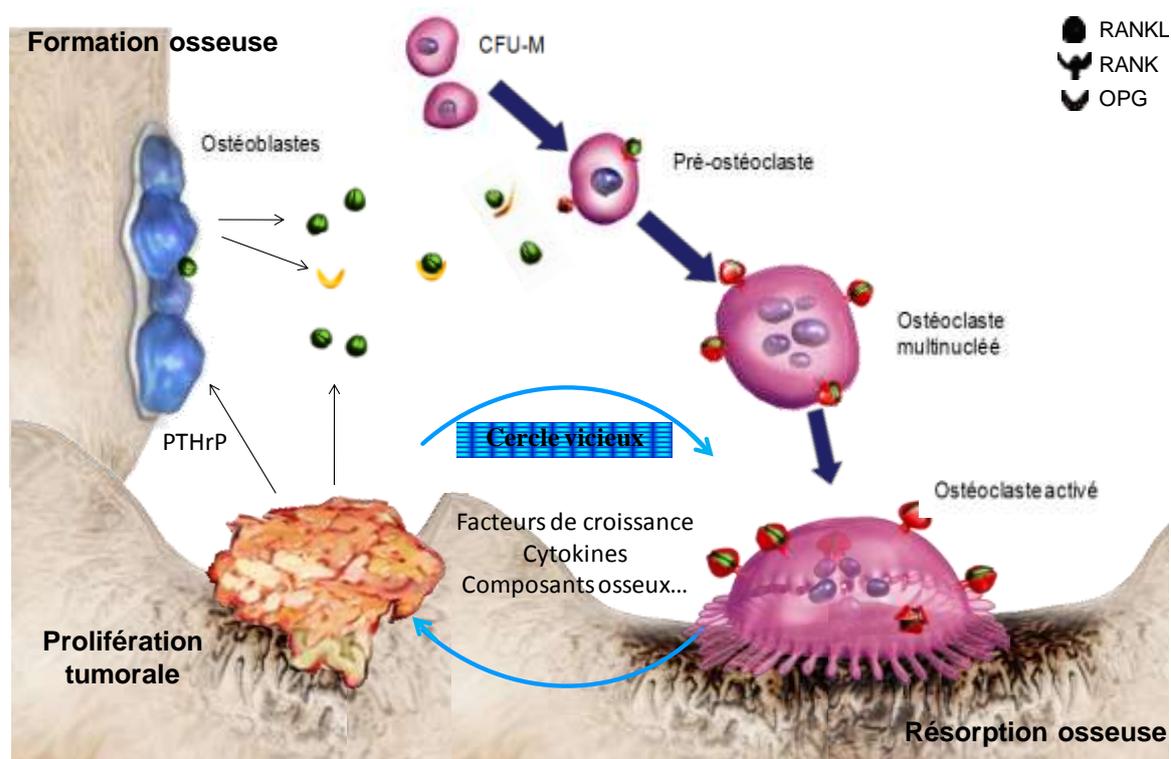


Figure 22 : Cercle vicieux entre prolifération tumorale et hyper-résorption osseuse d'origine maligne. Entre résorption et prolifération tumorale s'instaure un cercle vicieux dans lequel des facteurs de croissance libérés de la matrice lors de l'hyper-résorption osseuse stimulent l'activité et la prolifération des cellules tumorales, qui à leur tour produisent des facteurs qui vont activer la résorption osseuse (PTHrP ou RANKL), directement ou via les ostéoblastes. Adapté de Wittrant et al. ¹¹⁵ avec les représentations cellulaires d'Amgen.

3.1. Le cercle vicieux : développement tumoral en site osseux et ostéolyse

Le développement d'une tumeur en site osseux s'accompagne d'un important remodelage de l'os adjacent à la tumeur. Ainsi des lésions ostéolytiques et/ou ostéocondensantes ont pu être mises en évidence par rayons X dans le cadre de métastases osseuses, lésions qui sont également retrouvées dans le cas du développement d'un ostéosarcome.

Les analyses histologiques ont montré que cette résorption osseuse était due non pas à une action directe des cellules tumorales mais à la suractivation des ostéoclastes. En effet, les cellules tumorales sécrètent des facteurs pro-résorptifs conduisant à l'activation des précurseurs ostéoclastiques, l'ostéolyse qui en résulte libère des facteurs de croissance stockés jusqu'alors dans le tissu osseux, facteurs bénéfiques au développement tumoral. Ainsi le microenvironnement osseux favoriserait la mise en place d'un cercle vicieux qui s'établit entre la résorption osseuse et la croissance tumorale ⁸³, étape cruciale pour l'initiation et le développement de tumeurs osseuses (Figure 22 ci-contre).

Les cellules tumorales peuvent notamment sécréter le PTH-rP (PTH-relatide peptide) qui stimule la biologie des ostéoclastes via la sécrétion de RANKL par les cellules ostéoblastiques ¹¹⁶. Certaines cellules tumorales comme dans le cas des métastases osseuses du cancer de la prostate ¹¹⁷, le myélome multiple ¹¹⁸, les neuroblastomes ¹¹⁹ ou encore les cellules de carcinome ¹²⁰ expriment directement la cytokine pro-résorptive RANKL. Dans le cadre de l'ostéosarcome, la production de RANKL directement par les cellules tumorales n'a pas été clairement mise en évidence ; cependant des études montrent qu'un blocage de RANKL dans le microenvironnement tumoral par des récepteurs solubles inhibe l'ostéolyse para-tumorale et ralentit le développement de l'ostéosarcome ^{121,122}. De plus, dans le modèle d'ostéosarcome ostéolytique de souris POS-1, les analyses immunohistochimiques ont révélé la présence de RANKL dans le tissu tumoral ¹²². Au sein du microenvironnement tumoral, les cellules productrices de RANKL peuvent donc être les cellules tumorales elles-mêmes, les cellules stromales ou les ostéoblastes ¹²³.

En retour, la résorption osseuse libère des facteurs de croissance pouvant à leur tour activer la prolifération tumorale. On y retrouve notamment le TGF β ¹²⁴, très abondant dans la matrice osseuse, mais aussi les BMPs ¹²⁵.

3.2. Inhibition de l'ostéolyse para-tumorale : nouvelle stratégie thérapeutique de l'ostéosarcome ?

Etant donné que la résorption osseuse au niveau du site tumoral contribue au développement des tumeurs, un moyen de pouvoir abolir le cercle vicieux serait de protéger l'os adjacent de cette dégradation afin de ralentir la progression de l'ostéosarcome. Ainsi, différentes stratégies ont été mises au point de manière à inhiber l'ostéolyse para-tumorale en inhibant l'activité des ostéoclastes ou en piégeant les facteurs solubles pro-résorptifs tels que la PTH-rP ou RANKL (effecteur final de l'activation des ostéoclastes).

3.2.1. Inhibition de l'activité biologique des ostéoclastes

Une première possibilité consiste à inhiber les voies de signalisation et/ou les fonctions impliquées dans l'activation des ostéoclastes en utilisant des inhibiteurs :

- de la cathepsine K (enzyme impliquée dans la dégradation de la matrice de collagène) ¹²⁶
- de la tyrosine kinase SRC (impliquée dans la formation et le déplacement des ostéoclastes) ¹²⁷
- de p38 mitogen-activated protein kinase (impliquée dans la transmission des signaux de transduction permettant l'expression de facteurs pro-résorptifs) ¹²⁸
- du protéasome (inhibition de l'ostéoclastogénèse par blocage de la voie de signalisation assurée par NFκB) ¹²⁹

A l'heure actuelle, les bisphosphonates constituent la classe d'agents anti-résorption la plus efficace et la plus utilisée dans le traitement de l'ostéoporose. Ces molécules sont en effet le traitement de référence en terme de prévention des fractures chez la femme ostéoporotique ¹³⁰. Ils sont également utilisés pour des hypercalcémies associées aux pathologies osseuses métaboliques ou aux ostéolyses tumorales ¹³¹. Ce sont des analogues synthétiques du pyrophosphate endogène (PPi), leur structure P-C-P leur confère la capacité de se fixer aux ions divalents tels que le Ca²⁺ leur permettant une fixation spécifique à la surface osseuse *in vivo* aux sites de remodelage actif et en particulier aux sites de résorption ostéoclastique ¹³².

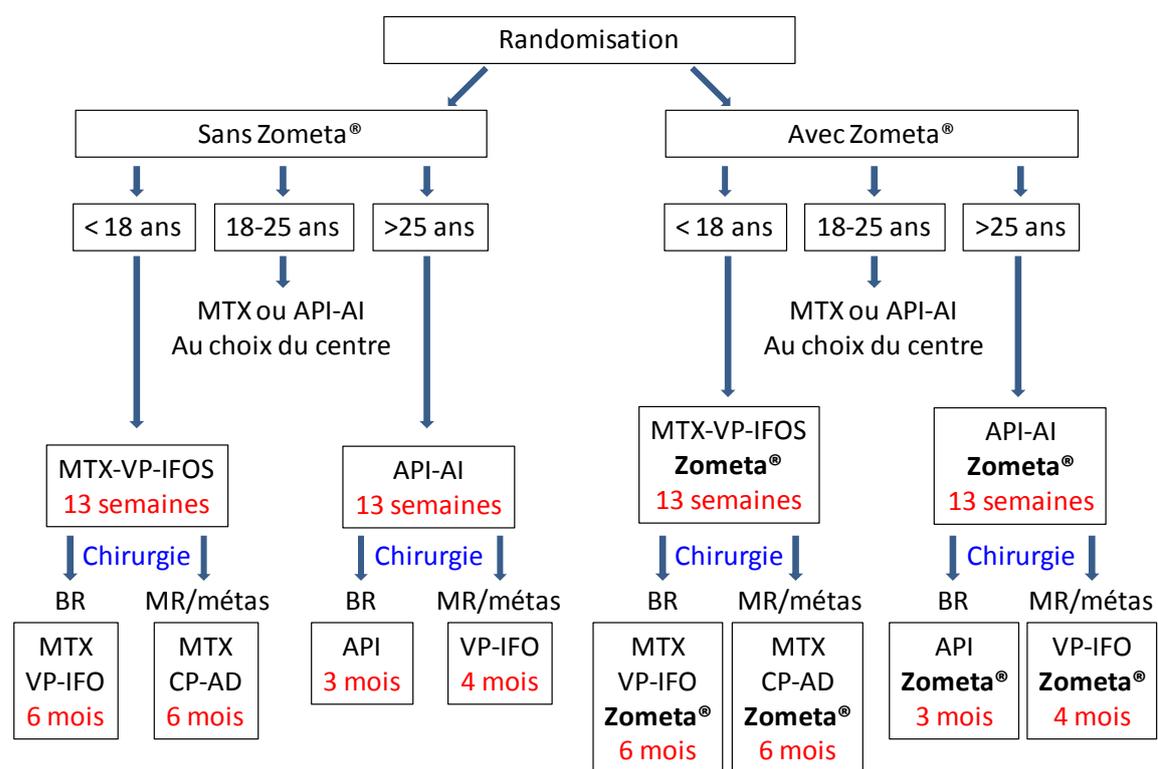


Figure 23 : Schéma de prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome dans le protocole OS2006 associant traitement conventionnel et acide zolédonique (Zometa®). D'après la Réunion « Echantillons et recherche » du 25 Juin 2010 au CHU Hotel Dieu, Nantes.

L'acide zolédronique est un bisphosphonate de 3^{ème} génération contenant un atome d'azote (génération considérée comme la plus efficace à l'heure actuelle). L'acide zolédronique inhibe l'activité des ostéoclastes en ciblant une enzyme clef de la voie du mévalonate : la farnésyl diphosphate synthase (FPPs). En inhibant la FPPs, l'acide zolédronique perturbe le bon déroulement de voies de signalisation essentielles à l'activité des ostéoclastes notamment en empêchant la prénylation des petites GTPases ¹³³. Il induirait également la mort par apoptose de ces cellules par accumulation du substrat de la FPPs capable d'activer l'adénine nucléotide translocase composant les pores de perméabilité mitochondriale ¹³⁴. Dans des modèles animaux d'ostéosarcome, l'injection d'acide zolédronique permet de diminuer l'ostéolyse para-tumorale, d'augmenter significativement le taux de survie des animaux traités et d'inhiber la dissémination métastatique en site pulmonaire ¹³⁵. La combinaison de ce bisphosphonate avec un agent de chimiothérapie tel que l'ifosfamide a permis d'augmenter les effets thérapeutiques obtenus avec chacune des molécules seules en terme de rechute, de réparation tissulaire et d'ostéolyse para-tumorale ¹³⁶. Cette association de l'acide zolédronique à la chimiothérapie conventionnelle est actuellement testée dans un essai clinique de phase III chez l'Homme (protocole OS2006, Figure 23).

3.2.2. Inhibition de RANKL

RANKL étant la cytokine pivot dans l'activation de l'ostéoclastogénèse et de la survie des ostéoclastes matures, et ayant été montrée comme surexprimée dans le cas d'un développement tumoral en site osseux, plusieurs études visent à bloquer son action sur son récepteur RANK afin d'inhiber la résorption osseuse para-tumorale. Ainsi, plusieurs études ont été menées pour évaluer l'efficacité et les potentiels effets thérapeutiques de l'inhibition de RANKL ¹¹⁵.

En se liant à RANKL, l'OPG ou les peptides mimétiques dérivés ¹³⁷ permettent de prévenir le développement de lésions ostéolytiques dans des modèles animaux de myélome multiple ^{118,138}, d'adénocarcinome du côlon, de métastases osseuses du cancer du sein ¹³⁹, de la prostate ¹¹⁷, du poumon et d'ostéosarcomes ¹²². L'introduction d'OPG dans des cultures de précurseurs ostéoclastiques *in vitro* inhibe l'ostéoclastogénèse. *In vivo*, cette inhibition se traduit par une diminution des lésions ostéolytiques associées au développement tumoral en site osseux, un ralentissement

de la progression tumorale pouvant aller jusqu'à une réponse complète avec disparition totale de la tumeur, et une augmentation significative de la survie des animaux traités. Ainsi dans le modèle d'ostéosarcome syngénique ostéolytique de souris POS-1, l'OPG a été administrée par transfert de gène non viral dans le muscle controlatéral lors d'un traitement préventif (la première injection étant réalisée 7 jours avant implantation de l'ostéosarcome). Dans cette étude, seuls 2 animaux sur 6 ont développé un ostéosarcome prolifératif contre 5 animaux sur 6 dans le groupe contrôle. Ces deux animaux présentaient des ostéosarcomes de volumes nettement inférieurs aux tumeurs non traitées. Ce ralentissement du développement des ostéosarcomes était associé à une diminution des lésions ostéolytiques, ceci ayant pour conséquence une augmentation du taux de survie (70% versus 15%, 28 jours après induction de la tumeur) ¹²². Les mêmes résultats ont été obtenus après transfert d'un plasmide codant la molécule RANK-Fc dans ce même modèle et avec le même protocole préventif ¹²¹. Dans le modèle d'ostéosarcome de rat OSRGA mixte, c'est-à-dire ayant une composante ostéolytique et ostéocondensante (formation d'os anormal directement par les cellules tumorales ¹³⁶), l'administration d'OPG par des vecteurs adénoviraux lors d'un traitement non pas préventif mais curatif, a montré des résultats plus encourageants. En effet, l'analyse de la microarchitecture osseuse montre une inhibition de la formation d'os ectopique comparativement au groupe contrôle. Le suivi de l'évolution du volume tumoral témoignait d'une répression complète du développement de l'ostéosarcome après traitement, et ce pour l'ensemble des animaux traités ¹²². Ces études montrent l'importance de l'ostéolyse dans la prise et le développement des tumeurs osseuses. Cependant, ces effets thérapeutiques restent limités au microenvironnement osseux puisque la prolifération de cellules issues de lignée de cancer de prostate injectées en sous cutané n'est pas ralentie par une administration d'OPG recombinante comparativement à une injection intra-osseuse de cellules tumorales ¹¹⁷.

Le denosumab® (AMG 162, Amgen) est un anticorps monoclonal humanisé ciblant RANKL humain. A l'origine développé pour le traitement de l'ostéoporose, cet anticorps a rapidement été proposé dans le traitement des tumeurs osseuses ou associées à des désordres osseux, notamment au vue des résultats obtenus avec les récepteurs solubles de RANKL. Il est actuellement testé dans 36 essais cliniques dont 17 sur des patients présentant des métastases osseuses. Cette molécule basée sur la structure d'une immunoglobuline G2 présente une durée de vie longue dans la circulation sanguine et une diminution rapide de la résorption osseuse chez des patients présentant une ostéoporose mais aussi chez des patients atteints de tumeurs

osseuses comme le myélome multiple ou des métastases osseuses et ce après une seule injection par voie sous cutanée ^{140,141}.

3.3. Développement de siRNAs à visée thérapeutique ciblant RANKL dans l'ostéosarcome

Le rôle pivot de la cytokine pro-résorptive RANKL dans l'activation et le maintien de l'ostéolyse para-tumorale fait de cette protéine une cible très attractive pour le développement de nouvelles stratégies de thérapie des ostéosarcomes. La découverte des molécules de l'ARN interférence tels que les siRNAs offre de nouvelles perspectives thérapeutiques par inhibition spécifique d'un transcrit donné. Une nouvelle stratégie consisterait donc non plus à piéger RANKL dans le microenvironnement tumoral mais à inhiber directement son expression par des siRNAs ciblant son ARNm. Malgré les nombreuses investigations menées en oncologie, seules quelques études ont montré l'efficacité de molécules de types siRNAs dans des modèles de tumeurs osseuses primitives, ces molécules ciblant principalement l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire ou l'apoptose ¹⁴²⁻¹⁴⁵. C'est pourquoi, afin de mettre au point un protocole optimal d'injection *in vivo* de siRNAs ciblant une protéine du microenvironnement tumoral dans des modèles murins d'ostéosarcome, mon travail de thèse a consisté à cibler dans un premier temps la production d'un gène rapporteur (la luciférase) détectable et quantifiable par des techniques d'imagerie optique par bioluminescence. Dans un second temps, le protocole d'injection de siRNAs ainsi développé a été utilisé en visant la cytokine pro-résorptive Rankl, surexprimée dans le microenvironnement tumoral, dans deux modèles murins d'ostéosarcome : le modèle ostéolytique de souris POS-1 et le modèle mixte de rat OSRGA.

L'utilisation des molécules inhibant la résorption osseuse a montré l'importance de l'ostéolyse para-tumorale dans le développement tumoral en site osseux. Cependant, ces molécules ne peuvent remplacer complètement les bénéfices de la chimiothérapie en particulier dans la répression des métastases de l'ostéosarcome, c'est pourquoi elles sont combinées au traitement conventionnel de ce type de tumeur dans les études cliniques (protocole OS2006). Dans cette optique, la prévention de l'ostéolyse para-tumorale par les siRNAs ciblant Rankl a également

été testée en association avec un agent de chimiothérapie conventionnelle (l'ifosfamide).

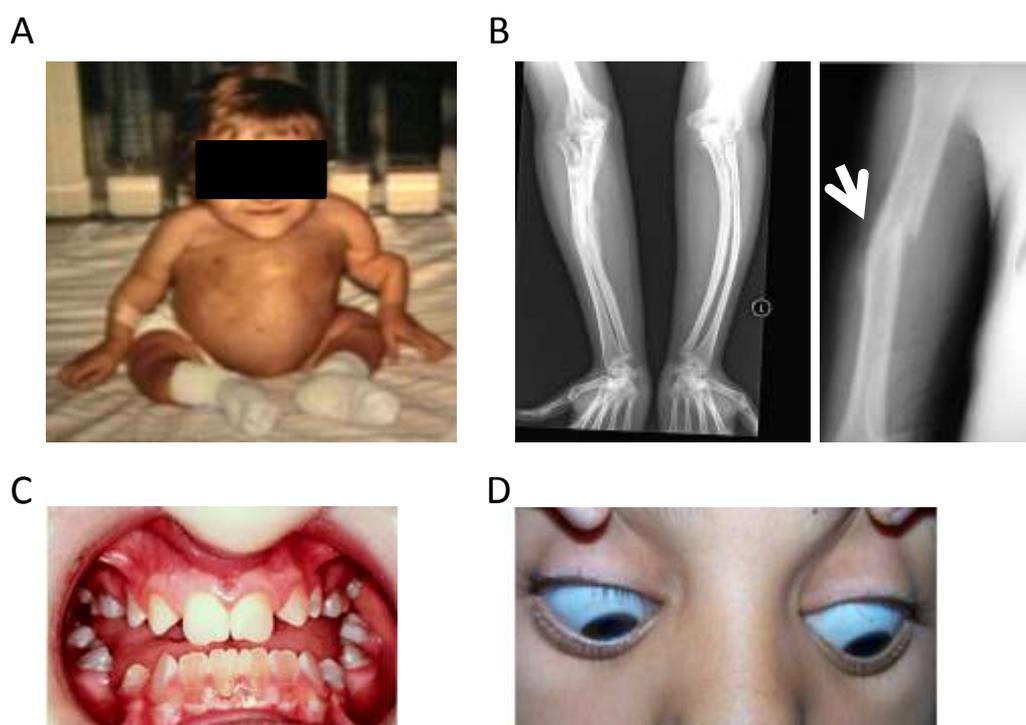


Figure 24 : Signes cliniques observés chez les patients atteints d'ostéogénèse imparfaite. (A) Exemple de déformation visible du bras gauche, d'après <http://www.pathguy.com/lectures/bones.htm>. (B) Mise en évidence de déformations osseuses ou de fractures par rayons X. D'après l'encyclopédie en ligne Wikipedia et l'étude de Major et al. ¹⁴⁶. Les patients peuvent également présenter une dentinogénèse imparfaite (C, d'après Kindelan et al ¹⁴⁷) et des sclérotiques bleues (D, Manu Varshney et al ¹⁴⁸).

4. L'ostéogenèse imparfaite

En dehors de l'ostéolyse induite par une suractivation des ostéoclastes, que ce soit dans le cadre du développement tumoral en site osseux ou d'une maladie métabolique telle que l'ostéoporose, la fragilité osseuse peut également être due à un défaut de production de la matrice extracellulaire composant le tissu osseux. C'est le cas de l'ostéogenèse imparfaite caractérisée par un défaut quantitatif et/ou qualitatif du collagène de type I, composant essentiel de la matrice organique de toute pièce osseuse. Cette pathologie plus connue sous le nom de « maladie des os de verre » est une maladie génétique à caractère dominant impliquant les gènes codant les chaînes alpha du collagène de type I.

4.1. Epidémiologie et classification

Le terme d'ostéogenèse imparfaite (OI) regroupe un ensemble d'affections héréditaires de gravité variable caractérisées par une fragilité osseuse excessive. Les signes cliniques sont très variables et inconstants. Ils comprennent une ostéoporose congénitale, une dentinogenèse imparfaite, un visage triangulaire, une petite taille, une surdité tardive et surtout des sclérotiques bleues (membrane externe du globe oculaire qui normalement est de couleur blanche) qui constituent un signe très important pour le diagnostic positif, mais qui n'est pas toujours retrouvé chez tous les patients (Figure 24 ci-contre). Cette pathologie se caractérise par un défaut qualitatif de la matrice de collagène entraînant des complications osseuses comme des fractures à répétition consécutives à des chocs minimes, des déformations des membres, du thorax et du squelette, un relâchement excessif des ligaments ¹⁴⁹.

L'incidence de cette pathologie est évaluée à 1 pour 15000-20000 individus et touche de manière égale les différentes populations ethniques. Bien que considérée comme rare, l'OI représente le plus fréquent des désordres génétiques affectant l'os ¹⁵⁰.

Les différentes formes d'ostéogenèse imparfaite sont classées en 4 sous

groupes selon leurs caractéristiques cliniques, radiologiques et génétiques et ce depuis 1979 ¹⁵¹ :

- L'OI de type I est la forme la moins sévère qui se caractérise par des fractures occasionnelles des os longs, principalement pendant la période pré pubère, et une légère déformation du squelette entraînant une taille légèrement plus petite qu'en absence de maladie ¹⁵². Selon les cas, les patients atteints d'ostéogenèse de type I présentent ou non un problème de dentinogenèse. Cependant, les jeunes adultes finissent par présenter une perte auditive due à la fusion des petits os de l'oreille ¹⁵³.

- L'OI de type II est la forme la plus sévère, souvent létale pendant le développement prénatal. En effet, les enfants présentent une forte déformation des os longs et du thorax ainsi que des fractures *in utero*. A cause de cette malformation du thorax, empêchant le bon développement des poumons, ils présentent une insuffisance respiratoire qui est le plus souvent à l'origine du décès. Ainsi 60% des nouveaux nés présentant une OI de type II décèdent dans les premiers jours de la vie et 80% dans le premier mois suite à une infection pulmonaire ou une insuffisance cardiaque. Les signes extérieurs caractéristiques de cette forme d'OI sont les sclérotiques bleues, un nez crochu et une boîte crânienne molle ¹⁵⁴.

- Les patients atteints d'une OI de type III présentent des fractures fréquentes, une tension musculaire au niveau de certains os entraînant une déformation progressive. Ils sont le plus souvent de petite taille (à cause de plaque de croissance désorganisée ¹⁵⁵), présentent une face triangulaire, des sclérotiques bleues et une dentinogenèse imparfaite. Les déformations sont associées à une insuffisance au niveau du système cardio-pulmonaire, insuffisance amplifiée par des scoliozes, ce qui constitue une cause de décès.

- Le type IV regroupe des individus dont le phénotype varie entre léger (type I) à sévère (type III) en terme de déformation squelettique. Ils présentent également des fractures sur les os longs tout au long de leur vie mais leur incidence diminue après la puberté. Ils peuvent avoir une dentition anormale et des sclérotiques bleues, leur taille n'est pas affectée à la naissance mais leur croissance est tout de même légèrement ralentie ¹⁵⁶.

Au niveau génétique, le type I est caractérisé par une mutation « nulle » (la protéine produite n'étant pas incorporée dans la molécule de collagène ¹⁵⁷), alors que les types II à IV sont eux associés à une mutation dominante négative dans l'un

Sillence type	Clinical severity	Mutated gene	Mode of inheritance
I	Mild-non deforming	<i>COL1A1/2</i>	AD
II	Perinatal lethal	<i>COL1A1/2</i>	AD
III	Severely deforming	<i>COL1A1/2</i>	AD
IV	Moderately deforming	<i>COL1A1/2</i>	AD
V	Moderately deforming	Unknown	AD
VI	Moderately to severely deforming	Unknown	AR
VII	Moderately deforming	<i>CRTAP</i>	AR
VIII	Severely deforming to perinatal lethal	<i>LEPRE1</i>	AR

Tableau 3 : Classification des ostéogenèses imparfaites. AD : autosomique dominante, AR : autosomique récessive. D'après Van Dijk et al ¹⁵⁸.

de ces deux gènes (mutation ponctuelle, perte d'un exon, délétions, insertions) conduisant à la production d'une chaîne mutée modifiant la conformation tridimensionnelle de la molécule de collagène. Récemment, un 5^{ème} et un 6^{ème} groupe d'OI ont été décrits (types V ¹⁵⁹ et VI ¹⁶⁰) car présentant des symptômes osseux tels que des callosités hypertrophiques et une ossification précoce de la membrane interosseuse au niveau des avant-bras et des jambes identiques au type IV. Cependant, ces types V et VI ne sont pas reliés à une quelconque altération des gènes du collagène de type I. La séparation de ces deux types d'ostéogenèse imparfaite s'explique par les anomalies de migration électrophorétique du collagène de type I pour les ostéogenèses imparfaites de type VI ¹⁶⁰. De plus, l'OI de type V est considérée comme autosomale dominante alors que celle de type VI serait récessive. Enfin, plusieurs études ont montré l'implication de mutations dans d'autres gènes que les gènes du collagène de type I comme *LEPRE1* (codant la prolyl 3-hydroxylase 1) ou *CRTAP* (cartilage-associated protein) qui participent aux modifications post-traductionnelles des molécules de collagène ¹⁶¹⁻¹⁶⁴. Ces mutations ayant été associées à des phénotypes d'ostéogenèse imparfaite, deux nouveaux types (VII et VIII) ont ainsi été ajoutés dans la classification des ostéogenèses imparfaites (Tableau 3 ci-contre) ¹⁵⁸.

4.2. Problématique biologique de l'ostéogenèse imparfaite

L'ostéogenèse imparfaite est une affection génétique à caractère dominant ayant pour origine une mutation d'un des gènes *COL1A1* ou *COL1A2* codant les chaînes alpha 1 et alpha 2 du collagène de type I produit par les ostéoblastes ¹⁶⁵.

Le collagène de type I représente 90 % du collagène d'un vertébré. Il constitue la trame de l'os (à comparer aux armatures du béton armé), et plus généralement des tissus conjonctifs. Il intervient dans la formation de la peau, des tendons, des os et de la cornée. Cette glycoprotéine fibreuse forme une triple hélice composée de l'association de 2 chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$ codées respectivement par les gènes *COL1A1* et *COL1A2* situés sur les chromosomes 7 et 17. Ces chaînes polypeptidiques sont synthétisées au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux de l'ostéoblaste. Elles subissent ensuite des hydroxylations et des glycosylations avant de s'associer en hélices (Figure 25A au dos de cette page).

Ces molécules sont excrétées par exocytose et s'accumulent de manière à former un réseau fibreux caractéristique et organisé. Le déploiement des fibres de collagène dans l'espace extracellulaire s'accompagne du clivage des peptides d'extension aux extrémités amino- et carboxyterminales, ainsi que de la formation de pontages. Dans le tissu osseux, les fibres collagéniques ainsi formées sont associées à des protéines non collagéniques permettant la minéralisation par fixation des cristaux d'hydroxyapatite, minéralisation indispensable au maintien de la dureté des os (Figure 25B). Un déficit d'expression du collagène, comme c'est le cas chez les patients atteints d'une ostéogenèse imparfaite de type I, entraîne donc une fragilité osseuse. En effet, dans ce cas, les mutations sont associées à une perte d'expression du transcrite codé par un des deux allèles ce qui divise par deux la quantité d'ARNm et donc de protéine produite. Cette diminution quantitative du collagène de type I altère l'architecture et la « solidité » de l'os ¹⁶⁷.

La conformation de la triple hélice est possible grâce à la répétition d'un motif d'acides aminés : Glycine-X-Y (où X et Y sont le plus souvent une proline et une hydroxyproline). Cette glycine présente tous les 3 amino acides est nécessaire à la formation et la stabilisation de l'hétérotrimère formant la molécule de collagène. Les mutations retrouvées dans les OI de types II à IV sont le plus souvent associées à la substitution d'une glycine par un autre acide aminé (85% des OI, ¹⁶⁵), la chaîne $\alpha 1$ étant la plus fréquemment mutée. Dans ce cas la triple hélice de collagène est perturbée par l'incorporation d'une chaîne mutée ¹⁶⁸ (Figure 26).

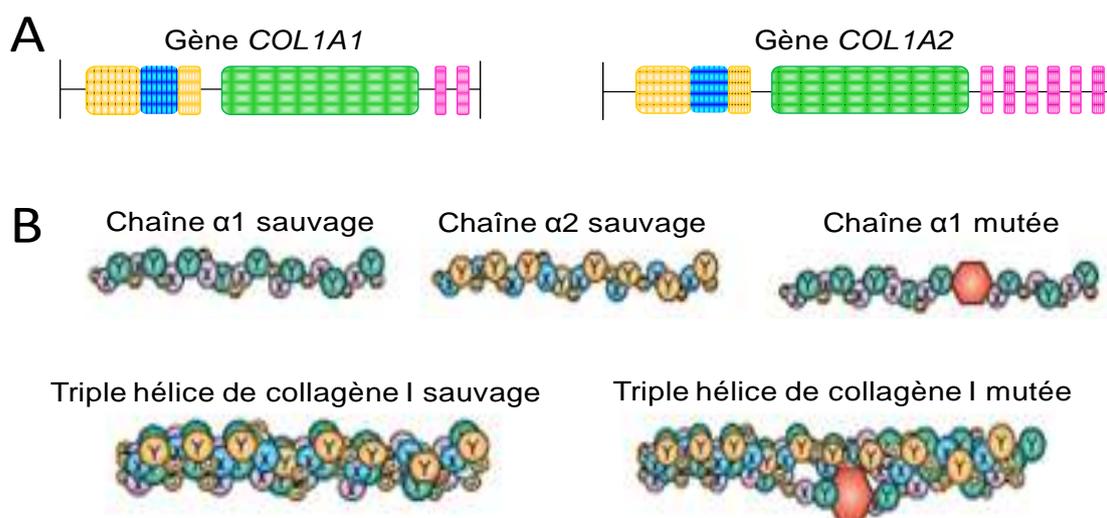


Figure 26 : Représentation schématique des gènes COL1A1 et COL1A2 et structure du collagène de type I sauvage ou muté. (A) Sont indiqués : promoteur (jaune), TATA box (bleue), 52 exons et introns (rose), région 3'-UTR c'est-à-dire région non traduite (ligne verte). (B) La triple hélice de collagène de type I est constituée de deux chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$. Le tétramère rouge dans la triple hélice de collagène I

mutée représente la substitution d'une glycine qui déstabilise l'intégrité de la triple hélice. D'après Millington-Ward et *al.*

Un nombre croissant de mutations associées à un phénotype d'OI ont été décrites et se comptent par centaines (voir liste sur www.le.ac.uk/genetics/collagen). Les molécules de glycine ayant un rôle central dans le repliement de la protéine de collagène, les mutations répertoriées dans des cas d'OI sont le plus souvent associées à la substitution d'une glycine.

La relation entre génotype et phénotype n'est pas complètement comprise. Il est tout de même admis qu'un défaut qualitatif est toujours plus sévère qu'un défaut quantitatif. De plus, la position et la nature de la mutation au sein de la séquence codante, ainsi que le rôle biologique de la chaîne mutée, auraient également un impact sur la gravité des symptômes ¹⁶⁹. Ainsi le gradient de sévérité augmenterait au fur et à mesure que la position de la mutation se rapproche de l'extrémité C-terminale dans le cas de mutation sur la chaîne $\alpha 1$ codée par *COL1A1* ¹⁷⁰, mais pas dans le cas des mutations concernant le gène *COL1A2*.

4.3. Diagnostic

Le diagnostic dépend de l'âge considéré. Le diagnostic anténatal d'un déficit osseux repose sur l'échographie complétée par une radiographie. Cette échographie permet de mettre en évidence des anomalies de longueur des os des membres et du squelette et une trop bonne visibilité de l'encéphale témoignant d'une boîte crânienne molle. Les radiographies permettent de confirmer ces anomalies.

A la naissance, l'OI peut être facilement diagnostiquée, mais elle peut aussi passer inaperçue jusqu'à ce que l'enfant présente des difficultés à la marche (en effet, les fractures d'âge différent dans la période néonatale et pendant l'enfance peuvent évoquer une maltraitance de l'enfant à défaut d'une OI). Un abaissement de la densité minérale osseuse mesurée par densitométrie biphotonique à rayons X, est dans ce contexte, un moyen qui pourrait aider à trancher en faveur de fractures par fragilité osseuse plutôt que par mauvais traitements ¹⁷².



Figure 27 : Stabilisation chirurgicale du membre inférieur par introduction d'une tige intramédullaire (système télescopique de Sheffield) chez un patient atteint d'ostéogenèse imparfaite. Radiographies pré-opératoires des tibias droit (A) et gauche (B) et post-opératoire (C). D'après Wilkinson et al, 171.

Pour le petit enfant, d'autres diagnostics différentiels sont également utilisés : l'ostéopathie d'immobilisation, l'ostéopathie du prématuré, le rachitisme carenciel ou une hémopathie. Chez le grand enfant, l'association de fractures et d'une ostéoporose est un diagnostic facile lorsque s'y associe une maladie connue telle que la leucémie ¹⁷².

4.4. Prise en charge de l'OI par des traitements palliatifs

Les traitements actuels ne visent pas la cause génétique de la pathologie mais s'efforcent d'améliorer les conditions de vie des patients. La prise en charge de ces patients ne peut se concevoir que dans un cadre multidisciplinaire visant à contrecarrer l'ensemble des symptômes de l'OI. Elle débute parfois dès la naissance et fait appel à une rééducation fonctionnelle adaptée traitant autant l'éveil de l'enfant que la fracture.

Les différentes techniques orthopédiques ou chirurgicales permettent la réduction des fractures et la correction des déformations. Le bilan pré-opératoire, en particulier pulmonaire, est essentiel pour les OI de types III et IV. La prise en charge chez l'enfant fait appel à l'enclouage télescopique qui est une technique chirurgicale actuellement bien codifiée ou encore l'insertion dans le fût fémoral ou tibial d'une tige consolidatrice (Figure 27 ci-contre), l'os autour de la tige reste cependant très fragile ¹⁶⁸. Cette consolidation peut également se faire au niveau de la colonne vertébrale. Le traitement des déformations du rachis dépend de l'angle de la scoliose. Après une fracture ou en post-opératoire, une immobilisation trop longue n'est pas souhaitable et une rééducation doit toujours être entreprise. Le traitement des fractures doit avoir pour objectif, chez l'enfant comme chez l'adulte, la reprise d'une autonomie la plus complète et la plus rapide possible.

Trop souvent immobilisés et protégés de l'environnement extérieur, les enfants comme les adultes atteints d'OI souffrent facilement de carence en vitamine D et en calcium. Une prévention de l'insuffisance vitamino-calcique est donc particulièrement nécessaire, utilisant des posologies de l'ordre de 500 mg à 1 000 mg de calcium et de 400 à 800 UI de vitamine D par jour. Ces différents traitements ne sauraient faire oublier le soulagement des douleurs très fréquentes chez ces patients.

Ces douleurs peuvent être la conséquence des déformations et des atteintes dégénératives elles aussi fréquentes. Elles sont soulagées par un traitement symptomatique dont l'efficacité ne diffère pas de celle qu'on obtient chez les patients non atteints de la maladie.

Avec l'utilisation des bisphosphonates qui ont remplacé des traitements médicamenteux empiriques sans grande efficacité, le fait d'inhiber la dégradation osseuse physiologique par les ostéoclastes a permis de diminuer les douleurs et l'incidence des fractures d'abord dans des modèles animaux ¹⁷³ puis chez le patient. Ces traitements via les bisphosphonates (pamidronate ¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ ou alendronate ¹⁷⁷) offrent ainsi un véritable progrès thérapeutique. L'efficacité des traitements est évaluée par la mesure de la densité osseuse (voir chapitre diagnostique), et par le dosage biochimique des marqueurs du remodelage osseux. En effet, un abaissement du taux du 25-hydroxyvitamine D sérique est souvent observé. Sont également suivis les taux d'expression de l'ostéocalcine, des phosphatases alcalines, ainsi que les peptides de collagène.

Cependant, les bisphosphonates ne permettent de traiter que les symptômes et non pas la cause de la maladie c'est-à-dire un défaut de collagène fonctionnel. De plus, certains effets néfastes ont été observés lors de l'administration de pamidronate. En effet, la première injection peut s'accompagner de fièvre et de nausées. En supprimant la résorption osseuse, ces agents pourraient avoir un effet sur la croissance mais aussi entraîner l'accumulation de micro-dommages dans le tissu osseux (normalement éliminés par les ostéoclastes et remplacés par une nouvelle matrice par les ostéoblastes) ou encore empêcher la cicatrisation naturelle des fractures ^{178,179}. C'est pourquoi de nouvelles approches thérapeutiques sont envisagées.

4.5. Nouvelles stratégies de thérapie

Devant les limites des traitements palliatifs de l'OI, de nouvelles stratégies sont actuellement testées en ciblant la cause même de la pathologie, à savoir le défaut quantitatif et/ou qualitatif en protéine de collagène fonctionnelle. Premièrement, des protocoles de thérapie cellulaire ont été imaginés, notamment via l'utilisation de cellules souches issues de la moelle osseuse totale ou de cellules isolées telles que les

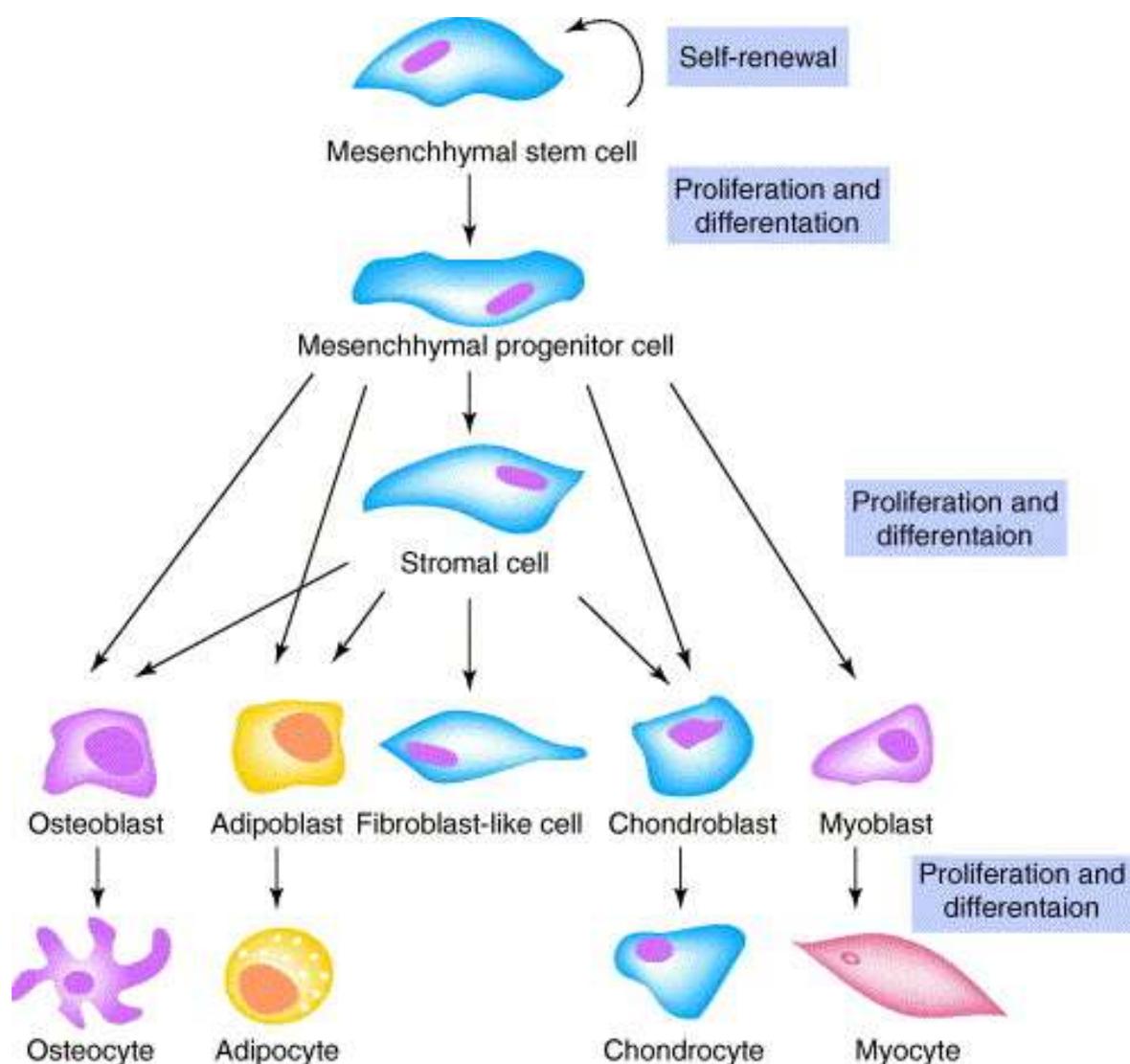


Figure 28 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Les CSM pluripotentes peuvent s'auto-renouveler ou se différencier en progéniteurs mésenchymateux à l'origine des cellules ostéoblastiques, adipocytaires, fibroblastiques, chondroblastiques et myoblastiques. D'après Millington-Ward et al, 168.

cellules souches mésenchymateuses (CSM) ou encore les progéniteurs mésenchymateux (légèrement plus avancés dans la différenciation) ; toutes ces cellules sont capables de se différencier entre autre en ostéoblastes et fibroblastes ¹⁸⁰, sources de collagène de type I. L'apport de ces cellules allogéniques codant une protéine de collagène fonctionnelle a permis d'améliorer le tableau clinique des patients. Une seconde stratégie consiste à modifier directement les cellules du patient en vue d'une autogreffe. Ainsi des protocoles de thérapie génique visant à apporter une copie fonctionnelle du gène ou à inhiber le produit muté au profit de l'expression des chaînes sauvages ont été développés.

4.5.1. Greffes allogéniques de cellules souches issues de la moelle osseuse

Les cellules souches adultes présentent un grand intérêt en recherche notamment à cause de leur capacité d'autorenouvellement (tout en maintenant un statut indifférencié). Ces cellules sous l'effet de différents stimuli sont capables de se différencier en un certain nombre de cellules. Ainsi les CSM isolées de la moelle osseuse sont capables de se différencier en cellules conjonctives spécialisées de l'os, de la graisse, du cartilage ou encore des muscles, elles peuvent également générer des cellules épithéliales ou encore des progéniteurs neuraux ¹⁸¹ (Figure 28 ci-contre).

Les CSM présentent un grand intérêt thérapeutique pour traiter des désordres impliqués dans ces tissus. En effet, l'injection de CSM chez le mouton ¹⁸² et la souris ¹⁸³ a montré une incorporation de ces cellules et de leurs cellules filles dans différents tissus y compris dans le tissu osseux. De plus, ces cellules semblent être capables de migrer vers les sites lésés ¹⁸⁴ d'où leur potentiel effet bénéfique dans des cas de fracture chez des patients atteints d'OI.

Ainsi l'injection de CSM allogéniques capables de générer des ostéoblastes avec une production de collagène fonctionnel chez des patients atteints d'OI représente un axe très prometteur dans le développement des nouvelles stratégies. Les CSM peuvent être injectées de façon systémique (utilisant ainsi leurs propriétés de migration vers les sites lésés) ou directement dans la cavité osseuse. Ainsi 3 enfants atteints d'une OI sévère ont reçu une greffe de CSM et de cellules souches hématopoïétiques allogéniques dans le cadre d'un essai clinique. Trois mois après injection de ces cellules par voie intraveineuse, 1,5-2% des ostéoblastes chez les

patients ont été identifiés comme issus du donneur de moelle. Cette prise de greffe a permis d'augmenter de manière significative la proportion de tissu minéralisé ¹⁸⁵. Dans une deuxième étude, 6 jeunes patients ayant déjà reçu une greffe allogénique de moelle osseuse ont été traités par une injection de CSM allogéniques uniquement. Cinq patients sur 6 ont montré une prise de greffe avec la présence de cellules issues du donneur dans différents types tissulaires y compris dans l'os. Ceci eut pour conséquence d'accélérer leur croissance de 60 à 94% dans les 6 mois ayant suivi la greffe ¹⁸⁶. Enfin, chez une femme enceinte dont le fœtus présentait de multiples fractures (forme d'OI considérée comme létale), l'injection de CSM allogéniques *in utero* durant la 32^{ème} semaine de grossesse combinée à un traitement par des bisphosphonates dès l'âge de 2 mois a permis d'améliorer l'architecture de l'os trabéculaire et de diminuer le risque de fracture (seulement 3 en 2 ans). A l'âge de 2 ans, la croissance et le développement de l'appareil psychomoteur étaient normaux ¹⁸⁷.

Ainsi, l'injection de CSM allogéniques permet d'améliorer nettement le tableau clinique des patients atteints d'OI et ce malgré les faibles taux de cellules issues de la différenciation de ces CSM. Les effets à long terme ne sont malheureusement pas encore connus. De plus, ce type de stratégie nécessite un donneur de moelle compatible et doit faire face aux risques de rejet de greffe. C'est pourquoi de nouvelles stratégies proposent non plus d'apporter des cellules capables de produire du collagène fonctionnel mais de directement corriger le défaut génétique par thérapie génique au sein des cellules de patient en vue d'une autogreffe.

4.5.2. Thérapies géniques : transfert stable d'un gène fonctionnel ou de molécules inhibant spécifiquement l'expression du transcrit muté

La thérapie génique, complémentaire à la thérapie cellulaire, consiste à corriger directement les cellules du patient, cellules qui pourront par la suite être réimplantées par autogreffe. Ainsi dans le cas des OI de type I caractérisées par un déficit quantitatif de collagène, l'introduction d'une copie supplémentaire permettrait de pallier ce problème. Cependant, cette approche reste compliquée puisque les gènes *COL1A1* et *COL1A2* sont relativement grands (18kb contenant 51 exons et 38kb contenant 52 exons respectivement) et fortement régulés *in vivo* (par

des facteurs de transcription tels que NF κ B, Sp1, AP1, Smads, Myc ou des cytokines comme le TGF- β , Il-1, TNF- α ¹⁸⁸). Ils sont exprimés différemment en fonction du type cellulaire mais également au cours du développement de l'os et du cartilage ¹⁸⁹ (voir chapitre 3 des résultats, paragraphe 1.1).

Dans le cas des désordres génétiques à caractère dominant, notamment pour les OI de type II à IV, le fait d'apporter une cassette codant une forme fonctionnelle du gène n'empêche en rien la production des chaînes mutées. En effet, dans ce cas ce n'est pas le déficit d'expression qui pose problème mais la production d'une protéine anormale. Ainsi la stratégie la plus à même de pouvoir favoriser l'association de chaînes sauvages serait d'inhiber de manière spécifique l'expression de l'allèle muté tout en préservant l'allèle sauvage ¹⁹⁰. Ainsi, plusieurs méthodes visant à inhiber le transcrit muté ont été évaluées.

Des cellules issues d'un modèle murin présentant une ostéogenèse de type IV ont été transfectées *in vitro* par des oligonucléotides antisens ciblant une mutation ponctuelle dans le gène *Col1a2* associée à une perte de l'exon 16 (les antisens ciblaient l'ARNm à la jonction entre les exons 15 et 17). Les résultats obtenus ont montré une diminution significative et spécifique de la protéine mutée de 44 à 47% ¹⁹¹. Cependant, les antisens ne sont pas les molécules les plus adéquates à la modification de cellules de mammifères de par leur potentiel d'activation d'une réponse IFN (voir chapitre 1.3.1). De plus, les désordres génétiques ne sont pas toujours associés à un saut d'exon mais également à des mutations ponctuelles compliquant ainsi le ciblage spécifique du transcrit muté.

Les ribozymes sont des enzymes capables de dégrader l'ARN grâce à leur corps catalytique. Ils sont spécifiques d'un transcrit et ce grâce à deux séquences antisens complémentaires de l'ARNm ciblé ¹⁹². Ils sont efficaces pour supprimer jusqu'à 50% d'expression des chaînes mutées $\alpha 1$ et $\alpha 2$ *in vitro* et *in vivo* ¹⁹³. Cependant, ces molécules présentent des problèmes de stabilité et sont relativement peu développées en thérapie (seul un essai clinique en oncologie et deux dans le cadre d'un traitement du virus du sida, <http://clinicaltrials.gov>).

4.6. shRNAs thérapeutiques dans l'ostéogenèse imparfaite

La problématique biologique de l'ostéogenèse imparfaite repose sur l'expression au sein d'une même cellule de chaînes COL1A1 mutées et sauvages, cependant l'incorporation d'une seule chaîne mutée au sein de la triple hélice de collagène suffit à ce que la protéine soit rendue non fonctionnelle. L'ARN interférence apparaît comme un nouvel outil pour inhiber de manière spécifique l'expression des transcrits mutés. Par comparaison aux oligonucléotides antisens et aux ribozymes, les molécules d'ARNi seraient en effet plus efficaces ¹⁹⁴ et plus spécifiques. De par leur propriété à induire la dégradation d'un messenger cible, les siRNAs permettraient de diminuer la synthèse des protéines mutées tout en conservant celle des protéines sauvages. Cependant la difficulté de cette stratégie repose sur le fait que les transcrits mutés COL1A1 ne diffèrent que d'un ou deux nucléotides de l'ARNm sauvage. Ainsi les siRNAs thérapeutiques présenteraient (1) une complémentarité de séquences parfaite avec la séquence du transcrit muté induisant ainsi une dégradation du messenger et (2) une complémentarité partielle avec l'ARNm sauvage pouvant être également associée un blocage de la traduction (voir paragraphe 1.2.3 sur les miRNAs). A l'heure actuelle, aucune étude n'a démontré l'efficacité des molécules d'ARNi pour inhiber spécifiquement l'expression des chaînes mutées au profit de l'association de chaînes fonctionnelles dans des cellules et/ou modèles animaux d'ostéogenèse imparfaite. L'objectif de mon travail de thèse a donc été d'identifier des séquences de siRNAs efficaces pour inhiber l'expression de l'ARNm muté et discriminantes vis-à-vis du transcrit sauvage dans un modèle murin d'ostéogenèse imparfaite de type IV caractérisé par la mutation d'un des allèles codant pour la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I.

RESULTATS

**CHAPITRE 1 : Développement d'un
protocole d'administration efficace de
siRNAs dans le microenvironnement de
l'ostéosarcome**

1. INTRODUCTION

Avant d'envisager une thérapie de l'ostéosarcome basée sur l'utilisation de molécules d'ARN interférence, nous avons choisi de cibler l'expression d'un gène rapporteur exprimé par les cellules d'ostéosarcome elles-mêmes afin de montrer la faisabilité du ciblage d'un gène spécifique par des siRNAs.

En effet, les siRNAs sont des molécules simples à produire car elles ne nécessitent qu'une synthèse chimique par association de nucléotides contrairement au shRNAs et miRNAs qui doivent être tout d'abord clonés dans un plasmide d'intérêt. De plus, ces molécules sont déjà sous forme active, elles ne nécessitent pas d'être transcrites au niveau du noyau comme c'est le cas pour les molécules vectorisées qui en plus de la membrane cellulaire doivent également franchir l'enveloppe nucléaire. C'est pourquoi ces molécules ont rapidement été utilisées à des fins thérapeutiques dans des études précliniques pour le traitement de maladies infectieuses en ciblant le transcrit viral lui-même ou dans des pathologies nécessitant une administration locale de siRNA dans la cavité oculaire ou le cerveau. Ces molécules de siRNA sont également activement testées dans des études précliniques en oncologie. En effet, un nombre croissant d'équipes de recherche proposent d'utiliser ces outils d'inhibition post-transcriptionnelle pour inhiber spécifiquement l'expression d'une protéine impliquée dans la cancérogenèse.

Cependant, toutes les études menées en oncologie ont montré que l'efficacité d'une stratégie basée sur l'utilisation de siRNAs thérapeutiques repose sur la mise au point de plusieurs paramètres, à savoir l'adressage de ces molécules sur le site tumoral, le passage efficace de la membrane plasmique et une quantité de siRNAs intracytoplasmiques suffisante pour entraîner une inhibition significative et spécifique de l'expression de l'ARNm cible. Dans ce but, nous avons choisi de cibler dans un premier temps l'expression d'un gène rapporteur exprimé par les cellules tumorales : la luciférase *firefly* pour tester la faisabilité d'un ciblage spécifique par des siRNAs au sein du microenvironnement tumoral. L'activité de la luciférase *firefly* est détectable et quantifiable chez l'animal vigile par des techniques d'imagerie optique par bioluminescence *in vivo* (BLI). Ainsi, l'effet spécifique des siRNAs, c'est-à-dire l'inhibition de la production de la luciférase peut être quantifiée. De plus, en ciblant l'expression d'un gène rapporteur, n'ayant aucun effet thérapeutique,

l'injection de siRNAs ne doit pas interférer avec la progression tumorale témoignant d'effets non spécifiques.

1.1. Les modèles animaux d'ostéosarcome

Plusieurs modèles animaux d'ostéosarcome ont été développés et décrits dans la littérature. Ils peuvent être induits par différents stimuli : irradiations chez le rat, injection de cellules d'ostéosarcome infectées par le virus M-MSV (Moloney murine sarcoma virus) ou par injection du virus lui-même, injection de cellules issues de lignées cellulaires d'ostéosarcome humaines ou murines par voie systémique ou locale et transplantation de fragments tumoraux au contact d'un os long tel que le tibia. Ces techniques permettent d'induire la formation d'une tumeur d'ostéosarcome, au contact du squelette de l'animal, qui doit reproduire le plus fidèlement possible les signes cliniques et la cinétique de développement observés chez les patients. La seconde propriété indispensable au choix d'un modèle animal est la reproductibilité.

Les techniques d'irradiations ou d'injection de cellules infectées sont contraignantes et dangereuses pour l'utilisateur. C'est pourquoi les modèles développés au sein du laboratoire de Physiopathologie de la résorption osseuse sont des modèles induits par injection de cellules ou transplantation de fragments tumoraux.

- Injection de cellules issues de lignée d'ostéosarcome

Les injections de cellules d'ostéosarcome sont réalisées en site intra-osseux dans le fémur ou le tibia ^{195,196} ou par voie sous-cutanée à proximité du fémur ou de l'omoplate ¹⁹⁷. Cependant, cette dernière possibilité ne reproduit pas le phénomène d'envahissement médullaire de l'ostéosarcome retrouvé chez les patients. Un modèle pertinent d'injection intra-tibiale de cellules d'ostéosarcome humaines chez la souris immunodéficiente (souris nude) permet le développement d'une tumeur à caractère mixte c'est-à-dire induisant à la fois des lésions ostéolytiques et la formation d'os ectopique ainsi qu'une dissémination spontanée en site pulmonaire ¹⁹⁶.

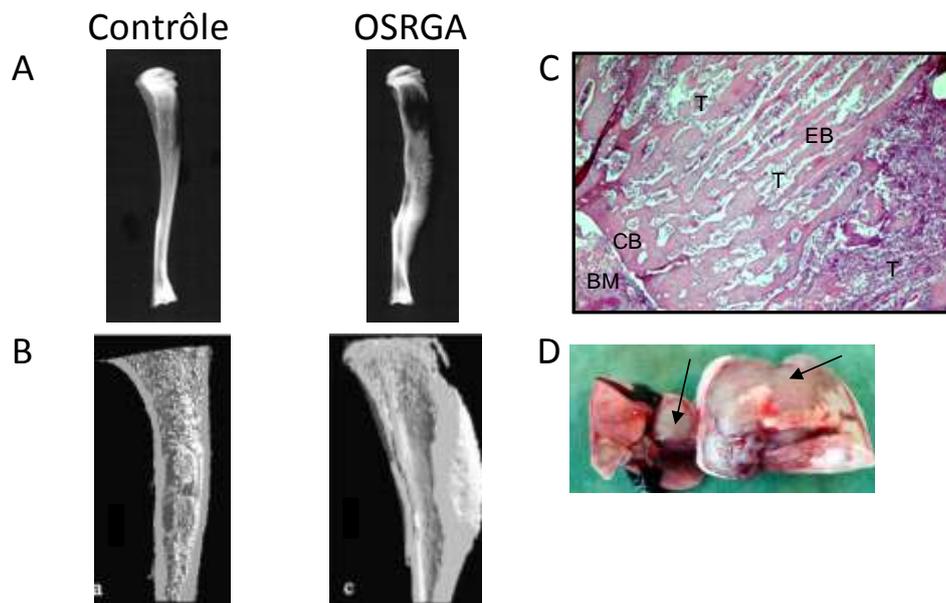


Figure 29 : Caractéristiques du modèle d'ostéosarcome OSRGA induit par transplantation chez le rat Sprague-Dawley. L'analyse osseuse des tibias portant la tumeur par clichés radiographiques (A, d'après Brounais et al ¹⁹⁸) ou par microscanner (B, d'après Lamoureux et al ¹²²) montrent une ostéocondensation par rapport à un os contrôle non transplanté. Cet os ectopique (EB) est retrouvé sur les coupes histologiques (C) dans la continuité de la corticale du tibia (CB) adjacent à la tumeur (T) (coloration HES, x40, BM : moelle osseuse), issues de la publication de Brounais et al, ¹⁹⁸. La dissémination métastatique importante de ce modèle est mise en évidence à l'autopsie de l'animal (D).

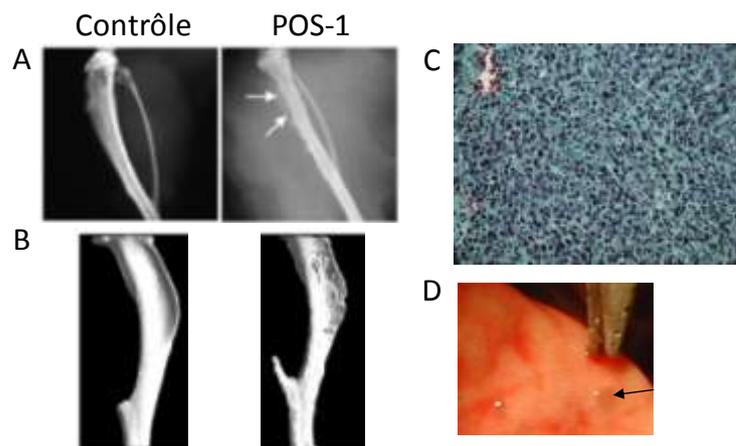


Figure 30 : Caractéristiques du modèle d'ostéosarcome POS-1 induit par transplantation chez la souris C3H/HeN. L'analyse osseuse des tibias portant la tumeur par clichés radiographiques (A) ou par microscanner (B) montrent des lésions ostéolytiques ¹²² par rapport à un os contrôle non transplanté. Au niveau histologique, le tissu tumoral ne présente aucune formation de plaque d'ostéoïde mais un fort indice mitotique (C) (coloration au Trichrome de Masson, x40). La présence de métastases pulmonaires est observable à l'autopsie des animaux (D).

La voie d'injection systémique, le plus souvent par la veine de la queue ¹⁹⁹, est également utilisée afin de tester le potentiel métastatique de ces cellules. Un modèle d'étude des nodules tumoraux en site pulmonaire a également été développé par injection intra-veineuse de cellules d'ostéosarcome de souris au niveau du sinus rétro-orbital, conduisant au développement de nodules pulmonaires dans 80% des cas ¹³⁵.

- Induction d'un ostéosarcome par transplantation de fragments tumoraux

La transplantation d'un fragment tumoral permet le développement d'un ostéosarcome localisé au niveau du site d'implantation. Deux modèles syngéniques utilisés en routine au laboratoire de Physiopathologie de la résorption osseuse sont ainsi obtenus chez le rat Sprague-Dawley et chez la souris C3H/HeN.

Le modèle d'ostéosarcome de rat OSRGA a été initialement radio-induit ²⁰⁰. La transplantation d'un fragment tumoral au contact du tibia après avivement du périoste permet le développement d'un ostéosarcome chez 70% des individus. La tumeur est mesurable 7 à 10 jours après l'implantation ¹²². L'os adjacent à la tumeur est rapidement envahi, lysé et remodelé avec la présence d'un « feu d'herbe » caractéristique d'une formation d'os ectopique. Au niveau histologique, la tumeur est composée d'un tissu fortement calcifié présentant d'importantes plages de nécrose autour desquelles des zones de prolifération sont retrouvées. Enfin de nombreuses métastases pulmonaires sont observées à l'autopsie des animaux ²⁰¹. L'ensemble de ces données sont présentées dans la figure 29 ci-contre. Pour les besoins de l'étude, et notamment afin de diminuer les quantités de siRNAs injectés, ce modèle OSRGA a été transposé chez la souris nude immunodéficiente. Ce modèle xénogénique reproduit l'ensemble des caractéristiques du modèle de rat (voir publication à suivre, Rousseau et al, 2010).

Le second modèle est un modèle d'ostéosarcome spontané POS-1 initialement observé chez la souris C3H/HeN ayant généré une lignée cellulaire portant le même nom ²⁰². L'injection des cellules POS-1 par voie sous cutanée au niveau du coussinet plantaire chez des souris syngéniques consanguines permet le développement d'une tumeur transplantable (voir publication à suivre, Rousseau et al 2010). La transplantation d'un fragment tumoral au contact du tibia après avivement du périoste conduit à la formation d'un ostéosarcome ostéolytique détectable en 6 jours. Les analyses histologiques montrent une masse tumorale très proliférative, peu nécrotique et non calcifiée (Figure 30 ci-contre).

Tous ces modèles présentent des avantages et des inconvénients qui doivent être pris en compte pour l'établissement des protocoles pré-cliniques. L'ensemble de ces modèles, de par leurs différentes caractéristiques en terme de morphologie macro et microscopique, de remodelage osseux et d'expression de marqueurs biochimiques permet de reproduire l'ensemble des tableaux cliniques observés chez les patients atteints d'ostéosarcome. Ainsi les modèles syngénique de souris POS-1 et xénogénique OSRGA ont été utilisés pour la mise au point du protocole d'injection des siRNAs.

1.2. Passage de la membrane cellulaire

Bien que le transfert d'acides nucléiques nus a montré quelques résultats intéressants, l'efficacité de transfection *in vivo* de siRNAs injectés localement ou par voie systémique dans des modèles de tumeurs requiert des quantités élevées de siRNAs. En effet, ils passent difficilement la membrane cellulaire ²⁰³ et seules quelques molécules arrivent à la passer spontanément par endocytose assurée par les cavéolines ²⁰⁴ ce qui limite ce mode d'injection même pour des applications locales. Ces molécules doivent encore être capables de s'échapper des endosomes pour rejoindre le cytoplasme ²⁰⁵ (Figure 31).

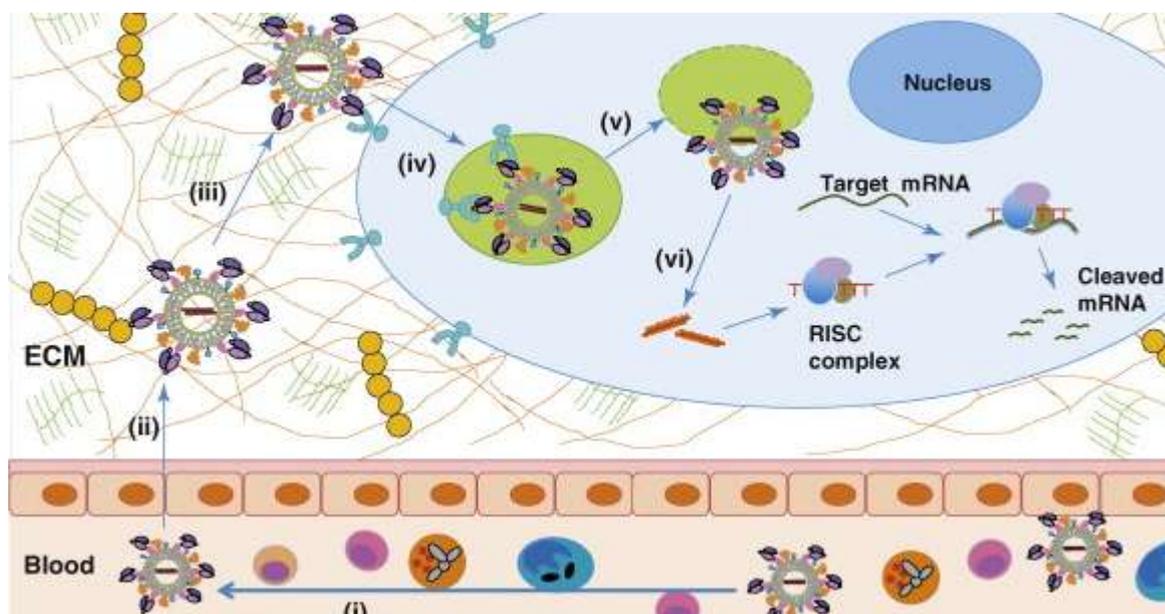


Figure 31 : Administration de siRNAs *in vivo* et principaux obstacles physiologiques. Quelque soit la voie d'injection utilisée, le principal obstacle à franchir reste le passage de la membrane cellulaire. Dans le cas d'une injection systémique, d'autres paramètres sont également à prendre en compte à savoir (i) leur faible stabilité dans le sérum et leur dégradation par les nucléases ou par le système rénal, (ii) le faible

Delivery systems	Property	Targeted gene	Animal model	Route
Liposomes	SNALP	HBV	HBV vector-based mouse	i.v.
	Cationic liposome	Bcl-2	Liver metastasis mouse model	i.v.
	Cationic liposome	Integrin αv	Prostate cancer xenograft	i.t.
	Cationic liposome	CD31	Prostate cancer xenograft	i.v.
	Cationic liposome	Bcl-2	Prostate cancer xenograft	i.t.
	Cationic cardiolipin liposome	Raf-1	Prostate cancer xenograft	i.v.
	Cationic cardiolipin analogue-based liposomes	c-raf	Breast cancer xenograft	i.v.
	Neutral liposomes (DOPC)	EphA2	Ovarian cancer xenograft	i.v./i.p.
	Neutral liposomes (DOPC)	FAK	Ovarian cancer xenograft	i.p.
	Neutral liposomes (DOPC)	ADRB2	Ovarian cancer xenograft	i.p.
Neutral liposomes (DOPC)	IL-8	Ovarian cancer xenograft	i.p.	
Liposome-polycation-DNA	EGFR	Lung cancer xenograft	i.v.	
Cationic immunoliposome		Lung metastasis	i.v.	
Nanoparticles	Immunoliposome	Her-2	Breast cancer xenograft	i.v.
	CaCO ₃ nanoparticle	VEGF	Gastric cancer xenograft	i.t.
	Chitosan-coated nanoparticle	RhoA	Breast cancer xenograft	i.v.
	Foliated lipid nanoparticle	Her-2	Nasopharyngeal cancer xenograft	i.t.
Polymers	PEI	Her-2	Ovarian cancer xenograft	i.p.
	PEI	PTN	Orthotopic glioblastoma	i.c.
Others	Poly (ester amine)	Akt1	Urethane-induced lung cancer	Inhalation
	Atelocollagen	HPV18 type E6 and E7	Cervical cancer xenograft	i.t.
	Chemical modification	HBV	HBV vector-based mouse	i.v.
	Carbon nanotube	TERT	Lewis lung tumor	i.t.
	Cyclodextrin-containing polycation	EWS-FLI1	Metastatic Ewing's sarcoma	i.v.
	Fusion protein (Protamine, HIV-1 envelop Ab)	c-myc, MDM2, VEGF	Subcutaneous B16 melanoma tumor	i.t./i.v.
Electroporation	EGFP	Subcutaneous B16F10 expressing EGFP	i.t.	

i.v.: intravenous injection, i.p.: intraperitoneal injection, i.t.: intratumoral injection, i.c.: intracerebral injection.

Tableau 4 : Liste des principaux vecteurs synthétiques et/ou chimiques utilisés pour le transfert de molécules d'ARNi dans des études précliniques. La majorité des essais précliniques développés utilisent les liposomes pour apporter des siRNAs ou autres molécules d'ARNi, ces essais ciblant différents transcrits dans plusieurs modèles animaux de pathologies infectieuses ou de cancer. D'après Oh et Park, 206.

taux de passage à travers les membranes endothéliales des capillaires et (iii) la diffusion à travers la matrice extracellulaire. Les quelques molécules ayant atteint les cellules cibles doivent encore (iv) passer la membrane cellulaire par endocytose, (v) échapper à la dégradation lysosomale et (vi) inactiver de manière efficace le transcrit ciblé. D'après Kim et *al*,²⁰⁷.

De plus, leur stabilité joue également un rôle important dans leur efficacité car l'action des siRNAs n'est possible que s'ils sont intacts et actifs. Dans le sérum, les siRNAs nus ont une demi-vie très courte (quelques minutes) due (1) à la présence de nucléases et de monocytes macrophages éliminant le matériel injecté et (2) à leur excrétion rapide par les reins et leur élimination par le système réticuloendothélial²⁰⁸. Enfin, la matrice extracellulaire peut également représenter un obstacle car riche en polysaccharides et protéines fibreuses qui peuvent gêner la diffusion des siRNAs jusqu'à la cellule (Figure 31)²⁰⁹.

C'est pourquoi les équipes de recherche développent des vecteurs pour le transfert de gène afin d'améliorer (1) la stabilité durant le transport par protection du matériel génétique et (2) l'efficacité de transfection des cellules *in vivo* via l'endocytose et le relargage dans le cytosol. Ainsi les méthodes de transfert des siRNAs les plus développées à l'heure actuelle visent à utiliser des vecteurs chimiques ou synthétiques bioabsorbables ou biodégradables tels que les liposomes cationiques, les polymères et les nanoparticules (Tableau 4 ci-contre). Dans la stratégie qui nous intéresse, ils ont l'avantage d'être peu immunogènes permettant ainsi des injections répétées pour maintenir une inhibition de l'expression de l'ARNm cible.

Les liposomes cationiques sont actuellement les vecteurs les plus étudiés et testés dans des essais cliniques chez l'Homme (448 études répertoriées <http://clinicaltrials.gov>)²¹⁰. Ils représentent une classe de particules attractives par le simple fait qu'ils peuvent former des complexes avec les acides nucléiques chargés négativement, par leur efficacité de transfection, par leurs propriétés pharmacocinétiques et par leur faible toxicité et/ou immunogénicité.

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 espaceur). De cette manière, les liposomes se présentent comme des vésicules formées d'une bicouche lipidique séparant un milieu intravésiculaire aqueux du milieu extérieur comme le ferait une membrane

plasmidique. Le principe de formation des complexes liposomes cationiques + acides nucléiques (lipoplexes) repose sur une condensation des acides nucléiques chargés négativement sur les groupements phosphates, avec une molécule chargée positivement pour former de nouvelles particules. Les lipides entrant le plus souvent dans la composition des liposomes cationiques comprennent le DOGS (dioctadécylamidoglycyl-spermine ou transfectam), le DOTMA (bromure de dioléoyloxy-propyl-triméthylammonium) un ammonium quaternaire amphiphile, le DOTAP (dioléoyloxy-3-(triméthylammonio)propane) ²¹¹. Des co-lipides tels que la DOPE (dioléoylphosphatidyléthanolamine) phospholipide neutre, le cholestérol et ses dérivés permettent de stabiliser les lipoplexes formés et d'atteindre de meilleurs taux de transfection *in vivo* ²¹². Après injection, le lipoplexe est endocyté au niveau de la membrane cellulaire et ce grâce à l'interaction des charges positives en surface des lipoplexes avec les protéoglycanes négativement chargés de la membrane cellulaire. Cette accumulation de composés cationiques dans les endosomes protège les acides nucléiques de la dégradation par les enzymes lysosomales, déstabilise l'endosome permettant la libération du matériel contenu dans le cytoplasme cellulaire où il pourra agir (Figure 32) ²¹³. L'efficacité du transfert dépend de plusieurs paramètres dont le type de lipide utilisé, la condensation correcte de l'acide nucléique dans les lipoplexes, le rapport de charge lipide cationique / matériel génétique chargé négativement et le type cellulaire ²¹⁴. Certaines cellules comme les fibroblastes humains se révèlent particulièrement difficiles à transfecter.

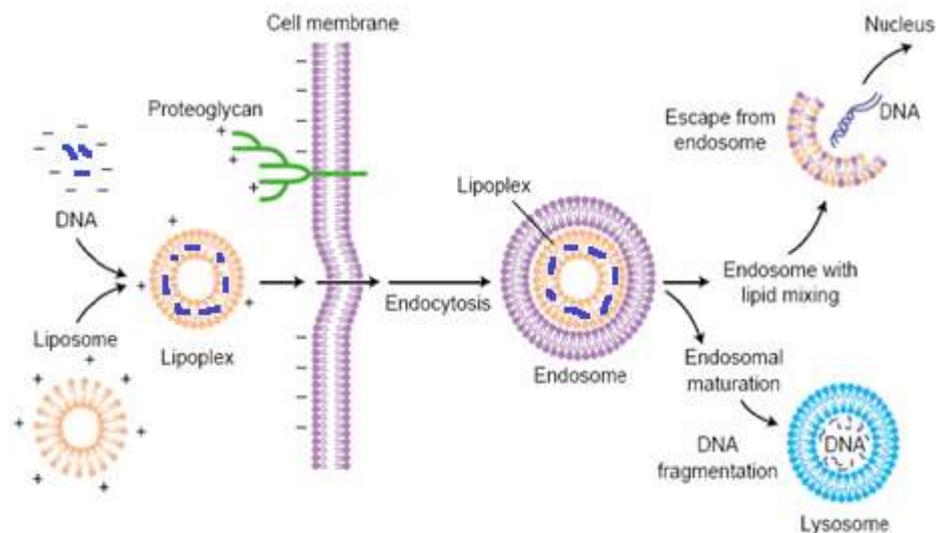


Figure 32 : Endocytose non conventionnelle de liposome en thérapie génique. Des lipides cationiques formant des liposomes sont complexés avec de l'ADN pour former des lipoplexes. La structure fusionne avec la membrane cellulaire, parfois après interaction avec des protéoglycanes de surface. Les complexes sont alors internalisés par endocytose, formant une vésicule micellaire à double couche inversée. Durant

la maturation de l'endosome en un lysosome, la paroi de l'endosome peut se rompre, relâchant l'ADN dans le cytoplasme et potentiellement vers le noyau. L'ADN importé dans le noyau peut alors exprimer le transgène. Sinon l'ADN est dégradé dans le lysosome. Issu du Parker et *al*, 215.

Dans le tissu osseux et plus particulièrement dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde, de tels lipoplexes ont été utilisés de manière à inhiber l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Des siRNAs ciblant l'expression du TNF α ont été administrés *in vivo* après complexion sous forme de lipoplexes avec le liposome RPR209120 2-{3-[Bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino}-N-ditetradecyl carbamoyl methyl-acetamide / DOPE. La transfection des lipoplexes a été optimisée par ajout d'un plasmide cargo non codant : le pSL301. En effet, l'ajout d'un cargo permet de diminuer les doses de siRNAs et augmente la stabilité ainsi que l'efficacité des lipoplexes (Figure 33) 216,217. Ces injections ont eu pour conséquence une diminution de l'incidence et de la gravité de la polyarthrite rhumatoïde 43. Enfin, dans un modèle d'ostéosarcome induit chez le rat, les liposomes permettent un transfert de gène efficace 218.

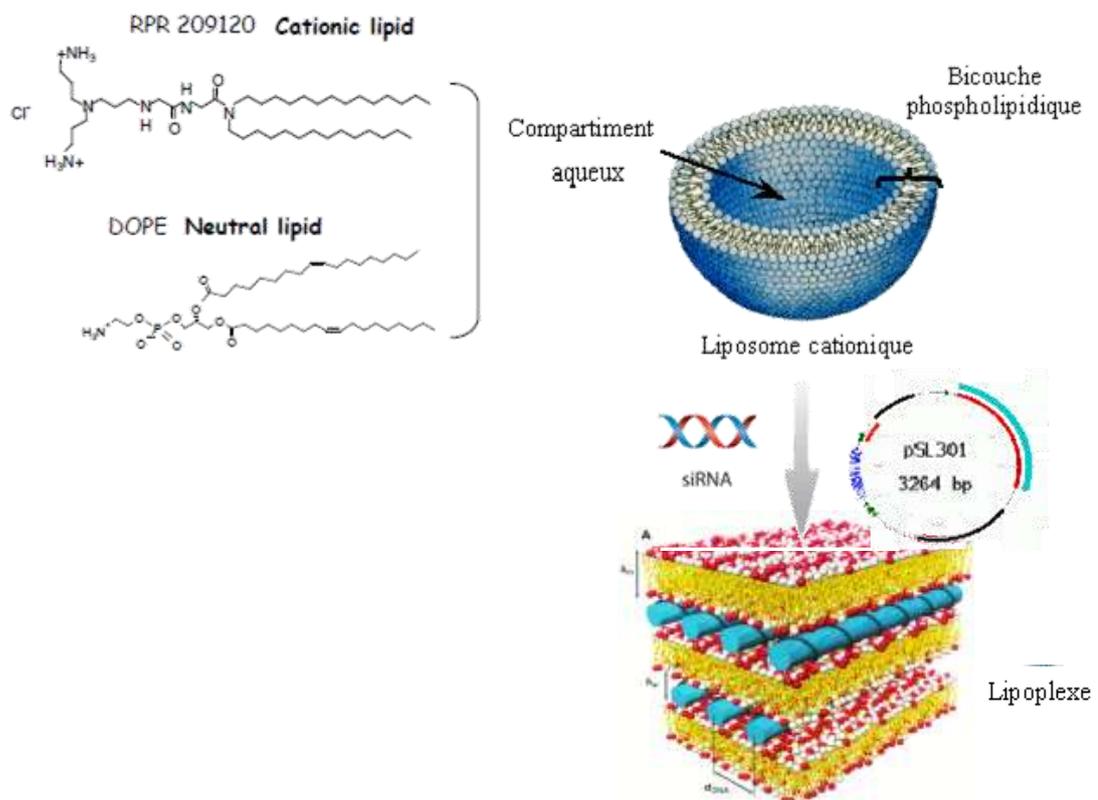


Figure 33 : Le liposome cationique RPR209120/DOPE. Il est chimiquement composé d'un lipide cationique (le RPR209120) associé à un co-lipide neutre (la DOPE) de manière à former une sphère entourée d'une bicouche lipidique. Cette bicouche peut renfermer des composés hydrosolubles tels que les acides nucléiques donnant ainsi des composés appelés lipoplexes. La pré-association des molécules de type siRNA à un plasmide cargo (le pSL301) permet d'augmenter la stabilité et l'efficacité de transfection de ces lipoplexes. Adapté de Khoury et *al*. et Rhinn et *al*, 43,217.

Delivery route	Disease	Target gene	Delivery system	Dose of siRNA	model
Intraocular	Ischemic retinopathy	HIF-1 α	Dharmacon TM transfection reagent	~1.4 mg	Rats
	Synaptic activity in Alzheimer's disease	Amyloid precursor protein	TransMessenger TM transfection reagent	1 μ g	Rats
Intranasal	Ocular neovascularization	VEGF	Lipofectamine TM	~1.3 μ g	Rats
	Ocular inflammation and fibrosis	TGF- β	TransIT-TKO TM	~80 ng	Mouse
	Pulmonary inflammation	eIF5A	DOTAP transfecting reagent	50 μ g	Mouse
	Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection	Ori and glycoprotein B	Lipofectamine TM or naked siRNA	~0.5 μ g	Mouse
	Respiratory syncytial/parainfluenza virus	RSV-P and HPIV3-P	TransIT-TKO TM or Naked siRNA	70 μ g	Mouse
	Influenza A virus infection	Nucleoprotein or acidic polymerase	Oligofectamine TM	~20 μ g	Mouse
	Respiratory syncytial virus	RSV/A2	Lipidoid	2 mg/kg	Mouse
Intratracheal	Lung inflammation diseases	P38 MAP kinase	Cholesterol conjugation	~133 μ g	Mouse
	Post-ischemic cerebral inflammation	STAT3	Oligofectamine TM	~11 μ g	Rats
Intracerebral	Huntingtin disease	Htt	Cholesterol conjugation	~0.27 μ g	Mouse
	Phrenic long-term facilitation	BDNF	Oligofectamine TM	~11.3 μ g	Rat
	Morphine-induced thermal hyperalgesia	Raf-1	i-Fect TM	2 μ g	Rats
Intrathecal	Pain	NTS-2	i-Fect TM	1.25 μ g	Rats
	Wound healing	Mapk-1 and lamin A/C	Lipofectamine 2000 TM in agarose matrix	~0.27 μ g	Mouse
Topical application	Cutaneous melanocytic lesion	B-Raf and AKT3	PEGylated DOTAP liposomes / ultrasound	25 μ g	Mouse
Transdermal	Herpes simplex virus 2 infection	HSV-2	Oligofectamine TM	~6.7 μ g	Mouse
Intravaginal	Herpes simplex virus 2 infection	HSV-2	Cholesterol conjugation	~26 μ g	Mouse
Intrarectal	Colitis	TNF- α	Lipofectamine TM	~53 μ g	Mouse
	Prostate cancer bone metastasis	Integrin α 5	PEGylated cationic liposomes	1 μ g	Mouse
Intratumoral	Nasopharyngeal cancer	Her-2	Folate targeted PEGylated cholesterol-containing NP	10 μ g	Mouse
Ovarian cancer	Ovarian cancer	Claudin-3	PEGylated cationic lipid particles	25 μ g	Mouse
	Lung cancer	SIP receptor 1	DOTAP liposomes	15 μ g	Mouse
	Breast cancer	RhoA	Cytfectin TM	~110 ng	Mouse

Tableau 5 : Exemples de stratégies basées sur l'administration locale de molécules d'ARNi synthétiques complexées à des systèmes lipidiques, Wu et McMillan ²²⁰.

1.3. La voie d'administration

Le concept même de la thérapie génique repose sur l'entrée dans la cellule cible d'acides nucléiques exogènes quelque soit leur mode d'administration (*in vivo*, *ex vivo*, ou *in situ*). Les siRNAs ont un effet transitoire et ne peuvent donc pas servir à modifier stablement des cellules *ex vivo* en vue d'une autogreffe de cellules corrigées. Cependant, les injections répétées de siRNAs permettent de maintenir une répression du transcrit ciblé le temps d'un traitement transitoire. Ces traitements transitoires sont adaptés au traitement des cancers puisque les cures de chimiothérapie mises en place pour la prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome par exemple sont elles-mêmes intermittentes et cessent à la rémission complète du patient.

Les modèles murins d'ostéosarcome sont obtenus après transplantation en position para-tibiale d'un fragment tumoral, le développement de la tumeur s'effectue dans un premier temps dans le muscle au contact de l'os puis la tumeur devient cliniquement décelable par la présence d'une tuméfaction au niveau du membre inférieur. Les injections par voie systémique requièrent de lourdes investigations pour l'optimisation de la stabilité des vecteurs dans le sérum et de leur adressage jusqu'au tissu cible. Le but de cette étude étant de déterminer dans un premier temps si l'on peut diminuer spécifiquement l'expression d'un gène cible dans le microenvironnement tumoral de l'ostéosarcome, nous avons tout d'abord choisi d'administrer les siRNAs directement au sein du tissu tumoral afin d'optimiser la question du ciblage d'un transcrit dans ces cellules. Ainsi les résultats négatifs ne seront pas liés à un problème d'adressage des molécules par voie sanguine mais à une mauvaise transfection *in vivo* par les lipoplexes ou une inefficacité des molécules de siRNA elles-mêmes.

Cette voie d'administration locale a notamment été utilisée dans les premières investigations menées sur les effets thérapeutiques des siRNAs en visant l'expression de transcrits issus de virus respiratoires ²¹⁹ ou du VEGF impliqué dans l'AMD (maladie de dégénérescence oculaire) ³⁸. Les siRNAs étaient alors injectés directement par les voies respiratoires et la cavité oculaire respectivement. Désormais les applications thérapeutiques des siRNAs se sont élargies à des pathologies métaboliques, inflammatoires ou encore des cancers (Tableau 5 ci-contre).

En ce qui concerne le tissu osseux, plusieurs études ont également montré la faisabilité d'une injection locale de siRNAs dans un but thérapeutique. En effet, des injections intra-articulaires de siRNAs ciblant l'expression de NFκB dans un modèle d'arthrite induite chez le rat permet de réduire la destruction des articulations ^{221,222}. Dans ce même modèle induit chez la souris, Schiffelers et al ont montré une amélioration du tableau clinique après électroporation de siRNAs ciblant le TNFα directement dans le tissu articulaire ²²³. Enfin, la voie d'injection locale de siRNAs s'est avérée efficace pour prévenir le développement du cancer de la vessie chez la souris après injection intravesiculaire de siRNAs complexés avec des liposomes ²²⁴. De plus, pour des organes / tissus ou tumeurs facilement accessibles, cette voie d'administration a été largement utilisée et s'est montrée efficace. Ainsi, des injections intra-tumorales dans un modèle de cancer de la prostate de siRNAs permettent de diminuer spécifiquement et significativement le transcrite codant le VEGF ²²⁵.

1.4. Les effets non spécifiques des siRNAs

Décrits pour la première fois par Jackson et al en 2003, les effets non spécifiques des siRNAs étaient associés à une inhibition post-transcriptionnelle de l'expression de gènes dont la séquence ressemblait à celle du transcrite ciblé. En effet, le principe même de l'ARNi endogène assurée par les miRNAs repose sur une complémentarité de séquence pouvant être partielle entre la molécule d'ARNi et l'ARNm ciblé (voir paragraphe 1.2.3 de l'introduction bibliographique). Autrement dit, ces effets apparaissent lors d'un appariement partiel entre le siRNA synthétique à visée thérapeutique et un transcrite partageant une homologie de séquence avec l'ARNm ciblé ²²⁶. L'utilisation du logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/Blast.cgi>) permet dans un premier temps de comparer la séquence ciblée par le siRNA à l'ensemble des transcrits endogènes répertoriés dans une base de données (NCBI) et de donner leur pourcentage d'identité. Au vue de ces analyses plusieurs séquences de siRNA sont choisies car représentant peu de risque de générer des effets non spécifiques et testées *in vitro* afin de sélectionner la molécule de siRNA permettant d'inhiber spécifiquement l'ARNm cible avec la meilleure efficacité.

L'introduction d'acides nucléiques par transfection *in vivo* de siRNAs peut également induire un arrêt total de la traduction non spécifique du transcrit ciblé. En effet, la cellule peut « percevoir » cette entrée d'acide ribonucléique comme une attaque virale et répondre par une réponse immunitaire assurée par les interférons (IFNs). Cette réponse est mise en place via MDA-5 (melanoma differentiation associated gene 5) dans les cellules non immunes ²⁵ et via la voie des Toll Like Receptor (TLR) 3, 7 et 8 dans les cellules du système immunitaire ²⁶. La résultante finale de cette activation des IFNs est la mort cellulaire des cellules transfectées. En ciblant l'expression d'un gène rapporteur n'ayant aucune activité biologique sur le développement de la tumeur, ces effets non spécifiques induisant la mort cellulaire sont mesurables par le suivi de la progression tumorale. En effet, une telle toxicité des siRNAs dans les cellules d'ostéosarcome sera associée à un ralentissement de la croissance tumorale.

L'ensemble de ces effets non spécifiques semblent être dépendants de la concentration des siRNAs injectés. Plus la concentration est élevée plus l'efficacité du siRNA sera forte mais au détriment de sa spécificité ²²⁷. C'est pourquoi nous avons tout d'abord déterminé la quantité de siRNAs injectés dans le tissu tumoral et la fréquence des injections qui n'auront aucun effet sur la progression de l'ostéosarcome.

1.5. Choix d'investigations

Dans nos modèles d'ostéosarcome, nous avons donc choisi d'injecter les siRNAs complexés avec le liposome RPR209120/DOPE directement dans la tumeur de manière à optimiser la quantité de siRNAs sur le site tumoral. Cependant, l'ensemble des paramètres décrits ci-dessus montre que le développement d'un protocole efficace d'administration de siRNAs à visée thérapeutique est nécessaire avant d'envisager l'utilisation de telles molécules en thérapie dans le modèle animal.

Ainsi, nous avons dans un premier temps déterminé le ratio acides nucléiques / liposomes cationiques le plus efficace pour transférer des siRNAs ²¹⁴ dans les cellules d'ostéosarcome POS-1 ainsi que la quantité de siRNAs injectés et la fréquence des injections permettant d'inhiber de manière spécifique l'expression

Target gene	Pathology	Imaging modality	RNA interference mode	Animal model	RNAi delivery mode
Luciferase, TLR4	N/A	BLI	shRNA	Mouse calf muscle	Local, electroporation
Luciferase	N/A	BLI	siRNA	Mouse skin	Local, co-injection with Luc reporter
Luciferase	N/A	BLI or PET	(⁶⁴ Cu)DOTA-siRNA nanoparticles, transferrin-targeted	Human tumor xenograft	IV injection
Luciferase		BLI	Stabilized siRNA, coinjection with target plasmid	Mouse liver	Pressure injection
Luciferase	Hepatitis B	BLI	siRNA ApoA-1/DOTAP/Chol complex	Mouse infected with HBV, Liver	IV injection
Green fluorescent protein	N/A	BLI	siRNA, pShagLuc	Normal mice	IV, pressure injection
Green fluorescent protein	N/A	FI	LNA-modified siRNA	Mouse, pancreatic adenocarcinoma xenografts	Pressure injection
Green fluorescent protein	Glioma	FI	Nanoparticle-bound siRNA	Mouse, ectopic glioma xenograft	IV injection
cAMP-dependent protein kinase A	Melanoma	FI	siRNA	Mouse, B16F10-EGFP melanoma	Electropulsation
Ribonucleotide reductase M2 subunit	N/A	Gamma-camera	99mTc-siRNA	ACNH human renal adenocarcinoma xenografts	IV injection
Ribonucleotide reductase M2 subunit	Cancer	BLI	siRNA	Mouse, transfected neuroblastoma xenograft	Pressure injection
Alpha-v integrin	Cancer	BLI	SIRNA/CDadamtane-PEG nanoparticles non-targeted	Mouse, neuroblastoma xenograft	IV injection
HIF-1a	Cancer	BLI	IVT siRNA, liposomal complex	Mouse PC3-Luc prostate xenograft	Local, intratumoral injection
CXCR4	Glioma	BLI	SIRNA-JetPEI complex	Mouse U251-HRE glioma HIP-1a/Luc reporter	Local, intratumoral injection
Keratin K6a mutation	Breast cancer	BLI, MRI	shRNA	Mouse, orthotopic and disseminated cancer	IV injection
P-glycoprotein	Pachyonychia congenita	BLI	shRNA, bicistronic vector	Mouse, skin	Local, intradermal
	Cancer	BLI	shRNA	Mouse, MDR1-Rluc MDR1-Fluc Fusion protein expression in tumor and liver cells	Pressure injection

Luc, luciferase; BLI, bioluminescence imaging; FI, fluorescence imaging; PET, positron emission tomography; shRNA, small hairpin RNA; siRNA, small interfering RNA; IVT, in vitro transcription; IV, intravenous.

Tableau 6 : Exemples d'utilisation des techniques d'imagerie pour la mise au point de protocoles basés sur l'injection de molécules d'ARNi. Les méthodes d'imagerie non invasives permettent de détecter de façon atraumatique pour l'animal des signaux issus de composés fluorescents, radioactifs ou de cellules cibles par expression d'un gène rapporteur. Dans la mise au point de protocole basée sur l'administration de siRNAs la technique la plus utilisée vise à inhiber l'expression d'un gène rapporteur tel l'EGFP ou la luciférase dont l'activité est mesurable par des techniques de bioluminescence *in vivo* (BLI). D'après Bogdanov ²³².

d'un transcrit dans le microenvironnement tumoral. Une séquence de siRNA contrôle (CT-siRNA) ne possédant aucun transcrit complémentaire dans les cellules de souris et de rat a servi de témoin négatif.

Un moyen simple et rapide de déterminer les paramètres de transfection de ces lignées cellulaires et des protocoles d'injection de siRNAs *in vivo* est de cibler l'expression d'un gène rapporteur. Les méthodes d'imagerie optique mesurant la bioluminescence et la fluorescence apportent désormais de nouvelles perspectives dans le suivi de l'évolution du processus tumoral chez le petit animal. Ce sont des méthodes non invasives, donc non traumatiques et indolores, de haute sensibilité et non dangereuses pour l'expérimentateur comparativement aux méthodes d'imagerie nucléaire utilisant la radioactivité. Par des acquisitions sur des temps relativement courts, elles permettent de visualiser des émissions de photons associées à la présence de cellules exprimant la luciférase (bioluminescence) ou la GFP (green fluorescent protein, fluorescence). Outre leur simplicité de mise en œuvre (la détection se fait généralement par une simple caméra CCD refroidie) et leur coût modéré par rapport aux techniques de radiomarquages (PET et SPECT), ces techniques présentent également l'avantage d'une résolution temporelle élevée bien adaptée à l'étude des phénomènes cinétiques rapides.

Cependant, la fluorescence émise par la GFP après excitation est malheureusement confondue avec la forte auto fluorescence de l'animal. De plus, les signaux ne diffusent que sur une très faible distance ce qui entraîne une perte de signal au fur et à mesure du passage des différents tissus ²²⁸. Les techniques d'imagerie optique par bioluminescence ayant une meilleure résolution sont majoritairement développées et utilisées ; l'activité enzymatique de la luciférase est quantifiable *in vitro* et *in vivo* après ajout de son substrat (la D-Luciférine) ²²⁹. Elles permettent de caractériser au cours du temps le développement ou la régression du cancer, la présence de métastases, l'effet d'agents pharmaceutiques ²³⁰. Ces techniques permettent également le suivi de l'expression génique ²³¹ pour le développement de nouveaux protocoles de thérapie génique pour la validation de méthodes de transfert de gène ou encore de protocole utilisant les molécules d'ARNi en ciblant l'expression de la luciférase elle-même (Tableau 6 ci-contre) ^{219,233}. Dans un modèle murin de métastases osseuses secondaires au cancer de la prostate exprimant la luciférase, l'imagerie par bioluminescence a permis de valider l'efficacité d'un vecteur de transfert de siRNA. Le protocole ainsi développé a ensuite pu être appliqué à une séquence de siRNA à visée thérapeutique

permettant de réduire la formation des métastases au sein du tissu osseux ²³⁴.

Dans ce but, nous avons modifié des lignées d'ostéosarcome pour une expression stable et constitutive de la luciférase *firefly*. Ces cellules nous ont ainsi permis dans un premier temps de sélectionner une séquence de siRNA ciblant efficacement le transcrit de la luciférase et de déterminer le rapport de charge acides nucléiques / liposome cationique nécessaire à la transfection des cellules d'ostéosarcome : ratio 1:6 respectivement. Dans un second temps, le développement de modèle d'ostéosarcome exprimant la luciférase a permis d'optimiser un protocole d'administration de siRNAs efficace pour diminuer la BLI par ciblage de l'expression de la luciférase et spécifique car n'interférant pas avec la progression tumorale.

2. ARTICLE 1

Avantages de l'imagerie par bioluminescence pour évaluer l'efficacité de traitement par des siRNAs ou par des agents de chimiothérapie dans des modèles murins d'ostéosarcome

Julie Rousseau, Virginie Escriou, Pierre Perrot, Gaëlle Picarda, Céline Charrier, Daniel Scherman, Dominique Heymann, Françoise Rédini et Valérie Trichet
Cancer Gene Ther. 2010 Jun;17(6):387-97. Epub 2010 Jan 15.

Principaux résultats obtenus :

Les cellules d'ostéosarcome de souris POS-1 et de rat OSRGA ont été modifiées par technologie lentivirale pour exprimer stablement la luciférase dont l'activité est détectable et quantifiable par imagerie en bioluminescence *in vivo* (BLI). L'analyse de ces deux modèles ainsi développés (LucF-POS-1 et LucF-OSRGA) a montré l'intérêt de la BLI comme technique efficace et reproductible pour des détections plus précoces et sensibles des tumeurs de type ostéosarcome. La BLI présente notamment un avantage par rapport à la mesure des volumes tumoraux pour détecter des phénomènes de nécrose caractéristiques d'un développement tumoral (notamment dans le modèle LucF-OSRGA) ou induits par un traitement de chimiothérapie par exemple (ifosfamide). De plus, le modèle LucF-POS-1, qui montre une corrélation entre l'évolution de la BLI et la croissance tumorale, a par la suite été utilisé pour déterminer la quantité de siRNAs anti luciférase (n'ayant pas d'activité anti-tumorale propre) n'entraînant pas d'effets sur le développement de l'ostéosarcome. Pour améliorer la stabilité et la transfection des cellules *in vivo*, les siRNAs ont été complexés avec un liposome cationique (RPR209120/DOPE, Dr. Escriou, Paris). Plusieurs études ont montré que l'injection de 5 à 10µg de siRNA complexé par voie intra-tumorale était associée à un ralentissement de la croissance tumorale. Seul le traitement des animaux avec 2,5µg de siRNA n'a pas interféré avec le comportement tumoral (cinétique de développement, caractéristiques cliniques) tout en étant associé à une inhibition d'au moins 50% de l'activité luciférase.

NB : A suivre, la publication complète et en annexe 2 les figures 2, 3 et 4 agrandies et en couleur

ORIGINAL ARTICLE

Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models

J Rousseau^{1,2}, V Escriou³, P Perrot^{1,2,4}, G Picarda^{1,2}, C Charrier^{1,2}, D Scherman³,
D Heymann^{1,2}, F Rédini^{1,2} and V Trichet^{1,2}

¹INSERM, U957, Nantes, France; ²Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Nantes, France; ³INSERM, U 640, CNRS, UMR8151, Université Paris Descartes, and École Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Paris, France and ⁴CHU de Nantes, Hôtel-Dieu, Service de Chirurgie Plastique et des Brûlés, Nantes, France

Osteosarcoma is the most common malignant primary bone tumor for which pertinent preclinical models are still needed to develop new therapeutic strategies. As osteosarcoma growth is strongly supported by bone resorption, previous studies have inhibited the cytokine receptor activator of nuclear factor- κ B ligand using antibodies or recombinant proteins. However, its expression has not yet been inhibited using genetic approaches using small interfering RNA. To optimize the delivery of small interfering RNA to its cellular target and demonstrate their efficiency *in vivo*, two new osteosarcoma models expressing the firefly luciferase enzyme were developed. These luciferase-expressing osteosarcomas showed conserved osteolytic and osteogenic activities in mice and were detectable by *in vivo* bioluminescence imaging. In comparison with measurement of tumor volume, bioluminescence analysis enabled earlier tumor detection and revealed extensive cell death in response to ifosfamide treatment. Finally, by targeting the luciferase expression into osteosarcoma, we established a protocol for *in vivo* administration of small interfering RNA combined with cationic liposome.

Cancer Gene Therapy advance online publication, 15 January 2010; doi:10.1038/cgt.2009.89

Keywords: osteosarcoma; RNA interference; bioluminescence imaging; efficient delivery

Introduction

Osteosarcoma, defined as a rare malignant disease, is the most common primary bone tumor in both children and young adults, with a median age of 18 years at diagnosis.¹ Its development is characterized by the formation of immature bone or osteoid tissue by tumor cells, and is frequently associated with para-tumoral osteolysis causing painful bone fragility, frequently resulting in bone fractures. After initial diagnosis made by anatomopathology on open biopsy, treatment consists of tumor resection by surgery combined with pre- and post-operative chemotherapy (high-dose methotrexate, cisplatin and doxorubicin with ifosfamide in the post-operative phase). Over past several decades, the survival rate has improved, currently reaching approximately 70% at 5 years, but only 25% when lung metastases are detected at diagnosis.² Moreover, osteosarcoma patients who

poorly respond to chemotherapy have a high risk of relapse.³ Therefore, a need for new therapeutic options still exists.⁴

The development of primary bone tumors and bone metastases within the bone microenvironment is associated with a vicious cycle between tumor proliferation and bone resorption.⁵ This osteolysis is largely due to the activation and differentiation of osteoclasts through the interaction of the cytokine receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL or tumor necrosis factor superfamily member 11) with its receptor RANK. Several studies have demonstrated in various bone metastases models that blockade of RANKL using soluble decoy receptors resulted in an inhibition of osteolysis and slowdown of tumor progression (by soluble RANKL^{6–8} or by the decoy receptor osteoprotegerin^{9–12}). The reduction in tumor incidence and growth by RANKL inhibition has also been demonstrated in osteosarcoma models.^{13,14} As blocking RANKL was proven to be effective in several *in vivo* models, a fully humanized monoclonal antibody directed against RANKL (Denosumab) has been developed for clinical use, and is currently being evaluated in several clinical trials for the treatment of patients with lytic bone lesions secondary to multiple myeloma, prostate or breast cancer.¹⁵

Currently, RNA interference (RNAi) is being explored as a potential treatment for cancer.^{16,17} So far, only few

Correspondence: Dr V Trichet, INSERM U957, Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France.

E-mail: valerie.trichet@univ-nantes.fr

Received 21 June 2009; revised 20 September 2009; accepted 1 December 2009

preclinical studies have tested the affect of injection of RNAi molecules on bone tumor models. Moreover, these studies have predominantly decreased the expression of genes associated with cell cycle.^{18–21} In osteosarcomas, one way to evaluate the therapeutic potential of small interfering RNA (siRNA) would be to target expression of RANKL in comparison with its blockage by antibody. However, the main challenge for the successful use of siRNA *in vivo* is to achieve an efficient delivery of these molecules to the target tissue without off-target effects.^{22–24} This is the purpose of this study. Osteosarcoma models that have been established in our laboratory,^{13,25} were modified to stably express the firefly luciferase using lentiviral gene transfer, then the luciferase expression was targeted with siRNA combined with the cationic liposome RPR209120 2-{3-[Bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino}-N-ditetradecyl carbamoyl methyl-acetamide and DOPE (dioleoyl phosphatidyl ethanolamine; Avanti Polar Lipids)^{26,27} to determine the optimal delivery method for siRNA in osteosarcoma models.

Materials and methods

Osteosarcoma cell culture

Cells (OSRGA) derived from a rat transplantable osteosarcoma model originally induced by radiation²⁸ were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone Perbio, Bezons, France). The POS-1 cells, originally isolated from a spontaneous osteosarcoma developed in a C3H/HeN mouse, were a kind gift from Dr A Kamijo.²⁹ They were cultured in RPMI (Lonza) with 10% fetal bovine serum.

Firefly luciferase gene cloning into lentiviral vector

The pGL3-CT plasmid (Promega, Charbonnières, France) that contains the complementary DNA encoding firefly luciferase (LucF) was modified by oligonucleotide insertion to replace the *Hind*III and *Xba*I sites by *Bam*HI and *Mlu*I restriction sites, respectively. Oligonucleotides 5'-AGCTACGTGGATCCAGATCTCAGT-3' and 5'-AGCTACTGAGATCTGGATCCACGT-3' containing a *Bam*HI site and the oligonucleotides 5'-CTAGTACTGTCGACACGCGTTAGA-3' and 5'-CTAGTCTAACGCGTGTCGACAGTA-3' containing a *Mlu*I site were annealed and cloned into the pGL3-CT plasmid. The modified pGL3-CT plasmid was used to excise the *LucF* gene using *Bam*HI and *Mlu*I enzymes. The excised *LucF* gene was cloned into the pLNT/Sffv-MCS plasmid³⁰ between the *Bam*HI and *Mlu*I sites. The resulting plasmid was designated pLNT-LucF and used to produce lentiviral particles.

Lentiviral production and osteosarcoma cell transduction

Lentivirus was produced using the ViraPower Lentiviral Expression System according to the manufacturer's guidelines (Invitrogen Life Technologies, Cergy-pontoise, France). Briefly, 6×10^6 HEK293FT cells (human embryonic

kidney cells optimized for viral production) were seeded and transfected 24 h later with 3 μ g of the optimized packaging mix, 9 μ g of pLNT-LucF and 0.9 μ g of pFG12³¹ that encodes the enhanced green fluorescent protein (EGFP). Virus-containing supernatants were collected 48 h post-transfection and concentrated 60-fold by ultrafiltration. For titration, serial dilutions of virus-containing supernatants were tested on HEK293FT cells that were analyzed for EGFP expression 4 days post-infection by flow cytometry (FACSCalibur Flow cytometer, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Two million EGFP-viral units per ml were typically obtained.

To generate stably modified osteosarcoma cells, 10^3 POS-1 or OSRGA cells were seeded in wells of a 96-well plate in 100 μ l medium and infected with 10 or 50 EGFP-viral units per cell. After 2 weeks, EGFP expression level was quantified by flow cytometry. In addition, luciferase activity was measured for varying numbers of cells in a 96-well optical bottom plate (NUNC, Dominique Dutscher, Issy les Moulineaux, France) with 50 μ l of lysis substrate buffer from the 'Steady-Glo Luciferase Assay System' (Promega) in each well. Light measurements were carried out in duplicate by spectrophotometry (VICTOR plate reader, Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada) for 10 s and results were corrected for background luminescence from parental cells.

RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was extracted from LucF-POS-1 and parental POS-1 cells using TRIzol reagent (Invitrogen). First strand complementary DNA was synthesized at 37 °C for 1 h from 5 μ g of total RNA in a 50 μ l mix containing RT buffer, 0.5 μ g of random primers, 0.5 mM dNTP mix, 20 U RNaseOUT and 400 U murine moloney leukemia virus-reverse transcriptase (all from Invitrogen). The real-time PCR contained 10 ng reverse-transcribed total RNA, 300 nM forward and reverse primers and 5 μ l 2 \times SYBR green buffer (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) in a final volume of 10 μ l. Polymerase chain reactions were carried out in triplicate from several RNA extractions, in 96-well plates using the Chromo4 System (Bio-Rad). Oligonucleotides 5'-CCACAAGGACAGAGTCAGAT TACA-3' and 5'-TGGCTCAGATAGGAGGGGTA-3' were used to amplify mouse core-binding factor alpha (Cbfa-1). *Mus musculus* hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt 1, 5'-TCCTCCTCAGACCG CTTT-3' and 5'-CCTGGTTCATCATCGCTAATC-3') and cyclophilin B (cycloB, 5'-ACAGGAGGAAAGAG CATCTA-3' and 5'-TCTTGACTGTAGTTATGAAGA ACT-3') were used as invariant controls. Analyses were performed using the Vandesompele method.³²

Alkaline phosphatase activity

Total protein was extracted from LucF-OSRGA and OSRGA cells using lysis buffer (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, Nonidet P-40 1%, sodium deoxycholate 0.25%, NaF 1 mM, leupeptine 10 mg/ml, aprotinin 10 mg/ml, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.5 mM and glycerol 10%). Total protein concentrations were determined using a

bicinchoninic acid-based (Sigma, St Quentin-Fallavier, France) method. Alkaline phosphatase activity was assayed using *p*-nitrophenyl phosphate (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) as a substrate, and the production of *p*-nitrophenol per minute was determined by measuring absorbance at 405 nm. The ALP activity measurements were carried out in triplicate from multiple extractions.

Experimental osteosarcoma models

All animals for *in vivo* experimentations were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethics Committee and under the supervision of authorized investigators. The mice were anesthetized by inhalation of an isoflurane–air mixture (2%, 0.21 per min per mouse) before any surgical procedure. Male C3H/HeN mice (4-week old; Elevages Janvier, Le Genest Saint Isle, France) or 4-week-old male nude NMRI mice (Charles River, St Germain de L'Arbresle, France) were used for LucF-POS-1 or LucF-OSRGA tumor induction, respectively. For tumor induction, mice were subcutaneously injected with 5×10^6 LucF-POS-1 or 2×10^6 LucF-OSRGA cells in 50 μ l phosphate buffered saline into the footpad. From developed tumors, $2 \times 2 \times 2$ -mm³ fragments were excised and transplanted into naive mice.¹³ For fragment insertion, a 5-mm section was made to open the muscle along the tibia, then muscular and subcutaneous wounds were sutured. The tumor volume was quantified by measuring two perpendicular diameters with a vernier calliper and calculated using the formula: $(l^2 \times L)/2$, where *l* is the smallest and *L* the largest diameter).

Bioluminescence imaging

The bioluminescence was measured several times a week after luciferase substrate injection into anesthetized mice. On the basis of 25 g weight, mice were intraperitoneally injected with 250 μ l of a Rompun–Ketalar solution (8 and 13%, respectively, in phosphate buffered saline) before intraperitoneal injection of 3 mg D-luciferin (Interchim, Montluçon, France) dissolved in 250 μ l of water. A Photon Imager (Biospace, Paris, France) was used to measure and visualize the photons released during substrate degradation by the luciferase. The BLI is expressed as counts per minute (c.p.m.) after background subtraction.

Ifosfamide treatment

At 6 days after LucF-POS-1 osteosarcoma transplantation, mice (*n* = 5) were treated every week for 3 consecutive days with 60 mg per kg ifosfamide (ASTA Medica laboratories, Mérignac, France) or vehicle only, administered by intraperitoneal injection. Tumor volume was measured twice a week and BLI was measured once.

Radiological and microscanner analyses

Radiographs of tumor-bearing legs were obtained post-mortem with a mammography PLANMED Sophie apparatus (SN RAH 40710, Helsinki, Finland). In addition, bone architecture was analyzed for tumor

bearing tibia using the high-resolution SkyScan-1072 X-ray micro-computed tomography system for small animal imaging (SkyScan, Kartuizersweg, Belgium).

Histology

Tumor tissues were fixed in 10% buffered formaldehyde, and after embedding in paraffin, 5- μ m-thick sections were mounted on glass slides. Sections were stained with Masson trichrom. Analysis of necrotic and fibrotic areas was performed on each section using a DMRXA microscope (Leica, Nussloch, Germany).

siRNA experiments

Small interfering RNAs were purchased from Eurogentec, Angers, France. The LucF siRNA was designed to target the luciferase gene sequence 5'-CUUACGUGAGUACUUCGA-3'. The control (CT) siRNA (sense: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUUU-3') did not show significant homology to any mouse messenger RNA sequence according to BLAST database searches. Small interfering RNAs were combined with carrier DNA (a plasmid containing no eucaryotic expression cassette) and the cationic liposome RPR209120/DOPE as described with the same amount of plasmid DNA pre-mixed with siRNA before addition of the cationic liposome at the appropriate concentration.²⁶ As this liposome has three positive groups, a ratio of 6 nmol cationic liposome per μ g of nucleic acid corresponds to a charge ratio of 6. To determine the best nucleic acid / liposome charge ratio for *in vivo* transfection, we tested in triplicate a range of siRNA quantities (from 0.05 to 0.4 μ g) and ratios (from 2 to 8) on 2×10^5 luciferase-expressing osteosarcoma cells seeded in a 96-well optical bottom plate. Animals bearing a LucF-osteosarcoma were injected intratumorally every 2 days with 2.5–10 μ g of siRNA combined with liposomes at ratio 6. The efficiency was evaluated by BLI and tumor volume measurements.

Statistical analysis

All analyses were performed using GraphPad InStat v3.02 software (La Jolla, CA). *In vivo* experimentation results (ifosfamide and siRNA treatments) were analysed with the unpaired nonparametric Mann–Whitney *U* test using two-tailed *P*-values. Results with *P* \leq 0.05 were considered significant.

Results

Mouse POS-1 and rat OSRGA cell modification by lentiviral transduction

A mixture of luciferase-encoding lentiviral particles (LucF-virus) and EGFP-encoding lentiviral particles (EGFP-virus) was produced. Using a ratio of 10 EGFP viral particles for each POS-1 cell and 50 viral particles for each OSRGA cell, an efficient and homogenous modification of cells was obtained, with, respectively, 97 and 95% of cells expressing EGFP, as determined by flow cytometry (Figure 1a). As LucF and EGFP plasmids were used at a ratio of 10:1 for the lentiviral production, it was

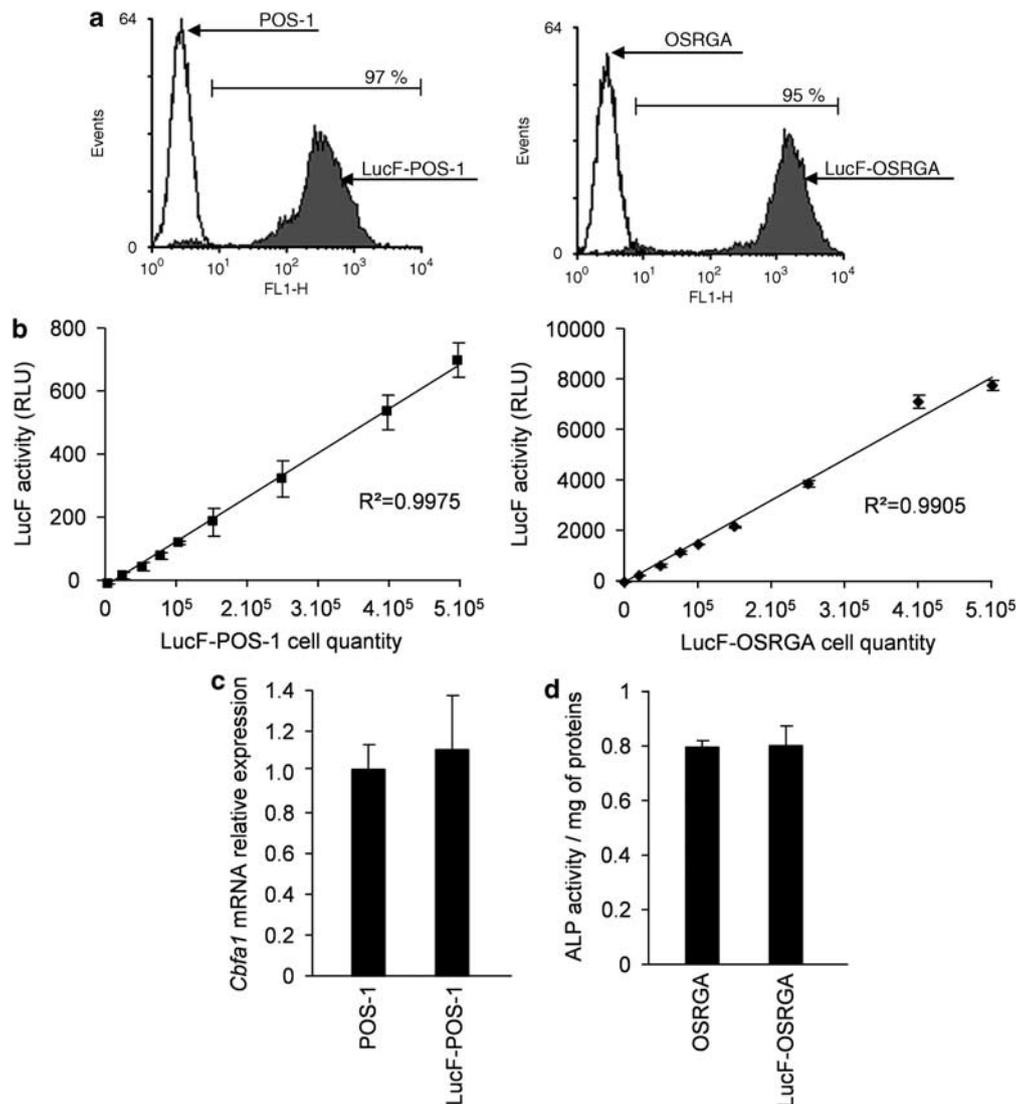


Figure 1 *In vitro* characterization of luciferase-expressing osteosarcoma cells. (a) Flow cytometry analyses of enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression are shown for LucF-POS-1 and parental POS-1 or OSRGA cells using the WinMDI 2.8 software. (b) Luciferase activity is shown for varying numbers of LucF osteosarcoma cells. (c) *Cbfa1* expression level was compared between LucF-POS-1 and parental POS-1 cells by real time PCR analysis. The results are given as a ratio of relative expression using *Hprt 1* and *cycloB* as housekeeping genes. (d) Comparison of alkaline phosphatase (ALP) activity per mg of total protein between LucF-OSRGA and parental OSRGA cells. (c, d) Data are shown as mean \pm s.d.

assumed that the *LucF* gene was transferred as efficiently as the *EGFP* gene. The modified POS-1 and OSRGA cells showed stable luciferase activity proportional to cell number over a period of at least 3 months in culture (Figure 1b), and were designated as LucF-POS-1 and LucF-OSRGA cells. The LucF-OSRGA cells seemed to be more efficiently transduced than LucF-POS-1 cells, as EGFP and luciferase expression was 3.5- and 13-fold higher, respectively, in LucF-OSRGA as compared with LucF-POS-1 cells. We were unable to obtain a higher POS-1 cell transduction efficiency as cells died in culture when a higher multiplicity of infection was used. To maintain the initial heterogeneity and biological properties of osteosarcoma cells, modified cells were maintained without cloning.

Several *in vitro* tests were next performed to check whether the lentiviral transduction had affected the osteoblastic phenotype of transformed cells. Real-time PCR analyses showed that the expression level of core-binding factor alpha1 (*Cbfa1*/Runx-2), which is an essential transcription factor for osteoblast differentiation, was similar between LucF-POS-1 and parental POS-1 cells (Figure 1c). Regarding LucF-OSRGA cells, alkaline phosphatase activity (Figure 1d) and mineralized nodule formation (data not shown³³) were not altered as compared with osteogenic parental cells. Moreover, LucF-POS-1 and LucF-OSRGA cells retained their tumorigenic properties. Injection of transformed cells into the footpad of mice resulted in primitive tumors fragments of which were successfully transplanted into

naive mice to reproduce the complete osteosarcoma animal models, as previously described.^{34,25}

LucF-OSRGA osteosarcoma transplanted in nude mice enables early in vivo tumor detection while maintaining osteogenic and osteolytic properties

The OSRGA osteosarcoma model was originally developed in male Sprague–Dawley rats. Owing to the large amount of D-luciferin required for BLI detection in rats, we decided to establish a LucF-OSRGA transplant model in immunodeficient mice. For this model, a fragment of a LucF-OSRGA tumor from a footpad was transplanted adjacent to the tibia of recipient mice. Tumor development was observed in all transplanted immunodeficient mice. Bioluminescence was detected as early as day 5 (Figures 2a and b), whereas tumors were clinically detected only between day 21 and 38 after tumor implantation (Figure 2c). Until day 20, the bioluminescence increased progressively, suggesting tumor cell proliferation even in the absence of visible tumor. Between day 21 and 30,

bioluminescence stabilized, and finally decreased from day 32 to 51 (2.5-fold decrease). In contrast, the mean tumor volume continued to increase until the animal was killed (day 51). The discrepancy between BLI and tumor volume could be partially explained by necrotic cell death. Indeed, histological analyses showed large necrotic, fibrotic regions (Figure 2d), which were also observed within unmodified OSRGA tumors. The necrotic, fibrotic areas are included in the measurement of tumor volume, but have a lower luciferase activity than healthy, non-necrotic tumor areas.

Finally, the extensive bone remodeling that is normally associated with OSRGA osteosarcoma²⁵ was similarly observed with LucF-OSRGA tumors. Radiography and microscanner analyses showed characteristic osteolytic lesions and ectopic bone formation along the cortical bone at the tumor implantation site (Figures 2e and f).

Similar results were obtained for LucF-OSRGA tumors in the footpad of mice: (1) earlier tumor detection by BLI than by measurement of tumor volume, (2) lack of correlation

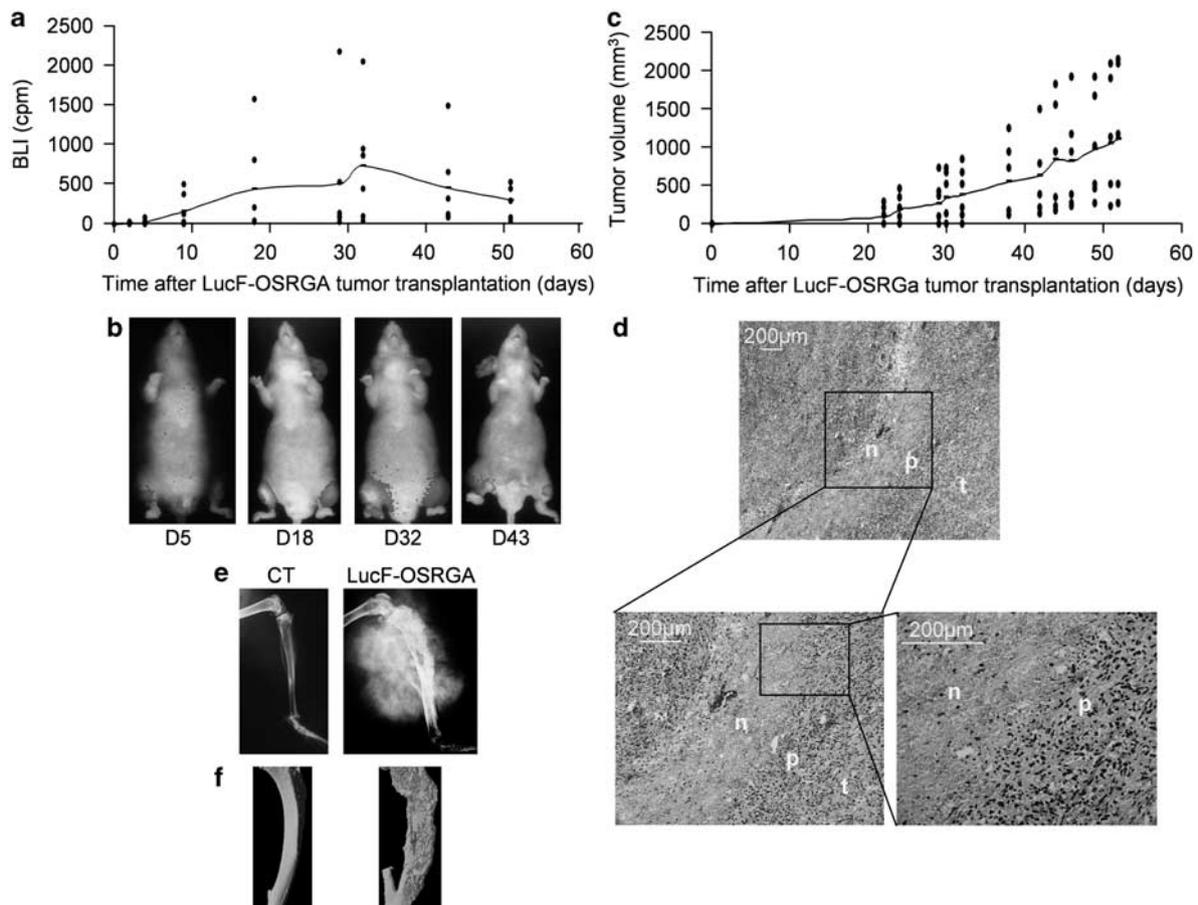


Figure 2 Characterisation of LucF-OSRGA osteosarcoma transplanted in immunodeficient mice. (a and b) Bioluminescence activity evolution after LucF-OSRGA tumor fragment implantation (three mice on both legs) by individual measures (points) and mean curves (a) associated with bioluminescence images showing luciferase detection as an example at day 5, 18, 32 and 43 of tumor development (b). (c) As for the bioluminescence activity, evolution of tumor volume is shown after tumor induction. (d) Representative images of LucF-OSRGA tumor sections after Masson Trichrom staining. Original magnifications are indicated. Necrotic, fibrotic tissue is identified as a green cell-poor region (n) surrounded by a region containing numerous pyknotic nuclei (p). Viable tumor cells are present in surrounding areas (t). (e and f) Radiographic (e) and microscanner images (f) are shown for a representative transplanted LucF-OSRGA tumor.

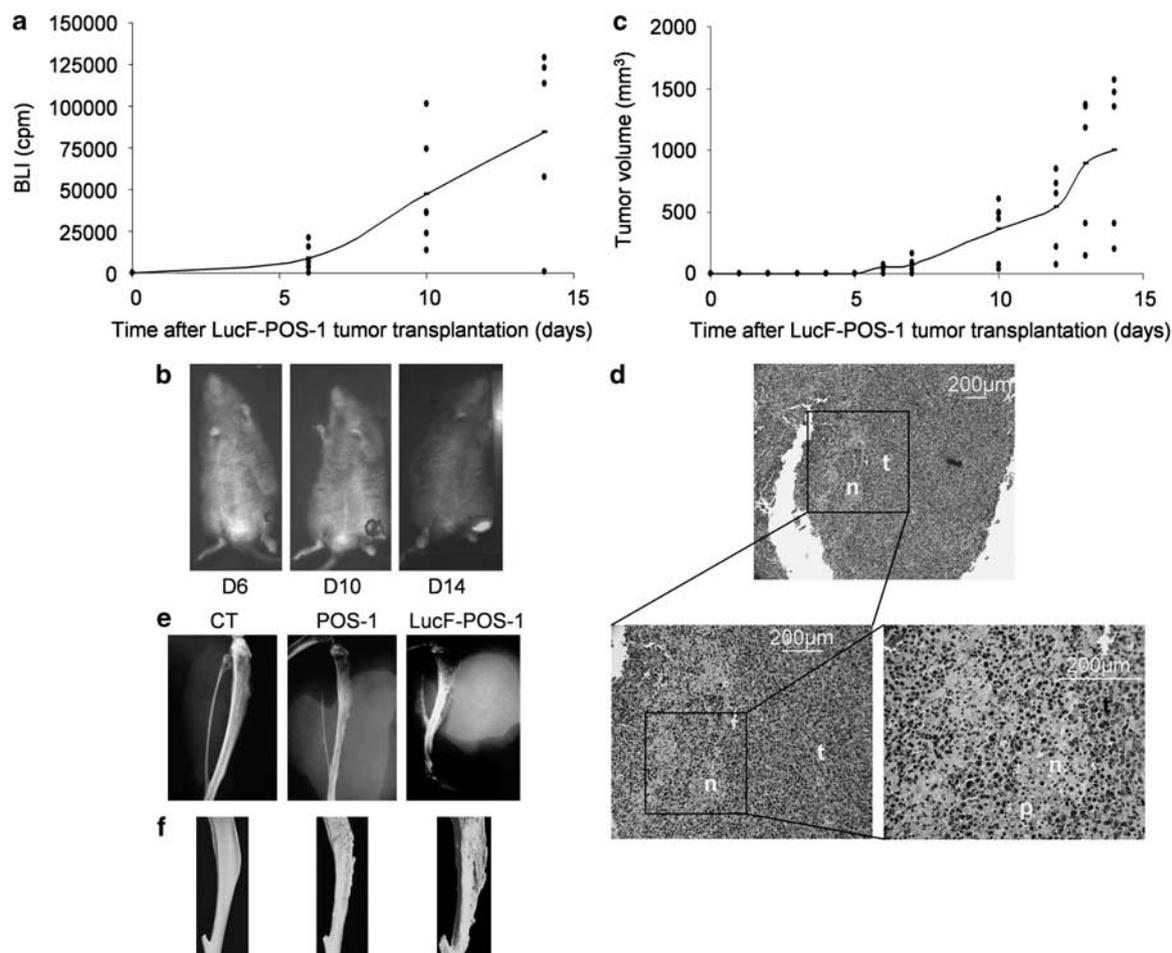


Figure 3 Characterization of LucF-POS-1 osteosarcoma transplanted into syngeneic mice. (**a** and **b**) Bioluminescence activity evolution after LucF-POS-1 tumor fragment implantation ($n=5$) by individual measures (points) and mean curves (**a**) associated with bioluminescence images showing luciferase detection as an example at day 6, 10 and 14 of tumor development (**b**). (**c**) As for the bioluminescence activity, evolution of tumor volume is shown after tumor induction. (**d**) Representative images of LucF-POS-1 tumor sections after Masson Trichrom staining. Original magnifications are indicated. Small necrotic, fibrotic areas are identified as cell-poor region containing numerous pyknotic nuclei (n). Viable tumor cells are present within surrounding areas (t). (**e** and **f**) Radiographic (**e**) and microscanner images (**f**) are shown for a representative transplanted LucF-POS-1 tumor.

between BLI and tumor volume and (3) preservation of OSRGA osteogenic properties (data not shown).

Tumor volume and bioluminescence measurements correlate during osteolytic LucF-POS-1 osteosarcoma development in syngeneic mice

Fragments of a primary LucF-POS-1 footpad tumor were transplanted adjacent to the tibia of syngeneic mice. Bioluminescence signals were observed as early as day 6 (Figure 3a and b), whereas tumors were not measurable at that time (Figure 3c). Longitudinal analysis showed that bioluminescence signal intensity increased exponentially and correlated with tumor volume. Moreover, such correlation was observed for the LucF-POS-1 footpad tumors as well (data not shown). Histological analyses of transplanted LucF-POS-1 tumors showed minor necrotic, fibrotic regions (Figure 3d), which were much smaller than those observed within

LucF-OSRGA tumors (Figure 2d). Radiography and microscanner analyses revealed osteolytic lesions resulting in cortical destruction comparable with those observed for parental POS-1 tumors (Figures 3e and f), suggesting that the interaction between osteoclasts and tumor cells that has been previously described for parental POS-1 cells¹⁴ was maintained for luciferase-expressing POS-1 cells.

Bioluminescence is superior to measurement of tumor volume to reveal LucF-POS-1 osteosarcoma growth inhibition in response to chemotherapy

Using the LucF-POS-1 model, in which a good correlation was observed between bioluminescence signal intensity and tumor volume for untreated tumors, we evaluated whether BLI enabled earlier detection of tumor responsiveness to chemotherapy, as compared with the measurement of tumor volume. The conventional antic-

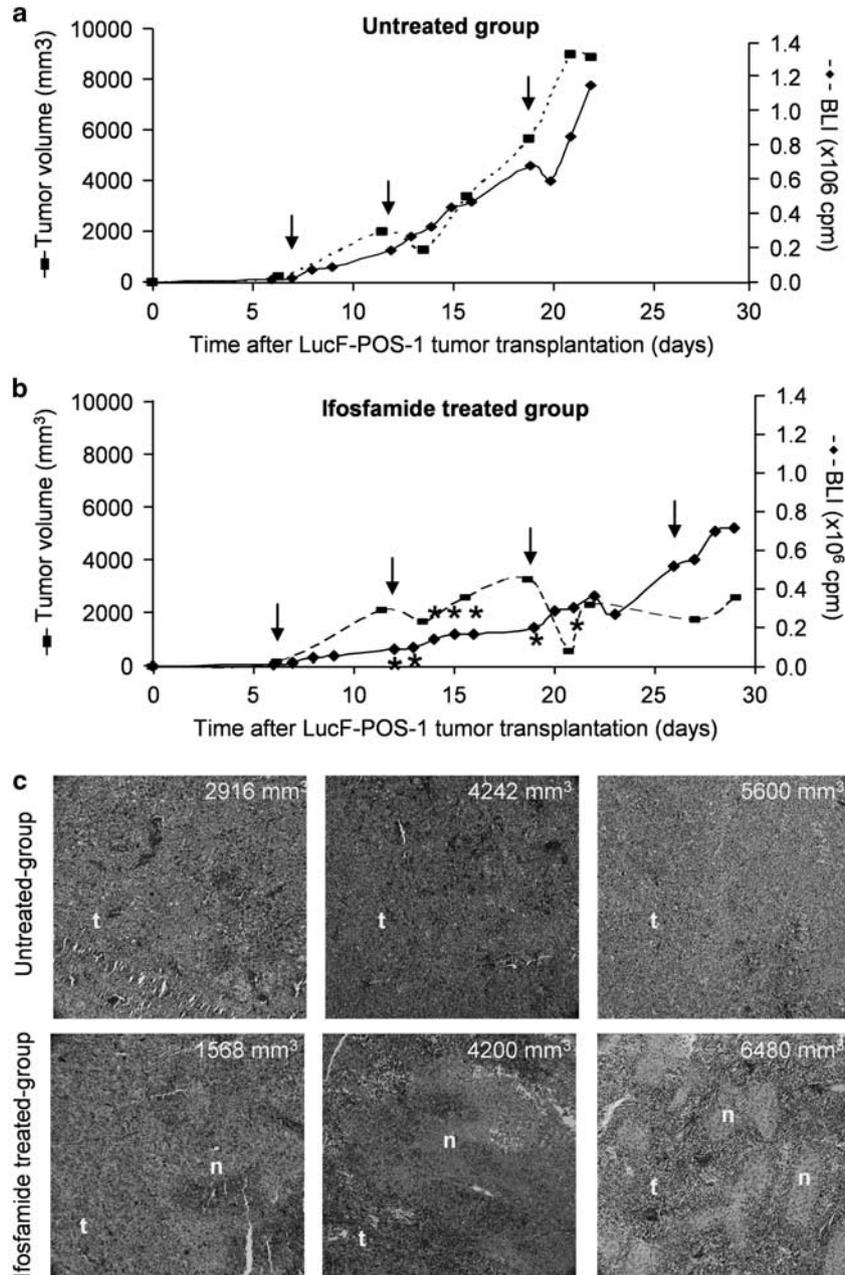


Figure 4 Response of LucF-POS-1 osteosarcoma to ifosfamide treatment. **(a and b)** Progression of mean tumor volume (solid lines with diamonds) and mean bioluminescence (dashed lines with squares) are shown for untreated **(a)** or ifosfamide-treated **(b)** mice ($n=5$) bearing LucF-POS-1 tumors. Ifosfamide treatments are indicated by arrows. Asterisks indicate significant differences ($P<0.05$) between mean tumor volume of the treated and the untreated group. **(c)** Comparison between the untreated and ifosfamide-treated groups by histological analyses of tumor sections after Masson Trichrom staining revealed the presence of extensive necrotic, fibrotic tissue surrounded by areas containing numerous pycnotic nuclei (n) in tumors from ifosfamide-treated mice, whereas tumors from untreated mice contained predominantly areas of proliferating tumor cells (t).

ancer drug ifosfamide has previously shown partial efficacy in the treatment of rats bearing OSRGA tumors.³⁴ In this study, we extended the ifosfamide use in the mouse POS-1 osteosarcoma model. Mice bearing LucF-POS-1 tumors were treated with ifosfamide or vehicle only for 3 consecutive days every week. A correlation between bioluminescence and tumor volume measurements was observed for the vehicle-treated group

(Figure 4a), similar to results described above. In the ifosfamide-treated group, a slow concomitant increase of tumor volume and BLI was observed until day 19 after tumor implantation (Figure 4b). Between days 12 and 21, the mean tumor volume was significantly lower in the treated group as compared with the untreated group. Statistical analyses were not performed after day 21 as several mice either died or were killed in the untreated

group as a result of tumor progression. Therefore, the LucF-POS-1 tumor growth significantly slowed down after one sequence of ifosfamide treatment, and an increase in the survival rate was observed in the treated group (data not shown). Moreover, radiographic analyses of tibia bearing LucF-POS-1 tumor showed a lower rate of bone remodeling in the treated group compared with the untreated group (small osteolytic areas with cortical integrity versus extensive osteolytic areas associated with cortical destruction in untreated control mice; data not shown).

In the ifosfamide-treated group, the stabilization of BLI from day 20 to the end of the experiment was suggestive of a complete inhibition of LucF-POS-1 osteosarcoma growth, whereas tumor volume measurements indicated a slowdown rather than an arrest of tumor growth (Figure 4b). After day 25, the correlation between bioluminescence and tumor volume was lost within the treated group. Histological analyses of LucF-POS-1 tumors from the ifosfamide-treated group showed more extensive necrotic, fibrotic areas than those of the untreated group (Figure 4c). These necrotic areas are part of the tumor mass and reflect the response to chemotherapy, but poorly express the luciferase, leading to a discrepancy between BLI and tumor volume measurements.

Luciferase expression can be successfully targeted by siRNA

As described above, the development of large necrotic, fibrotic areas observed in LucF-OSRGA tumors resulted in a poor correlation between BLI and tumor volume measurements as tumor development progressed (Figures 2a, c and d), whereas a close correlation between these two parameters was observed during LucF-POS-1 tumor development (Figures 3a and c). Therefore, the latter model was used to establish an *in vivo* siRNA delivery protocol.

We compared the effects of siRNA directed against luciferase messenger RNA (LucF siRNA) with the effects of control siRNA (CT siRNA) that lacks a messenger RNA target in mouse cells. Small interfering RNAs were formulated with the cationic liposome RPR209129/DOPE to form lipoplexes that have demonstrated efficient delivery of siRNA targeted toward tumor necrosis factor- α in a model of rheumatoid arthritis.²⁶ This formulation also contained a DNA cargo that was shown to enhance the lipoplexe efficiency.²⁷ First, siRNA transfections were performed on LucF-POS-1 cells *in vitro* to determine the most efficient nucleic acid/cationic lipid charge ratio. The highest level of inhibition of luciferase activity (30%) was achieved with 0.1 μ g of LucF siRNA formulated in lipoplexes at a charge ratio of 6 as compared with CT siRNA transfections (data not shown). Other LucF siRNA quantities and charge ratios did not result in greater and specific inhibitions. On the basis of these results, mice bearing a LucF-POS-1 osteosarcoma were treated intratumorally with siRNA formulated in lipoplexes at the optimal charge ratio of 6. In preliminary studies, we tested various quantities of CT

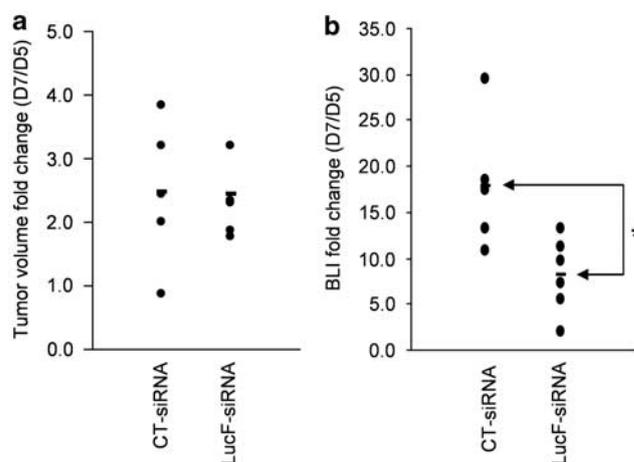


Figure 5 Bioluminescence imaging (BLI) detection after luciferase-targeting small interfering RNA (siRNA) transfection with lipoplexes. Mice bearing LucF-POS-1 osteosarcoma were treated with LucF siRNA or CT siRNA formulated with cationic liposome and a DNA cargo ($n=6$ in each group). The tumor volume (a) and BLI measurements (b) are shown as fold-change between the second (D5) and last day of treatment (D7; asterisks indicates $P < 0.05$).

siRNA (2.5, 5 or 10 μ g) and followed the tumor development. Injections of 2.5 μ g CT siRNA did not alter tumor growth, whereas administration of 5 or 10 μ g CT siRNA resulted in a significant slowdown of tumor progression as compared with untreated mice. Next, we compared the effects of two 2.5- μ g LucF siRNA injections with those of CT siRNA on LucF-POS-1 tumor progression; the first injection was administered when a BLI signal was just detectable (at day 3 after tumor transplantation) and the second injection 2 days later (at day 5). Progression of tumor volume and BLI between day 5 and 7 was compared for the LucF siRNA and CT siRNA-treated groups. As shown in Figure 5a, the fold-increase in tumor volume between day 5 and 7 was similar between the two treatment groups. In contrast, the number of photons detected was significantly (54.5%) lower in the group treated with LucF siRNA, as compared with the group that received CT siRNA (Figure 5b). Thus, our results indicate that liposomal delivery of siRNA can inhibit gene expression in a specific manner in osteosarcoma tumors.

Discussion

Osteosarcomas are malignant tumors that produce variable amounts of bone or osteoid tissue while simultaneously inducing osteolytic lesions. Owing to this clinical heterogeneity, osteolytic or osteogenic preclinical models are in use to develop and evaluate new therapeutic strategies. For example, the therapeutic association of ifosfamide and zoledronic acid was initially performed in the rat OSRGA model³⁴ and next transferred to the French clinical trial OS2006. In this study, two osteosarcoma cell lines POS-1 and OSRGA corresponding to,

respectively, an osteolytic and an osteogenic model were modified to express the firefly luciferase enzyme to enable *in vivo* tumor detection by BLI. Preclinical models of luciferase-expressing osteosarcoma were successfully established with conserved physiological and clinical properties. Indeed, LucF-OSRGA-derived osteosarcomas showed a strong osteogenic activity in nude mice, whereas LucF-POS-1-derived osteosarcomas triggered osteolytic lesions in syngeneic mice.

In addition, the LucF cell detection by BLI provided new insights into the tumor growth kinetics. The osteosarcomas were detected earlier by bioluminescence than by tumor volume measurement, allowing very early treatment monitoring. Today osteosarcoma response to preoperative chemotherapy is based on histopathologic analysis of tumor resection specimen as defined by Huvos,³⁵ in which examination of necrotic fibrotic and viable tumor areas serve as prognostic markers. In our preclinical study, BLI measurement better correlated with the estimation of tumor regression by histological analyses than tumor volume measurement. Indeed, ifosfamide treatment led to a slowdown of the mean tumor volume, challenging the treatment efficiency, whereas it led to a strong decrease followed by a stagnation of the mean bioluminescence, indicating a tumor growth arrest. Histological analyses confirmed the ifosfamide treatment efficiency with numerous necrotic fibrotic areas that contribute to the tumor volume but not to the alive tumor expressing the firefly luciferase.

As the discovery in 2001 of the RNAi machinery in mammalian cells and in worms, synthetic siRNAs have emerged as promising new drugs, combining high specificity (sequence-mediated gene silencing) with a homogenous chemical structure.³⁶ The major challenge lies in developing a way to efficiently deliver siRNA into target cells in patients without significant off-target effects. Using our newly developed LucF-POS-1 osteosarcoma model that showed a good correlation between tumor volume and bioluminescence measurements, we optimized a method for the efficient and specific delivery of siRNA, that is, inducing a significant decrease in bioluminescence using siRNA directed against luciferase, without altering tumor progression. As siRNAs are unstable in serum and need to cross cell membrane, they can be combined with various chemical agents (cationic lipids, polymers or peptides).³⁷ In this study, the siRNAs were complexed with the cationic liposome RPR209120/DOPE for *in vivo* delivery. This chemical agent has proven efficiency to deliver siRNA in a mouse experimental model for rheumatoid arthritis, achieving 50–60% inhibition of the siRNA-targeted gene when administered intravenously.²⁶ The LucF-POS-1 cells are usually difficult to transfect with chemical agents, and such limit was also observed for RPR209120/DOPE-combined siRNA transfer. However, despite the poor *in vitro* transfection efficiency, we established an efficient *in vivo* siRNA delivery method. Intratumoral injections of 2.5 μ g siRNA combined with RPR209120/DOPE resulted in a 50% decrease in luciferase expression without interfering with tumor progression. Our experiments indicate that greater

quantities of siRNA and RPR209120/DOPE inhibited tumor growth nonspecifically. These nonspecific effects may result from the activation of innate immune responses by nucleic acids, whereas an excessive inflammatory cytokine release can have strong toxic effects in human.³⁸ Consequently, various strategies are developed to formulate siRNA with lipids to obtain an antitumoral effect through specific gene silencing without triggering an immune response.³⁹ The formulation of siRNA with the RPR209120/DOPE liposome includes the pre-association of siRNA with a plasmid DNA cargo. Indeed, naked siRNA and siRNA complexed alone in a lipoplex confer mild or intermediate protection against arthritis, whereas protection was complete with the plasmid DNA cargo formulation.²⁶ We recently showed that the addition of a DNA cargo in the siRNA formulation has minor effect on the structure of the lipoplexes, whereas the presence of plasmid DNA into the formulation could help the dissociation of the lipoplexes by interaction/competition with cell surface proteoglycans.²⁷ However, an optimization of the siRNA formulation with the cationic liposome RPR209120/DOPE would be to replace the carrier plasmid for clinical development.

By inducing transient RNAi, a few preclinical studies have shown that sarcoma progression can be reduced by downregulating genes that are implicated in cell cycle control or progression. Wang *et al.*²⁰ have observed an inhibition of human osteosarcoma xenografts in which the apurinic/apyrimidinic endonuclease gene has been downregulated by RNAi. For this, they have injected short hairpin RNA expression vectors into tumors. For certain clinical applications, siRNA has advantages over short hairpin RNA vector as smaller amounts of siRNAs are required for efficient delivery into target cells. Naked siRNAs against *stathmin*, which is an important regulator of microtubule dynamics and overexpressed in various human cancer cells, have been injected into the tail vein of mice bearing xenografted osteosarcoma.²¹ They have enabled a slight direct antitumor activity and enhanced significantly the chemosensitivity of osteosarcomas. However, the *in vivo* inhibition of *stathmin* has not been demonstrated after siRNA injection. Hu-Lieskovan *et al.*¹⁹ have treated metastatic Ewing's sarcoma with siRNA directed against the *EWS-FLII* oncogene. In their report, tail vein injections of naked siRNA have shown no therapeutic effect, while injections of these siRNA combined with polyplexes have inhibited tumor growth and human tumor cell engraftment. They have also demonstrated that siRNA-targeted genes (luciferase or *EWS-FLII*) were efficiently downregulated *in vivo*. All together these studies suggest that siRNA could be useful as drug combined with chemotherapeutic or antiangiogenic agents in sarcoma therapies. In addition, they have highlighted the need to demonstrate the effective gene silencing and the absence of indirect antitumor effects of siRNA *in vivo*.

Numerous studies using recombinant protein have demonstrated that progression of primary or secondary bone tumors depends on molecular and cellular interactions within the bone microenvironment, forming the soil

where the seed can grow.^{40,41} In one study using siRNA, a soil-dependent effect was observed. Bisanz *et al.*¹⁸ reported a strong effect of siRNA directed against integrin subunits combined with liposome on the growth of human prostate tumor in bone, but not on subcutaneous tumor growth. Similar site-dependent effects can be expected with siRNA directed against RANKL, the major cytokine involved in the vicious cycle between osteolysis and bone tumor progression. In our previous preclinical studies, RANKL blockade was achieved by overexpression of decoy receptors (osteoprotegerin or RANK-Fc) by gene transfer, which resulted in a strong inhibition of osteosarcoma growth.^{13,14} In this study, we demonstrate that siRNA can be successfully used to target a specific gene in osteosarcoma induced in mice. This raises the possibility that RANKL inhibition in osteosarcoma may be achieved using synthetic siRNA, which would be ideal for antitumor therapies due to its ease of manufacturing and the transient nature of its effect.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the Région des Pays de la Loire (JG/ND/RECH N 660, fellowship for JR) and the Agence Nationale de la Recherche 2007 'Pathophysiology of Human diseases' Project N R07196NS.

References

- Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis* 2007; **2**: 6.
- Ward WG, Mikaelian K, Dorey F, Mirra JM, Sassoon A, Holmes EC *et al.* Pulmonary metastases of stage IIB extremity osteosarcoma and subsequent pulmonary metastases. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 1849–1858.
- Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, Picci P, Giacomini S, Longhi A *et al.* Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of the extremity: an analysis of 300 patients treated at the Rizzoli Institute. *Ann Oncol* 2001; **12**: 1145–1150.
- Lamoureux F, Trichet V, Chipoy C, Blanchard F, Gouin F, Redini F. Recent advances in the management of osteosarcoma and forthcoming therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; **7**: 169–181.
- Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA. Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther* 2007; **6**: 2609–2617.
- Oyajobi BO, Anderson DM, Traianedes K, Williams PJ, Yoneda T, Mundy GR. Therapeutic efficacy of a soluble receptor activator of nuclear factor kappaB-IgG Fc fusion protein in suppressing bone resorption and hypercalcemia in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res* 2001; **61**: 2572–2578.
- Pearse RN, Sordillo EM, Yacoby S, Wong BR, Liau DF, Colman N *et al.* Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 11581–11586.
- Zhang J, Dai J, Yao Z, Lu Y, Dougall W, Keller ET. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB Fc diminishes prostate cancer progression in bone. *Cancer Res* 2003; **63**: 7883–7890.
- 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.
- 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.
- Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Koziaradzi I, Komarova SV, Sarosi I *et al.* Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 2006; **440**: 692–696.
- Heath DJ, Vanderkerken K, Cheng X, Gallagher O, Prideaux M, Murali R *et al.* An osteoprotegerin-like peptidomimetic inhibits osteoclastic bone resorption and osteolytic bone disease in myeloma. *Cancer Res* 2007; **67**: 202–208.
- 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.
- 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.
- Schwarz EM, Ritchlin CT. Clinical development of anti-RANKL therapy. *Arthritis Res Ther* 2007; **9**(Suppl 1): S7.
- Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther* 2006; **13**: 464–477.
- Grzelinski M, Urban-Klein B, Martens T, Lamszus K, Bakowsky U, Hobel S *et al.* RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interfering RNAs *in vivo* exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts. *Hum Gene Ther* 2006; **17**: 751–766.
- Bisanz K, Yu J, Edlund M, Spohn B, Hung MC, Chung LW *et al.* Targeting ECM-integrin interaction with liposome-encapsulated small interfering RNAs inhibits the growth of human prostate cancer in a bone xenograft imaging model. *Mol Ther* 2005; **12**: 634–643.
- Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2005; **65**: 8984–8992.
- Wang D, Zhong ZY, Li MX, Xiang DB, Li ZP. Vector-based Ape1 small interfering RNA enhances the sensitivity of human osteosarcoma cells to endostatin *in vivo*. *Cancer Sci* 2007; **98**: 1993–2001.
- Wang R, Dong K, Lin F, Wang X, Gao P, Wei SH *et al.* Inhibiting proliferation and enhancing chemosensitivity to taxanes in osteosarcoma cells by RNA interference-mediated downregulation of stathmin expression. *Mol Med* 2007; **13**: 567–575.
- Xie FY, Woodle MC, Lu PY. Harnessing *in vivo* siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. *Drug Discov Today* 2006; **11**: 67–73.

- 23 De Fougerolles AR. Delivery vehicles for small interfering RNA *in vivo*. *Hum Gene Ther* 2008; **19**: 125–132.
- 24 Takeshita F, Hokaiwado N, Honma K, Banas A, Ochiya T. Local and systemic delivery of siRNAs for oligonucleotide therapy. *Methods Mol Biol* 2009; **487**: 83–92.
- 25 Cherrier B, Gouin F, Heymann MF, Thiery JP, Redini F, Heymann D *et al*. A new experimental rat model of osteosarcoma established by intrafemoral tumor cell inoculation, useful for biology and therapy investigations. *Tumour Biol* 2005; **26**: 121–130.
- 26 Khoury M, Louis-Plence P, Escriou V, Noel D, Largeau C, Cantos C *et al*. Efficient new cationic liposome formulation for systemic delivery of small interfering RNA silencing tumor necrosis factor alpha in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; **54**: 1867–1877.
- 27 Rhinn H, Largeau C, Bigey P, Kuen RL, Richard M, Scherman D *et al*. Escriou how to make siRNA lipoplexes efficient? Add a DNA cargo. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790**: 219–230.
- 28 Jasmin C, Allouche M, Jude JG, Klein B, Thiery JP, Perdereau B *et al*. An experimental model of osteosarcomas in rats. *Sem Hop* 1982; **58**: 1684–1689.
- 29 Uesugi M, Koshino T, Mitsugi N, Hiruma T. Predictive value of serum immunosuppressive acidic protein for lung metastasis after amputation of murine osteosarcoma of the lower limb. *Cancer Lett* 2000; **155**: 169–172.
- 30 Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C *et al*. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 803–813.
- 31 Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 183–188.
- 32 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A *et al*. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; **3**: RESEARCH0034.
- 33 Chipoy C, Berreur M, Couillaud S, Pradal G, Vallette F, Colombeix C *et al*. Downregulation of osteoblast markers and induction of the glial fibrillary acidic protein by oncostatin M in osteosarcoma cells require PKCdelta and STAT3. *J Bone Miner Res* 2004; **19**: 1850–1861.
- 34 Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann MF, Coipeau P, Charrier C *et al*. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 2005; **37**: 74–86.
- 35 Huvos AG, Rosen G, Marcove RC. Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. *Arch Pathol Lab Med* 1977; **101**: 14–18.
- 36 Haussecker D. The business of RNAi therapeutics. *Hum Gene Ther* 2008; **19**: 451–462.
- 37 Nguyen T, Menocal EM, Harborth J, Fruehauf JH. RNAi therapeutics: an update on delivery. *Curr Opin Mol Ther* 2008; **10**: 158–167.
- 38 Robbins M, Judge A, MacLachlan I. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides* 2009; **19**: 89–102.
- 39 Robbins M, Judge A, Ambegia E, Choi C, Yaworski E, Palmer L *et al*. Misinterpreting the therapeutic effects of small interfering RNA caused by immune stimulation. *Hum Gene Ther* 2008; **19**: 991–999.
- 40 Chirgwin JM, Guise TA. Skeletal metastases: decreasing tumor burden by targeting the bone microenvironment. *J Cell Biochem* 2007; **102**: 1333–1342.
- 41 Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev* 1989; **8**: 98–101.

3. CONCLUSIONS ET DISCUSSION

L'utilisation de modèles animaux en oncologie est une étape indispensable pour l'établissement d'un protocole thérapeutique avant les essais cliniques chez l'Homme. En ce qui concerne les modèles murins d'ostéosarcome issus des lignées tumorales POS-1 et OSRGA, leur utilisation a permis de valider des molécules et protocoles thérapeutiques^{121,122,135,235,136,135,121,122} allant jusqu'à la mise en place d'un essai clinique avec l'acide zolédronique (OS2006, voir paragraphe 3.5.1 de l'introduction bibliographique). Mis à part les techniques d'histologie, ces études se basaient uniquement sur l'évolution du volume tumoral mesuré au pied à coulisse et sur la visualisation de métastases pulmonaires à l'autopsie.

La modification des lignées POS-1 et OSRGA pour une expression stable de la luciférase permet désormais de détecter un signal luminescent émanant des cellules tumorales elles-mêmes. Ce signal est détectable précocement *in vivo*, avant même la détection clinique d'une tuméfaction au niveau du site d'implantation de la tumeur. Cette détection permet d'améliorer l'inclusion des animaux ayant effectivement développé un ostéosarcome dans les protocoles précliniques et le suivi précoce des traitements. Du fait que l'activité de la luciférase est dépendante de la présence d'oxygène et d'ATP, seules les cellules métaboliquement actives, autrement dit viables, émettent des photons. Ainsi des zones d'hypoxie ou de mort cellulaire induites au sein du tissu tumoral, par apoptose ou par nécrose naturelle (exemple du développement par bourgeonnement successif en périphérie d'une zone interne nécrotique des OSRGA) ou induite (traitement par un agent de chimiothérapie : l'ifosfamide) peuvent être mises en évidence.

Parallèlement à nos investigations, les particules lentivirales, codant la luciférase, développées pour les besoins de notre étude ont également été utilisées dans une autre problématique du laboratoire basée sur l'évaluation d'une thérapie cellulaire de l'ostéosarcome par injection de précurseurs ostéoblastiques. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) étant les progénitrices d'un grand nombre de types cellulaires, elles ont rapidement été proposées dans des protocoles de régénération tissulaire^{236,237} mais aussi pour contrecarrer le développement tumoral. Ainsi dans le cadre du développement tumoral en site osseux, ces cellules sont apparues comme très intéressantes car capables de se différencier en ostéoblastes

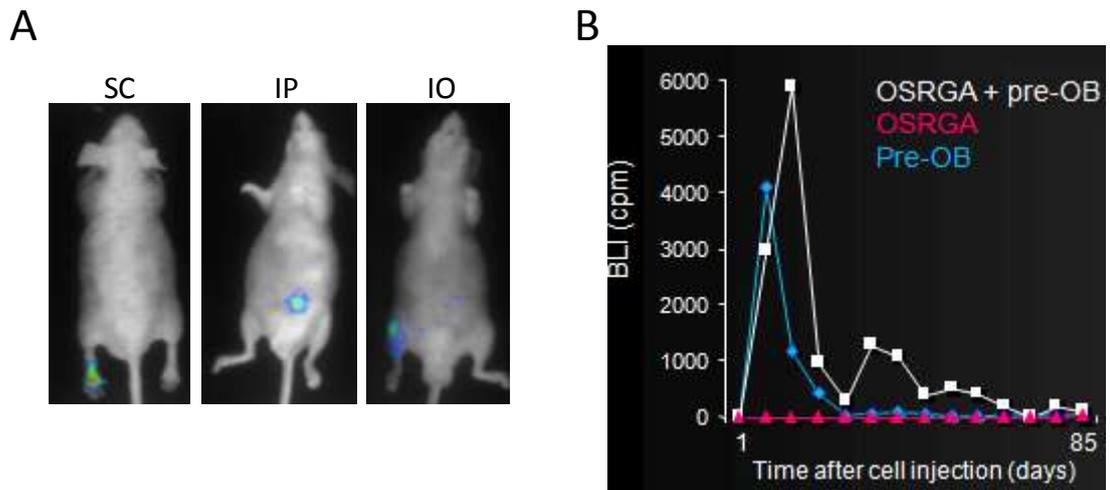


Figure 34 : Utilisation de la BLI pour le suivi de progéniteurs ostéoblastiques *in vivo*. (A) L'injection de progéniteurs ostéoblastiques en sous cutané (SC) au niveau du coussinet plantaire, en intrapéritonéale (IP) ou en intra-osseux dans le fût du tibia (IO) est associée à un signal de BLI quantifiable jusqu'à 60 jours post-injection pour l'IO. (B) L'utilisation de ces progéniteurs (pre-OB) détectables par BLI a notamment permis de montrer que ces cellules étaient viables et maintenues plus longtemps dans un contexte d'ostéosarcome.

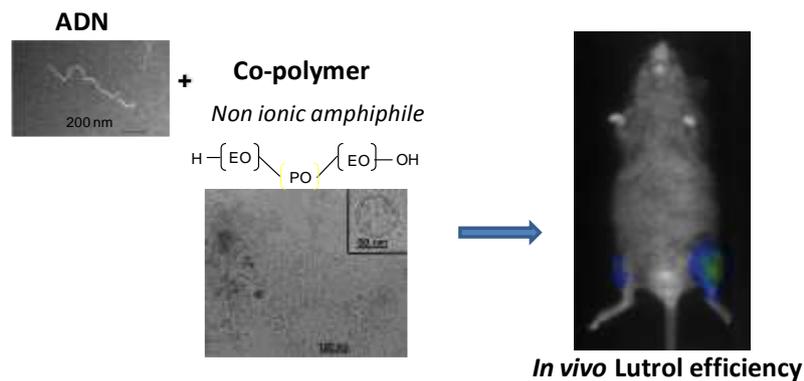


Figure 35 : Validation d'un transfert de gène dans le muscle par bioluminescence *in vivo*. L'utilisation d'un plasmide codant la luciférase *firefly* a permis de valider *in vivo* une méthode de transfert de gène non virale grâce au lutrol

(cellules responsables de l'ostéoformation du tissu osseux) compensant l'ostéolyse para-tumorale. Cependant, ces cellules sont également associées à des propriétés immunomodulatrices pouvant être associées à un potentiel effet protumoral¹⁸¹. Cet effet pro-prolifératif sur les cellules d'ostéosarcome a été démontré *in vitro* et *in vivo* par injection intratumorale de CSM (annexe 1 Perrot et al. 2010). Afin de déterminer en retour les effets des cellules d'ostéosarcome sur les CSM elles-mêmes, des pré-ostéoblastes issus de la calvaria (voûte crânienne) de rats nouveaux nés ont été modifiés pour exprimer stablement la luciférase.

L'injection de ces cellules permet une détection de l'activité luciférase quelque soit la voie d'administration (Figure 34A) et l'analyse des données d'imagerie par BLI permet de visualiser et de quantifier ces cellules dans une masse tumorale. Dans un modèle d'ostéosarcome OSRGA développé chez la souris nude, la bioluminescence nous a permis de montrer un effet positif des cellules tumorales sur la survie de ces progéniteurs injectés (Figure 34B). En effet, l'injection de progéniteurs seuls chez un animal sain est suivie d'une première phase de prolifération cellulaire associée à une augmentation de la BLI pendant 20 jours. Il s'en suit une seconde phase de diminution allant jusqu'à la perte totale de signal (0 cpm) témoignant d'une réduction du nombre de cellules exprimant la luciférase. Dans un contexte tumoral, l'injection de ces mêmes progéniteurs est caractérisée par des phases de prolifération et de régression similaires mais dans ce cas l'activité luciférase est maintenue à une valeur avoisinant les 500cpm pendant 80 jours.

Enfin, la luciférase a également pu être utilisée comme gène rapporteur pour l'évaluation du transfert de gène par un copolymère à bloc amphiphile non ionique de la famille du Lutrol® dans le muscle (Figure 35). Ce vecteur a par la suite été utilisé afin d'apporter une cassette d'expression codant l'OPG ou RANK-Fc dans le muscle controlatéral permettant une expression systémique de la protéine soluble et une action thérapeutique dans un modèle d'ostéosarcome^{121,122}.

La BLI apparaît donc comme une technique d'imagerie permettant d'améliorer les études précliniques par visualisation des cellules tumorales dans les modèles d'ostéosarcome (Figure 36A au dos de cette page). Cependant, la cage thoracique et le coeur représentent un obstacle à la détection des signaux de bioluminescence dans les poumons ne nous permettant pas d'observer la dissémination métastatique issue du développement d'une tumeur d'ostéosarcome. Le seul avantage de la BLI dans ce cas repose sur la détection *ex vivo* de micro métastases à peine visibles à l'œil nu et la quantification du signal (Figure 36B).

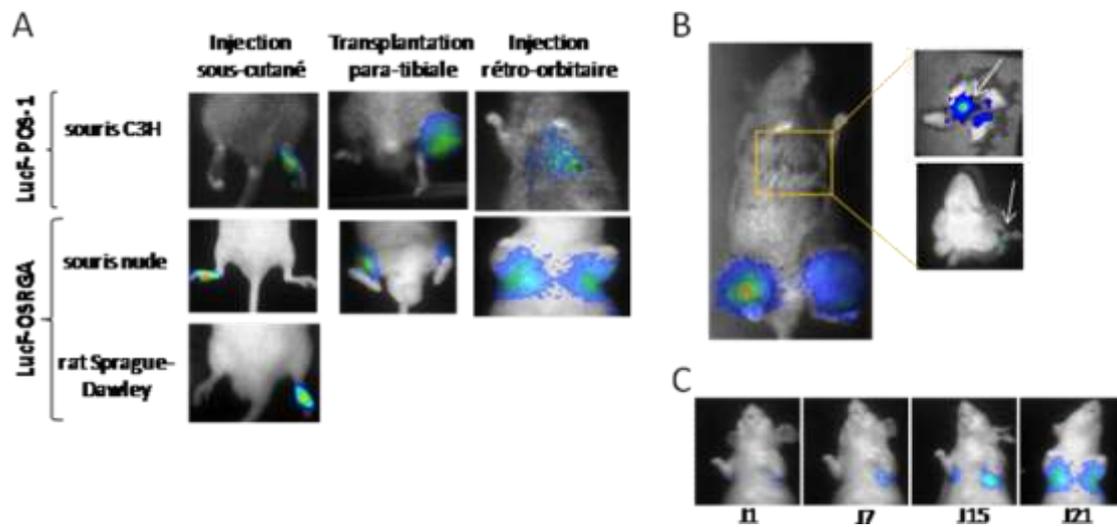


Figure 36 : Exemple de détection du développement tumoral de l'ostéosarcome par bioluminescence *in vivo*. L'expression de la luciférase par les cellules d'ostéosarcomes POS-1 de souris et OSRGA de rat permet leur détection après injection et/ou transplantation d'un fragment tumoral. L'activité luciférase est mesurée après injection intra-péritonéale chez la souris et locale chez le rat (injection intra-musculaire dans le membre inférieur portant la tumeur) de 3mg de D-luciférine. **(A)** Ainsi des signaux caractéristiques de la présence de ces cellules ont pu être visualisés après leur injection locale (voie sous cutanée ou par transplantation) ou systémique (voie rétro-orbitaire). **(B)** Cependant la dissémination métastatique en site pulmonaire n'est visible qu'*ex vivo* alors que l'injection par voie rétro-orbitaire permet de suivre et de quantifier l'induction et le développement de nodules pulmonaires mimant les métastases des tumeurs d'ostéosarcome **(C)**.

Autrement dit, cette technique d'imagerie ne nous permet pas d'envisager une visualisation de la dissémination métastatique autrement que par l'autopsie de l'animal.

La visualisation du développement de masses tumorales dans le poumon n'est possible qu'après injection de cellules d'ostéosarcome par voie rétro-orbitaire dans le modèle de nodules pulmonaires ¹³⁵. Après injection, le premier organe traversé étant le poumon, organe pour lequel les cellules d'ostéosarcome présentent un fort tropisme, des nodules tumoraux s'y développent mimant ainsi des métastases pulmonaires. La détection et la quantification du signal de BLI chez ces animaux permet de suivre le développement des nodules (Figure 36C). Néanmoins, ce modèle ne fait que mimer le développement de masses tumorales en site pulmonaire et ne nous permet pas de tester l'efficacité de stratégie anti-métastatique à proprement parler.

De plus, la quantification des signaux sur l'imagerie 2D reste limitante comparativement aux techniques d'imagerie 3D telles que la Tomographie par émission de positrons (PET) ou de photons (Single photon emission computed tomography SPECT) ²³⁸.

En ce qui concerne notre problématique d'injection efficace de siRNAs dans le microenvironnement tumoral, la BLI nous a également permis de valider un protocole d'administration de ces molécules d'ARNi en ciblant directement l'expression de la luciférase. L'injection de 2,5µg siRNAs complexés avec le RPR209120/DOPE (ratio 1:6) et le plasmide cargo (ratio 1:1) injectés par voie intra-tumorale 3 fois par semaine permet de réduire l'activité de la luciférase mesurée par BLI d'au moins 54% comparativement à la séquence de siRNA contrôle n'ayant pas de cible cellulaire. De plus, ce protocole d'injection ne modifie pas la cinétique de développement de la tumeur d'ostéosarcome alors que des injections de concentrations plus élevées entraînent un ralentissement de la progression tumorale dû à des effets non spécifiques de la transfection des cellules par les lipoplexes. Ce protocole ainsi validé peut dès lors être utilisé pour inhiber spécifiquement l'expression de gène et notamment celui codant la cytokine pro-résorptive Rankl de façon à contrecarrer le développement tumoral en site osseux.

**CHAPITRE 2 : Inhibition de Rankl par
injection de siRNAs dans des modèles
murins d'ostéosarcome**

1. INTRODUCTION

Les études de ciblage de l'expression du gène rapporteur de la luciférase sans effets sur le développement tumoral nous ont permis de mettre au point un protocole d'administration de siRNAs dans le microenvironnement de l'ostéosarcome, protocole efficace pour inhiber spécifiquement l'expression de la luciférase. Nous proposons dès lors d'appliquer ce protocole pour des siRNAs à visée thérapeutique en ciblant l'expression d'une protéine impliquée dans le développement tumoral : RANKL.

1.1. RANKL : expression physiologique et fonctions biologiques

RANKL est exprimé par un grand nombre de cellules et de tissus, mais plus fortement par le squelette (os, moelle osseuse, cartilage) ^{239,240}, les organes lymphoïdes (ganglions, thymus, rate, foie foetal) et par le système vasculaire ²⁴¹.

1.1.1. RANKL et tissu osseux

L'expression de RANKL au sein du tissu osseux est associée à la différenciation des ostéoclastes ainsi qu'à leur maturation et leur survie en inhibant leur apoptose ^{242,243}. Au niveau transcriptionnel, l'activation de l'expression de RANKL est majoritairement assuré par la PTH ²⁴⁴, mais elle peut également être induite par les cytokines de la famille de l'IL-6 ^{244,245} (notamment la cytokine gp130 oncostatine M), le TNF α et l'IL-1 ^{245,246} ou encore la 1,25(OH)₂D3 (1 α ,25-dihydroxyvitamine D3) ²⁴⁷. A l'inverse la voie canonique des Wnt (Wingless-type) inhibe l'expression de RANKL via la β -caténine.

Dans le tissu osseux, la cytokine est notamment exprimée par les cellules de la lignée ostéoblastique. Cette affirmation repose sur la localisation des cellules exprimant fortement RANKL dans des coupes histologiques d'os ^{248,249} (les

ostéoblastes) ainsi que sur son expression dans des cellules isolées à partir de la calvaria de rongeur connue pour être riche en progéniteurs ostéoblastiques ²³⁹. Son expression a pu être mise en évidence au sein de lignées ostéoblastiques de souris (la lignée ST2 dérivée de la moelle osseuse, et une lignée de progéniteurs ostéoblastiques isolés à partir de la calvaria de nouveau-nés : MC3T3-E1, <http://www.brc.riken.go.jp/lab/cell/english/guide.shtml>) et dans des cultures primaires d'ostéoblastes murins différenciés ²⁵⁰. Les ostéoblastes matures expriment peu RANKL ; à l'inverse les cellules en différenciation l'expriment en quantité importante. Il faut cependant noter que la calvaria n'est pas uniquement composée de progéniteurs ostéoblastiques et que les autres populations cellulaires qui la composent peuvent également représenter une source de RANKL. De plus, en ce qui concerne les ostéocytes, cellules terminales de la différenciation ostéoblastique, les résultats issus des études de localisation sur coupes histologiques sont contradictoires. En effet, certaines études attestent de l'expression de RANKL par les ostéocytes alors que d'autres contredisent ces affirmations ¹²³. Enfin, l'os trabéculaire où sont présents les progéniteurs mésenchymateux à l'origine des cellules de la lignée ostéoblastique présente un fort remodelage osseux. L'ensemble de ces données attestent d'une expression de RANKL par les cellules de la lignée ostéoblastique en général mais le stade de différenciation pour lequel la cytokine est majoritairement exprimée n'a pas été clairement identifié. Ainsi, ces cellules sont le plus souvent regroupées sous le terme de cellules stromales ostéoblastiques.

Mais ces cellules stromales ne représentent pas la source unique de RANKL. En effet, les cellules de la lignée ostéoblastique sont caractérisées par l'expression de l'ostéocalcine, or l'ablation totale des cellules exprimant l'ostéocalcine chez la souris n'altère en rien le nombre et l'activité des ostéoclastes ²⁵¹ démontrant ainsi que les ostéoblastes et leur progéniteurs ne représentent pas la source essentielle de RANKL nécessaire à la résorption osseuse. La présence d'IL-1 et de TNF α dans des cultures de cellules endothéliales induit notamment une expression de RANKL à des concentrations suffisantes pour permettre l'ostéoclastogénèse ²⁴¹.

Autrement dit, même si la plupart des spécialistes estiment que les ostéoblastes représentent la source majeure de RANKL dans le tissu osseux, aucune preuve n'a pu démontrer quelle population cellulaire soutient réellement la résorption osseuse via RANKL.

1.1.2. Autres fonctions biologiques de RANKL

La jonction entre le cartilage calcifié présent à la base des plaques de croissance et l'os néoformé est le site d'activation majeur des ostéoclastes de par la production de RANKL par les chondrocytes hypertrophiés. Son expression a notamment été mise en évidence par des techniques d'hybridation *in situ* au niveau des plaques de croissance ^{252,253}. La perte d'expression du récepteur à la vitamine D dans les chondrocytes est associée à une diminution de l'expression de RANKL et par conséquent du nombre d'ostéoclastes. Ces résultats montrent le rôle de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dans la régulation de l'expression de RANKL au sein de ce type cellulaire ²⁵⁴. Des études *in vitro* ont également montré le rôle des BMPs telle que BMP-2 dont l'expression est inductible au sein des chondrocytes ostéoarticulaires ^{255,256}.

RANKL joue également un rôle majeur dans les fonctions immunitaires. Il est en effet exprimé en grande quantité par les lymphocytes T et B activés. Il semble être très fortement impliqué dans la régulation de l'organogenèse des ganglions lymphoïdes et dans la maturation des cellules du thymus ²⁵⁷. Le rôle de RANKL dans le système immunitaire peut être étendu aux cellules dendritiques (il est capable de stimuler leur activation, leur survie et la présentation des antigènes) et aux monocytes (il agirait comme un facteur chimiotactique) ²⁵⁸. Cependant, la régulation de son expression au sein des lymphocytes est peu connue. Seule une étude d'activation du promoteur de RANKL dans des lymphocytes T activés a montré une augmentation de fixation des facteurs de transcription NF κ B et Erg (early growth response) 2 et 3 ²⁵⁹.

Au niveau vasculaire, les cellules endothéliales peuvent exprimer RANKL ²⁴¹ qui est notamment impliquée dans la survie de ces cellules. En effet, RANKL est capable de prévenir partiellement la mort cellulaire lors de la privation de sérum dans des cultures de cellules endothéliales ²⁶⁰. Elle est également impliquée dans la prolifération et le chimiotactisme de ces cellules et permet la néoangiogenèse *in vivo* ²⁶¹. Enfin, en se liant au récepteur RANK présent à la surface des cellules endothéliales RANKL initie des signaux SRC/phospholipase C/ Ca^{2+} induisant la formation de nouveaux vaisseaux que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques ²⁶¹.

Des études menées chez les souris transgéniques invalidées pour RANKL ont démontré l'implication de cette cytokine dans le développement des glandes mammaires ⁷⁴. Chez la souris gestante, RANKL est notamment exprimé au sein des cellules épithéliales mammaires. Il serait dans ce cas impliqué dans l'hyperplasie de ces cellules, nécessaire à la lactation ²⁶². Enfin une expression faible de RANKL a été mise en évidence dans le cerveau, le cœur, les poumons, les reins et le placenta ²⁵⁰.

1.2. RANKL et développement tumoral en site osseux

Dans un contexte pathologique tel que le développement tumoral en site osseux, un cercle vicieux s'établit entre la progression tumorale et la résorption osseuse. En effet, les cellules tumorales sécrètent des facteurs pro-résorptifs conduisant à l'activation des précurseurs ostéoclastiques, l'ostéolyse permet la libération de facteurs de croissance stockés jusqu'alors dans le tissu osseux, facteurs bénéfiques au développement tumoral. Cette suractivation des ostéoclastes est assurée par RANKL exprimé directement par les cellules tumorales ou induit au sein des cellules stromales ostéoblastiques (voir paragraphe 3.4 de l'introduction bibliographique).

De plus, RANKL s'est avéré être impliqué dans les processus métastatiques ²⁶² des cancers du sein, de la prostate ²⁶³ et du rein ²⁶⁴. Il facilite en effet la dissémination métastatique des cellules tumorales en site osseux. De plus, certaines cellules cancéreuses expriment une forme fonctionnelle du récepteur RANK ²⁶⁵ donnant à RANKL une implication pro-tumorale.

Une étude rétrospective de l'expression de RANKL dans différents types de tumeur chez 16 patients a montré une expression directement par les cellules tumorales. Ainsi des tumeurs de carcinomes mammaires, du poumon, de la prostate et de la thyroïde présentent une forte expression de la cytokine au sein même du tissu tumoral. Le transcrit et la protéine RANKL était également présents dans les ostéoblastes et fibroblastes des tissus avoisinant la tumeur ²⁶⁶.

En ce qui concerne les tumeurs d'ostéosarcome, une surexpression de Rankl a pu être vérifiée en local par immunohistologie et qPCR et par immunohistologie dans le modèle ostéolytique de souris POS-1 couramment utilisé au laboratoire. Cette surexpression locale est également associée à une augmentation de Rankl en

sérique chez le modèle ostéocondensant de rat OSRGA permettant sa détection par des analyses sanguines (Figure 37). Cependant, cette détection sérique n'est pas réalisable par le kit ELISA utilisé pour le modèle POS-1.

Dans ce contexte d'ostéosarcome, les cellules stromales ostéoblastiques et les lymphocytes activés infiltrant la tumeur représentent une source possible de Rankl capable d'induire la formation excessive d'ostéoclastes. Les cellules d'ostéosarcome peuvent également représenter une source de Rankl. En effet, certaines lignées d'ostéosarcome expriment RANKL en basal, comme les cellules UMR 106 (ostéosarcome de rat) ²⁶⁷, MG63 (ostéosarcome de souris) et la lignée humaine SaOS2. Cependant, dans les modèles murins POS-1 et OSRGA utilisés au laboratoire, l'implication des cellules tumorales elles-mêmes n'a pas été clairement démontrée car ces cellules n'expriment pas la cytokine en culture.

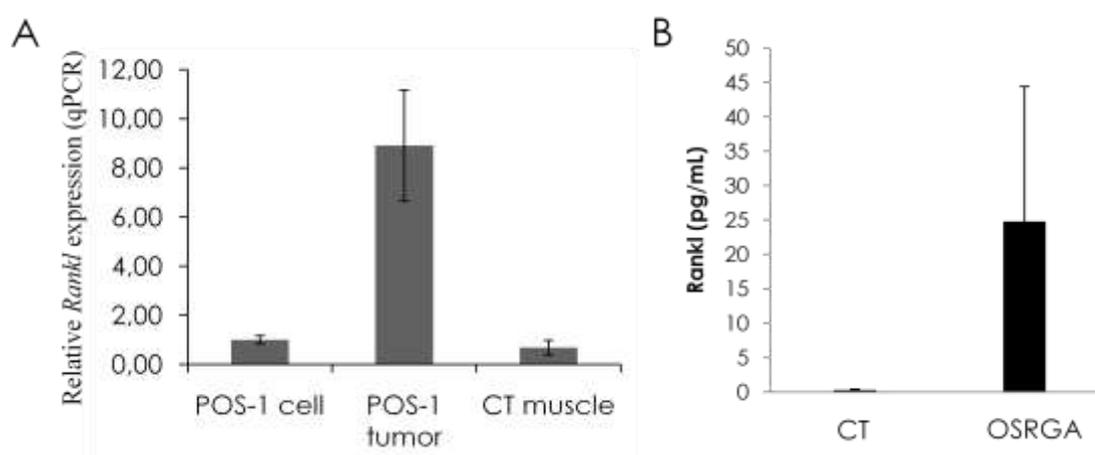


Figure 37 : Augmentation de l'expression de Rankl dans les tumeurs d'ostéosarcome. (A) Analyse par RT-qPCR de l'expression transcriptionnelle de *Rankl* dans des tumeurs POS-1 chez la souris C3H (POS-1 tumor) comparativement aux cellules en culture *in vitro* (POS-1 cell) et au muscle controlatéral sain (CT muscle), d'après les résultats obtenus par F. Lamoureux, ²⁶⁸. (B) Augmentation de la détection de la protéine Rankl au niveau sérique chez des souris nude ayant développé un ostéosarcome OSRGA. L'expression de Rankl est analysée par le kit ELISA DuoSet[®] Mouse TRANCE/TNFS11 kit (R&D System, Lille, France) sur des sérums issus de prélèvements sanguins réalisés par voie intra-cardiaque avant euthanasie de l'animal.

L'administration systémique par transfert de gène de récepteurs solubles comme Opg ou Rank-Fc chez des animaux ayant développé un ostéosarcome POS-1 ou OSRGA permet de séquestrer Rankl dans le microenvironnement tumoral et de prévenir ainsi les lésions ostéolytiques de l'os adjacent à la tumeur. Un ralentissement de la progression tumorale pouvant conduire à une rémission complète est également observé chez la plupart des individus alors que ces molécules n'ont aucun effet sur la prolifération et la survie des cellules d'ostéosarcome ^{121,122}. Ces observations sont concordantes avec l'hypothèse du cercle vicieux et l'implication

RESULTATS

2. Inhibition de Rankl par injection de siRNAs dans l'ostéosarcome

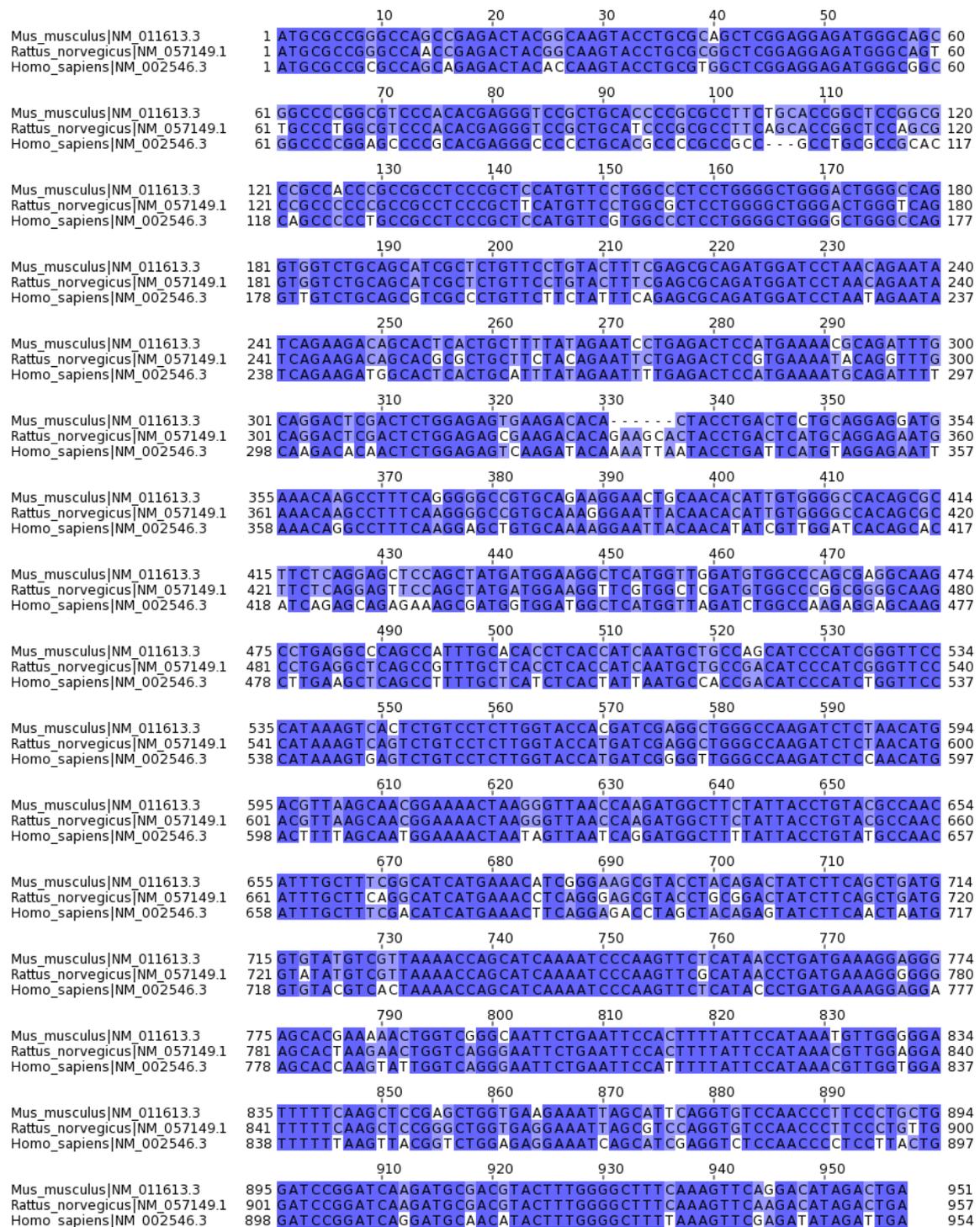


Figure 38 : Aligment de séquence des transcrits codant Rankl de souris (*Mus musculus*), de rat (*Rattus norvegicus*) et RANKL humain (*Homo sapiens*). Les séquences issues de la base de données NCBI sont alignées grâce au logiciel Jalview à partir de l'ATG et sur toute la longueur de l'ORF (cadre ouvert de lecture), les carrés bleus montrent les régions conservées chez les 3 espèces. NB : la numérotation indiquée n'est pas représentative de la numérotation du transcrit puisqu'ici la région 5' UTR n'est pas montrée.

e RANKL dans la suractivation des ostéoclastes. Au regard de ces résultats, une nouvelle stratégie thérapeutique consisterait donc à bloquer directement l'expression de Rankl de façon transitoire par injection de siRNAs dans le microenvironnement tumoral.

Enfin, les protocoles développés en clinique basés sur une inhibition de l'ostéoclastogénèse associent la molécule anti-résorptive à une stratégie anti-tumorale dans un protocole de bi-thérapie. C'est le cas dans l'ostéosarcome avec le protocole OS2006 associant l'acide zolédronique (bisphosphonate de 3^{ème} génération) aux molécules de chimiothérapie conventionnelle. C'est pourquoi, il serait également intéressant de tester les effets thérapeutiques de l'inhibition de Rankl par les siRNAs en combinaison avec un agent de chimiothérapie, tel que l'ifosfamide, utilisé dans la prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome.

1.3. siRNAs dirigés contre le transcrit Rankl

De manière à tester des siRNAs ciblant à la fois l'expression de Rankl dans le modèle syngénique POS-1 et le modèle xénogénique OSRGA (tumeur de rat transposée chez la souris immunodéficiente), la séquence ciblée doit être commune aux transcrits de souris et de rat.

1.3.1. Gène *Rankl*

Chez l'Homme, le locus *RANKL* se situe sur le chromosome 13, il est composé de cinq exons répartis sur 34kb d'ADN génomique (référence NCBI : NC_000013.10) qui après transcription produit un ARNm de 2271 bases. Chez le rat (*Rattus norvegicus* de la famille des muridés) et la souris (*Mus musculus* appartenant à cette même famille), *Rankl* se situe sur les chromosomes 15 (NC_005114.2) et 14 (NC_000080.5) générant des ARNm de 957 et 2243 bases respectivement. Les transcrits de *RANKL* humain et *Rankl* de rat présentent une homologie de séquences de 82,5% et 92,6% avec celui de la souris respectivement (Figure 38 ci-contre).

La traduction de ces ARNm permet de générer des protéines de 316 acides aminés chez l'Homme, 318 chez le rat et 317 chez la souris correspondant à l'isoforme 1 de RANKL. En effet, deux autres isoformes, RANKL2 et RANKL3 peuvent être générées par épissage alternatif et ont été décrites chez l'Homme comme chez la souris ²⁶⁹. L'isoforme RANKL3 étant séquestrée dans la cellule, seules les isoformes RANKL1 et RANKL2 présentes à la membrane peuvent interagir avec le récepteur RANK. Cette interaction s'effectue par le « TNF-family homologous domain » (de la Pro¹⁶⁴ à la Val³¹³ chez l'Homme) présent dans la partie extracellulaire de la protéine qui permet la reconnaissance et la fixation de RANKL à son récepteur. Ces isoformes peuvent également générer une forme soluble extracellulaire par clivage protéolytique par les enzymes TACE (TNF alpha Converting Enzyme) ²⁷⁰, MT1-MMP (Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase) ²⁷¹, MMP-7 ²⁷², MMP14 ou encore ADAM 10 (A Disintegrin and Metalloprotease 10) ²⁷³ libérant ainsi le long domaine extracytoplasmique pour une activation des précurseurs ostéoclastiques situés à distance.

De façon à inhiber l'expression de l'ensemble de ces isoformes, le dessin des siRNAs est réalisé en ciblant la séquence codant le domaine extracellulaire de la protéine commun aux 3 formes de RANKL.

1.3.2. Dessin des siRNAs ciblant *Rankl* de souris et de rat

Deux séquences distinctes de siRNA ont été élaborées à partir des séquences communes aux transcrits de souris et de rat en suivant les observations de Reynolds et al. Dans leur étude, ils ont en effet comparé les caractéristiques des séquences de siRNA à leur efficacité afin d'en déduire des recommandations pour le dessin de molécules efficaces ²⁷⁴ :

- Une faible proportion de paire de bases G/C sur la molécule double brin de siRNA
- Une stabilité en 3' du brin sens inférieure à celle de l'extrémité 5' de l'antisens. Cette propriété de la molécule de siRNA permet de favoriser l'incorporation du brin antisens complémentaire à la séquence d'ARNm ciblée dans le complexe RISC (voir paragraphe 1.2.2 de l'introduction bibliographique)
- L'absence de séquences répétées-inversées au sein de chaque brin afin d'éviter un repliement du brin effecteur sur lui-même empêchant sa fixation sur le transcrit ciblé

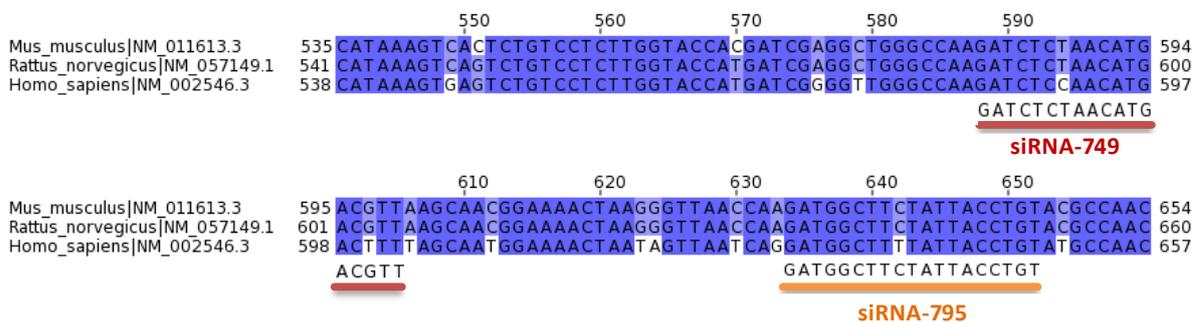


Figure 39 : Positionnement et séquences des siRNA-749 et -795 ciblant les transcrits Rankl de souris et de rat. L'alignement des séquences étant réalisé à partir du codon « start » de chaque transcrit, la numérotation indiquée ne correspondant pas à celle du transcrit global étant donné que la partie 5' UTR n'est pas prise en compte.

	Recommandations de Reynolds et al	siRNA-749	siRNA-795
Proportion en G/C (%)	< 50	33,3	38,1
Stabilité en 3'	Inférieure à celle de l'extrémité 5'	Identique à celle en 5'	Identique à celle en 5'
Répétitions internes	Aucune	Aucune	Aucune
Position 3	Adénine	Uracile	Uracile
Position 10	Uracile	Cytosine	Uracile
Position 13	Pas de guanine	Guanine	Uracile
Position 19	Adénine ou uracile	Uracile	Uracile

Tableau 7 : Analyses des deux séquences de siRNA dessinées de manière à inhiber les transcrits Rankl de rat et de souris selon les recommandations de Reynolds et al²⁷⁴. Les éléments concordants avec ces recommandations sont indiqués en bleu.

- La présence de certaines bases à des positions stratégiques sur le brin sens (adénine en position 3, uracile en 10, une base autre que la guanine en 13 et de préférence une base purique en 19).

Les siRNAs ont été désignés siRNA-749 et siRNA-795, les nombres représentant la position de la première base ciblée à partir du premier codon sur le transcrit de souris (NM_011613.3). D'après le positionnement des séquences ciblées par les siRNAs sur l'alignement entre espèce des transcrits codant RANKL/Rankl, on notera que ces séquences ne présentent pas une homologie de séquence parfaite avec le transcrit humain (Figure 39 ci-contre). Les caractéristiques de ces deux siRNAs selon les recommandations de Reynolds et *al* sont listées dans le tableau 7 ci-contre.

1.4. Choix d'investigation

Avant d'envisager une injection *in vivo* de siRNAs ciblant l'expression de Rankl, les deux siRNAs choisis ont été testés *in vitro* afin de sélectionner la séquence de siRNA la plus à même de pouvoir inhiber l'expression de Rankl. Les cellules d'ostéosarcome n'exprimant pas la cytokine en question dans les conditions de culture, un modèle de cellules HEK (293) modifiées pour exprimer stablement la protéine Rankl de souris ²⁷⁵ a été utilisé dans un premier temps.

La séquence la plus efficace pour inhiber l'expression de Rankl dans ce modèle cellulaire a été ensuite utilisée pour tester son efficacité *in vivo* dans les modèles d'ostéosarcome POS-1 et OSRGA. Comme précédemment, pour les besoins de l'étude, le modèle de rat OSRGA a été induit chez la souris nude de façon à diminuer les doses de siRNAs et de liposomes injectés. Les résultats d'inhibition post-transcriptionnelle étant dépendants de la demi-vie de la protéine ciblée (voir paragraphe 1.3.1 de l'introduction bibliographique), le protocole d'injection de siRNAs développé en ciblant l'expression de la luciférase *firefly* dont la demi-vie est d'environ 4h chez les cellules de mammifères est parfaitement adapté au ciblage de l'expression de Rankl. En effet, Rankl est considérée comme une protéine à demi-vie courte puisque des études d'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide ont montré une diminution de son expression par western blot au bout de 6h dans le modèle de cellules HEK ²⁷⁵. De plus, la voie d'administration intra-tumorale est particulièrement bien adaptée à un ciblage de Rankl puisque

différents types cellulaires présents sur le site tumoral sont susceptibles d'être des sources de la cytokine pro-résorptive : les cellules stromales ostéoblastiques et les lymphocytes. Les cellules tumorales pourraient également représenter une source non négligeable de Rankl mais cette preuve n'a pour l'instant pas été apportée dans les modèles d'ostéosarcome POS-1 et OSRGA. C'est pourquoi nous avons choisi de cibler les cellules du microenvironnement tumoral dans son ensemble.

Enfin, les effets de l'inhibition de l'expression de Rankl ont été étudiés dans un protocole de bi-thérapie associant les siRNAs à un agent de chimiothérapie conventionnelle : l'ifosfamide.

Il est important de noter que dans la plupart des études menées en oncologie qui montrent un ralentissement de la progression tumorale, des effets non spécifiques des siRNAs et/ou de leurs vecteurs peuvent survenir. Ces effets non spécifiques incluant notamment l'activation du système immunitaire peuvent en effet induire une forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons pouvant être à l'origine de l'effet thérapeutique observé (voir paragraphe 1.4 du chapitre 1 des résultats). C'est pourquoi désormais, la composante immunitaire via le dosage de ces cytokines (IFN α , IFN γ , TNF, IL-6, IL-10 ou encore l'IL-12) et la confirmation de l'extinction de l'expression de la protéine ciblée (par immunohistologie, western-blotting ou qPCR) est devenue indispensable à la validation d'une stratégie basée sur l'utilisation des molécules d'ARNi²⁷⁶. Ces deux aspects ont donc été pris en compte lors de l'administration de siRNAs ciblant l'expression de Rankl dans les modèles murins d'ostéosarcome.

2. ARTICLE 2 : manuscrit en cours d'écriture

L'inhibition de l'expression de Rankl prévient les lésions ostéolytiques associées au développement tumoral et retarde la rechute associée à l'arrêt des traitements de chimiothérapie conventionnelle dans deux modèles murins d'ostéosarcome

Julie Rousseau, Virginie Escriou, François Lamoureux, Régis Brion, Julie Chesneau, Séverine Battaglia, Daniel Scherman, Dominique Heymann, Françoise Rédini et Valérie Trichet

Principaux résultats obtenus :

In vitro, la transfection transitoire du siRNA-795 par la lipofectamine s'est avérée être plus efficace pour inhiber l'expression de Rankl au sein du modèle de cellules HEK exprimant la cytokine. Ce siRNA-795 a ainsi été nommé *Rkl*-siRNA. Cette inhibition de l'expression de Rankl s'est également avérée efficace après association du *Rkl*-siRNA avec le liposome RPR209120/DOPE dans ces mêmes cellules. Aucun effet direct des complexes *Rkl*-siRNA/liposome sur la prolifération et la viabilité des cellules d'ostéosarcome n'a été observé après transfection transitoire des cellules POS-1 et OSRGA.

Dans le modèle OSRGA, l'injection des *Rkl*-siRNAs comparativement aux tumeurs non traitées et aux animaux ayant reçu le siRNA contrôle négatif (CT-siRNA n'ayant aucune séquence cible) complexés sous forme de lipoplexes permet de diminuer significativement la détection de la cytokine au niveau sérique par dosage ELISA. Les études menées sur le modèle ostéolytique POS-1 ont également montré un effet protecteur de l'injection de ces siRNAs vis-à-vis de l'ostéolyse para-tumorale. Cependant, cette inhibition de Rankl et la prévention des lésions ostéolytiques n'était pas associée à un ralentissement de la progression tumorale quelque soit le modèle étudié. Enfin, le dosage sérique de l'IFN γ , indicateur d'une réponse immunitaire innée vis-à-vis des complexes injectés, a révélé une légère augmentation de concentration après injection des siRNAs mais cette augmentation s'est avérée mineure comparativement à celle détectée dans des sérums de souris immunisées par des vecteurs MVA (modified virus ankara, vecteurs dérivés du virus de la vaccine) connus pour induire une forte réponse IFN²⁷⁷. Ces études préliminaires nous ont permis de montrer que l'injection des complexes *Rkl*-siRNAs / liposome inhibe l'expression de Rankl *in vivo* et diminue la résorption osseuse associée au développement tumoral.

L'association des siRNAs ciblant l'expression de Rankl avec des cures de chimiothérapie par injection systémique d'ifosfamide a montré un effet synergique sur le développement de l'ostéosarcome. Cet effet s'est traduit par un retard significatif de la rechute à l'arrêt des traitements de chimiothérapie dans les deux modèles murins utilisés. Dans le modèle oséolytique POS-1, les analyses des données du microscanner ont également montré une augmentation du volume osseux spécifique comparativement à des tumeurs contrôles de volume équivalent. De plus, les analyses immunohistologiques montrent des cellules positives pour l'expression de Rankl regroupées au niveau des zones d'interface entre nécrose et tumeur en prolifération dans le groupe CT-siRNA, alors que pour les tumeurs ayant reçu des injections de *Rkl*-siRNAs ces cellules sont plus dispersées voir inexistantes.

NB: A suivre, le manuscrit en cours d'écriture et les figures associées

**Vectorised siRNAs targeting *Rankl* prevent osteolysis and enhance
chemotherapeutic response in osteosarcoma models**

^{1,2}Julie Rousseau, ³Virginie Escriou, ^{1,2}François Lamoureux, ^{1,2}Régis Brion, ^{1,2}Julie Chesneau, ^{1,2}Séverine Battaglia, Jérôme Amiaud, ³Daniel Scherman, ^{1,2}Dominique Heymann, ^{1,2}Françoise Rédini, ^{1,2}Valérie Trichet

¹INSERM, U957, Nantes, F-44035 Nantes, France

²Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, 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

³INSERM, U640, Université Paris Descartes – Ecole nationale Supérieure de Chimie de Paris, 75005 Paris, France

Correspondance :

Dr Valérie Trichet, 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 : valerie.trichet@univ-nantes.fr

Running title: therapeutic effect of vectorised *Rankl*-siRNAs in osteosarcoma models

Abstract

Purpose: The development of osteosarcoma, the most common malignant primary bone tumor is characterized by a vicious cycle established between tumor proliferation and para-tumoral osteolysis causing painful bone fragility. This osteolysis is mainly regulated by the Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL or TNFSF11). Preclinical studies have demonstrated that Rankl blockade by soluble receptors is an effective strategy to prevent osteolytic lesions leading to osteosarcoma inhibition. A new therapeutic option could be to directly inhibit *Rankl* expression by small interfering RNAs (*Rkl*-siRNAs) and combine these molecules to chemotherapy in order to counteract more efficiently the osteosarcoma development.

Methods: an efficient siRNA sequence directed against both mouse and rat mRNAs coding *Rankl* was first validated at the protein level in a human foetal kidney 293 cell line expressing constitutively the mouse *Rankl* mRNA. Two models of osteosarcoma were then used to test *Rkl*-siRNAs efficiency *in vivo*: a syngenic osteolytic POS-1 model induced in immunocompetent mice and a xenograft osteocondensant model of rat OSRGA in athymic mice. *In vivo*, *Rkl*-siRNAs were administered in combination with the cationic liposome RPR209120/DOPE associated or not with chemotherapy (ifosfamide). Clinical, biological and bone parameters were analysed after sacrifice and immunohistology was performed on tumor slices.

Results: intra-tumoral injections of *Rankl*-directed siRNAs reduced the local and systemic Rankl production and protected bone from para-tumor osteolysis. Although *Rkl*-siRNAs alone had no effect on tumor development in both osteosarcoma models, it significantly contained tumor progression when combined with ifosfamide as compared to chemotherapy alone. Osteosarcoma associated osteolytic lesions were less aggressive in the *Rkl*-siRNA treated groups (combined or not with ifosfamide) as compared to controls and ifosfamide groups.

Conclusion: Our results indicate that siRNAs could be delivered using liposomes and could thereby inhibit Rankl production in a specific manner in mouse osteosarcoma tumors. Moreover the Rankl inhibition mediated by RNA interference strategy improves the therapeutic response of primary osteosarcoma to chemotherapy.

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 ^{1,2}. Osteosarcoma generally affects young patients with a peak incidence at 18 years old ³. The unifying histologic feature found in all types and subtypes of osteosarcomas is the presence of osteoid tissue produced by the neoplastic cells ⁴. 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 poly-chemotherapy courses combined with wide-margin, limb-sparing surgery, osteosarcoma continues to confer a generally poor prognosis in patients with lung metastasis at diagnosis or not responding to chemotherapy (less than 30% survival rate) ⁵.

The biological problematic of tumor development in bone relies on the existence of a vicious cycle between bone resorption and tumour progression. Previous results obtained by our group have shown the benefits of combining chemotherapy with an anti-bone resorptive agent such as zoledronic acid ⁶. When zoledronic acid was combined with ifosfamide in rat osteosarcoma, bone lesions have been reduced as expected from the inhibitory effects of the bisphosphonates on osteoclast function ⁷. Moreover a tumor regression has been enhanced by the association of zoledronic acid with ifosfamide compared to ifosfamide alone. The anti-tumor property of zoledronic acid could result either indirectly from the lack of growth factors released from bone matrix by osteolysis or directly from the apoptosis induction of osteosarcoma cells ⁸. These results have provided the rationale for the French clinical trial “OS2006” designed to test Zometa^R courses combined to conventional chemotherapy and surgery. A favorable benefit-risk ratio is reported for patients treated with bisphosphonates for bone-loss associated with cancers, despite renal dysfunction and osteonecrosis of the jaw that occasionally occurred with high doses of bisphosphonates ^{9,10}. Furthermore, in treatment of pediatric cancers, the use of prolonged bisphosphonate administrations could disturb the growth of long bones ¹¹⁻¹³. The search for specific anti-resorptive agents is still needed.

The Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B Ligand (RANKL or Tumor Necrosis Factor Superfamily member 11, TNFSF11) is the final effector molecule which ultimately stimulates osteoclast differentiation, activation and survival ¹⁴. This osteoclast-promoting cytokine interacts with its receptor RANK (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily

member 11a, TNFRSF11A) which is expressed on the membrane of osteoclast precursors, but RANKL is negatively regulated by its soluble decoy receptor, the Osteoprotegerin (OPG or Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 11b, TNFRSF11B). Thereby, RANKL is a common therapeutic target for various osteolytic diseases associated or not with cancer¹⁵. Specific neutralization of RANKL has been achieved by either soluble RANK-IgG-Fc¹⁶, or recombinant OPG¹⁷, or OPG-like peptidomimetic administrations¹⁸ in various pre-clinical models. A fully-human monoclonal antibody directed against RANKL (Denosumab®) is currently under investigation in clinical trials to treat patients with bone metastases¹⁹.

In mouse and rat osteosarcoma models, the blockade of Rankl has been investigated by over-expressing Opg or soluble recombinant Rank by gene transfer and has demonstrated promising therapeutic applications for this pathology^{20,21}. Another way to specifically target RANKL is to directly inhibit its production using small interfering RNAs (siRNAs). Since the RNA interference discovery by Fire in 1998 (2006 Nobel Prize), siRNAs have emerged as an undisputed laboratory tool to knockdown a gene target and siRNA-based medicines are now working their way into the clinic (17 clinical trials listed from <http://clinicaltrials.gov/>²²). Because of large molecular weight and polyanionic nature, naked siRNAs do not freely cross the cell membrane, and thus delivery systems are required to facilitate its access to its intracellular sites of action. An efficient formulation of TNF- α targeted siRNAs has been designed based on the cationic liposome RPR209120/DOPE which proved to be efficient in restoring immunological balance in a mouse arthritis model following intravenous injection^{23,24}. The same siRNA formulation has been adapted for specific siRNA-mediated gene silencing in osteosarcoma models by targeting luciferase expression²⁵. We have defined a siRNA injection protocol efficient to downregulate a target gene and associated with no unspecific inhibition of the osteosarcoma growth when the targeted gene is not implicated in cell proliferation.

In the present study, we investigated the effects of siRNAs which were designed to target mouse and rat *Rankl* transcripts and formulated with the cationic liposome RPR209120/DOPE in two models of murin osteosarcoma. The decrease of Rankl in serum and at tumor site following *Rankl*-directed siRNA (*Rkl*-siRNA) injections protected bone from osteolysis but had no significant effect on tumor growth. In contrast when associated to conventional chemotherapy (ifosfamide), *Rkl*-siRNAs were more efficient to inhibit osteosarcoma growth than chemotherapy alone. Moreover, tumor relapse observed after the last ifosfamide cure was delayed by *Rkl*-siRNA injections as compared to

control-siRNA ones.

Materials and methods

Cell lines and viability analyses

Cell lines. The POS-1 cell line originally isolated from a spontaneous osteosarcoma developed in the mouse C3H/HeN strain, was a kind gift from Dr A Kamijo²⁶. The cells were cultured in RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Lonza, Verviers, Belgium) with 10% FBS (foetal bovine serum, Hyclone Perbio, Bezons, France). The OSRGA cell line corresponds to a transplantable rat osteosarcoma model originally induced by radiation^{27,28}. The cell line designed 293RL was a kind gift from Dr R Josien and derived from the human foetal kidney 293 cell line which has been modified to express constitutively the mouse *Rankl* mRNA. OSRGA and 293RL cells were cultured in DMEM (Dubecco's Modified Eagle's Medium, Lonza) supplemented with 10% FBS. The LucF-POS-1 and LucF-OSRGA osteosarcoma cells have been modified to express the firefly luciferase gene as previously described²⁵.

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 seeded into 96-well plates and cultured for 48 hours in culture medium after siRNAs transfection as compared to untransfected cells. 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.

In vitro luciferase activity. The luciferase activity was measured on seeded cells thanks to the « Steady-Glo^R Luciferase Assay System » (Promega, Charbonnières, France) which contain lysis buffer and D-luciferin. One hundred microliters of solution were added on cultured cells and after 5min the absorbance was read during 10 seconds per well.

Experimental osteosarcoma models

All animals used for *in vivo* experimentations were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA.PdL.06) and under the supervision of authorized investigators.

Tumor induction. The mice were anesthetized by inhalation of an isoflurane-air mixture (2 %, 0.2 L/min) prior to any surgical procedures. Four-week-old male C3H/HeN mice

(Elevages Janvier, Le Genest Saint Isle, France) or four-week-old male nude NMRI mice (Elevages Janvier) were used for POS-1 or OSRGA tumor induction respectively. A 5 mm section was performed in naive mice to open the muscle along the tibia. Tumor fragments (2x2x2 mm³) excised from a donor mouse were transplanted into naive mice, then muscular and subcutaneous wounds were sutured. The tumor volume was quantified by measuring 2 perpendicular diameters with a caliper and calculated with the formula: $(l^2 \times L)/2$ where l is the smallest and L the largest diameter.

Samples. Blood samples were drawn by intracardiac puncture under deep anesthesia just before euthanasia. Tumor and bone samples were collected for histology analyses.

siRNAs

The customer-specified oligonucleotide duplexes (GAUCUCUAACAUGACGUUAtt annealed with UAACGUCAUGUUAGAGAUCtt and GAUGGCUUCUAUUACCUGUtt annealed with ACAGGUAAUAGAAGCCAUCtt) target *Mus musculus Rankl* mRNA (NM_011613) at start-positions 749 and 795 respectively. A control siRNA duplex (UUCUCCGAACGUGUCACGUtt annealed with ACGUGACACGUUCGGAGAAtt) which did not show significant homology to any mouse or rat mRNA sequence according to BLAST database searches was used as a negative control and designed CT-siRNA. A positive control siRNA duplex targeting the luciferase expression was designed LucF-siRNA (sequences in Rousseau et al., 2010²⁵). All siRNAs were purchased from Eurogentec (Angers, France).

Transfection with INTERFERin™. *Rkl-749* and *Rkl-795* siRNAs were transfected at 10 nM with 3 µl of INTERFERin™ (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Rankl production was then analysed on cell lysates by Western blotting 48 hours after transfection.

Transfection with cationic liposome. The siRNAs were combined with carrier DNA (a plasmid containing no eucaryotic expression cassette) and the cationic liposome RPR209120/DOPE with the same amount of plasmid DNA pre mixed with siRNAs before addition of the cationic liposome. A ratio of 6 nmols of cationic liposome per µg of nucleic acid was used as determined in previous experiments²⁵. Fifty percent confluent cells were transfected in triplicate with 0.3 µg of siRNAs formulated in lipoplexes. The transfection efficacy was then controlled after 48 hours on cell lysate by Western blotting as described below.

In vivo injections. Groups of 8 mice transplanted with POS-1 or OSRGA osteosarcoma

fragments as described above were assigned as vehicle (NaCl injection), CT-siRNA, *Rkl*-siRNA. Preliminary results have already validated a protocol for efficient siRNA delivery *in vivo* based on the intra-tumoral injection of 2.5 µg siRNA combined with cationic liposomes at a 6-charge ratio, 3 times a week²⁵. The combined chemotherapeutic cure consisted in 3 consecutive i.p. injections of ifosfamide (ASTA Medica laboratories, Mérignac, France) at 24 hours intervals per week: 3 injections of 60 mg/kg during 3 weeks and 6 mg/kg during 2 weeks for POS-1 and OSRGA model respectively.

Rankl detection

Western blotting. Transfected cells were lysated with a lysis buffer (150 mM NaCl, 5 % Tris, pH 7.4, 1 % Nonidet P-40, 0.25 % Na deoxycholate, 1 mM Na₃VO₄, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml leupeptin, and 10 µg/ml aprotinin). 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 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and then electrophoretically transferred to Immobilon-P membrane (Millipore Corporation, Billerica, MA). The membrane was blotted with mouse antibodies to Rankl (A5060, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and rabbit anti-mouse actin was used as loading control (40940, Active Morif, Rixensart, Belgium) in PBS, 0.05 % Tween and 3 % bovine serum albumin. The membrane was washed and probed with the secondary antibody (anti mouse and rabbit respectively) coupled to horseradish peroxidase. Antibody binding was visualized with the enhanced chemoluminescence system (SuperSignal West Dura kit; ThermoScientific, Rockford, USA).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Quantifications of Rankl in serum isolated from blood samples were performed with the DuoSet^R Mouse TRANCE/TNFS11 kit (R&D System, Lille, France).

Immunohistochemistry. Tumor tissues were fixed in 4% buffered formaldehyde during one week before embedding in paraffin. Three µm thick sections were deparaffinized in OTTIX PLUS (Xylen and alcohol substitute, DiaPath, Martinengo, Italy) and hydrated through graded alcohol. All the following steps were then performed using the Autostainer 360-2D (Microm Microtech, Francheville, France). Endogenous peroxidase was removed using 3% H₂O₂ in water for 10 min then blocked with 4% bovine serum albumin for 15 min. Tissue sections were incubated with diluted goat anti-RANKL(N19) primary antibody (1:30 Santa Cruz, Heidelberg, Germany) for 1 hour. Sections were

washed in PBS and incubated again at room temperature with biotin-conjugated anti-goat secondary antibody (Vector laboratories, Burlingame, CA) for 30 min. After washing, sections were incubated with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase for 30 min at room temperature. Immunodetection was analysed using AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole, Sigma-Aldrich) and counterstained with Mayer hematoxylin. All pictures were assessed by light microscopy using DMRXA microscope (Leica, Nussloch, Germany).

Immune response

To assess the possible immune system activation through lipoplexe (siRNA plus cargo plus cationic liposome) injections in mice, the interferon-gamma concentration was measured on 50 μ L of blood serums thanks to the Mouse IFN- γ ELISA Kit II (BD biosciences, Le Pont de Claix, France). Serums from mice that have received Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) empty vectors known to induce an interferon-gamma response²⁹ were used as positive controls.

Bone parameters analyses

Microscanner analyses. Bone architecture was analyzed for tumor-bearing and naive tibias using the high-resolution SkyScan-1072 X-ray micro-computed tomography system (SkyScan, Kartuizersweg, Belgium). All tibias were scanned at necropsy using the same parameters: 18 μ m of pixel size, 50 kV, 0.5 mm Al filter, 0.8° of rotation step. Three-D reconstructions and analysis of bone parameters were performed using ANT and CTan softwares (Skyscan) respectively. Calculation of tibia relative bone volume [cortical bone volume / total volume]: (BV/TV)] were performed on 8 mm of tibia length from the perone insertion. This area corresponds to bone in close contact with osteosarcoma tumors and excludes trabecular bone.

Trap staining. Tumor bearing tibias were fixed in 10% buffered formaldehyde and decalcified by continue electrolysis during 72 hours before embedding in paraffin. Transversal 3 μ m thick sections obtained from the tibia area were stained for tartrate-resistant acid phosphatase (Trap) to identify osteoclasts by 1-hour incubation in a 1 mg/mL naphthol AS-TR phosphate, 60 mmol/L NN-dimethylformamide, 100 mmol/L sodium tartrate, and 1 mg/mL Fast red TR salt solution (all from Sigma Chemical Co.) and counterstaining with hematoxylin.

Statistical analyses

All analyses were performed using GraphPad InStat v3.02 software. *In vitro* experimentation results were analysed with the unpaired nonparametric Mann-Whitney U test using two-tailed P values. Results are given as mean \pm SD and results with $p < 0.05$ were considered significant. Results of *in vivo* experiments were compared between *Rkl*-siRNA and CT-siRNA groups thanks to a nonparametric T test, one-tailed P value and are shown as mean \pm SEM with $p < 0.05$ considered significant.

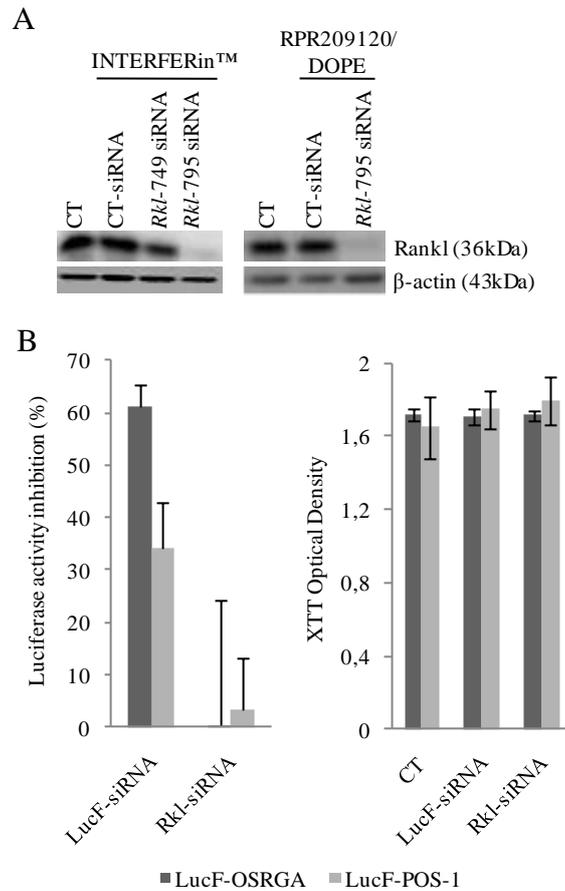


Figure 1: *In vitro* validation of *Rankl*-directed siRNAs formulated in lipoplexes. (A) HEK 293 cells modified to express mouse *Rankl* were transfected with CT-siRNAs, *Rkl*-749 or -795 siRNAs combined with INTERFERin™ or RPR209120/DOPE. Rankl was detected by Western blotting on cell lysates performed 48 hours after transfection and compared to untransfected cells (CT). **(B)** Osteosarcoma cell lines modified to express the luciferase (LucF-OSRGA and LucF-POS-1) were transfected with LucF- or *Rkl*-795 siRNAs combined with RPR209120/DOPE. The cell metabolism was analysed 48 hours after transfection by measuring the luciferase activity and the mitochondrial activity in a XTT assay (absorbance at 490 nm).

Results

Identification of a highly efficient siRNA sequence to reduce Rankl production *in vitro*

Two customer-specified siRNAs were designed to inhibit both mouse and rat *Rankl* gene expression by targeting two 19-nucleotide mRNA sequences which share 100% sequence identity between species and are preceded by two Adenines. Additionally the selected sequences starting at positions 749 and 795 in *Mus musculus* gene NM_011613 matched with several criteria of potent siRNAs following the guideline of Reynolds et al.³⁰: a low G/C content (respectively 33.3 and 38.1%), an absence of internal repeats, no G in position 19 and 13 and no C in position 19. The 749-start sense strand contains 3 A/U in positions 15-19 but no U in position 10, while the 795-start sense strand contains only 2 A/U in positions 15-19 but an U in position 10.

Rankl-directed siRNAs (*Rkl*-siRNAs) were transiently transfected with INTERFERin™ into 293RL cells which constitutively express the mouse full length *Rankl* mRNA. The silencing efficiency of *Rkl*-siRNAs was measured by Western blot detection of Rankl protein and was compared to Rankl detection in 293RL cells untransfected or transfected with CT-siRNAs which have no target in mouse or human cells. The siRNAs with the sense strand starting at position 749 induced a slight reduction of Rankl compared to untransfected or CT-siRNA-transfected 293RL cells. In contrast, Rankl was almost undetectable by Western blotting when cells were transfected with the siRNAs containing the sense strand starting at position 795 (Figure 1A, left panel). This more powerful *Rkl*-795 siRNA (next named *Rkl*-siRNA) was always efficient when formulated in lipoplexes with the cationic liposome RPR209120/DOPE (Figure 1A, right panel).

The down-regulation of Rankl by *Rkl*-siRNAs was not tested *in vitro* on the mouse and rat osteosarcoma cells because these cells do not express *Rankl* under basic culture conditions¹⁶. However, we checked whether the *Rkl*-siRNA lipoplexes have a direct effect on the viability of the mouse LucF-POS-1 and rat LucF-OSRGA osteosarcoma cells by measuring luciferase and mitochondrial activities. LucF-OSRGA and LucF-POS-1 cells were efficiently transfected as the luciferase activity was reduced by 60% and 35% respectively with siRNAs directed against luciferase mRNA (Figure 1B, left panel). Using the same transfection conditions, the *Rkl*-siRNA lipoplexes did not change the luciferase activity (Figure 1B, left panel) nor the mitochondrial activity measured by XTT assays (Figure 1B, right panel) as compared to these of LucF-OSRGA and LucF-POS-1 cells

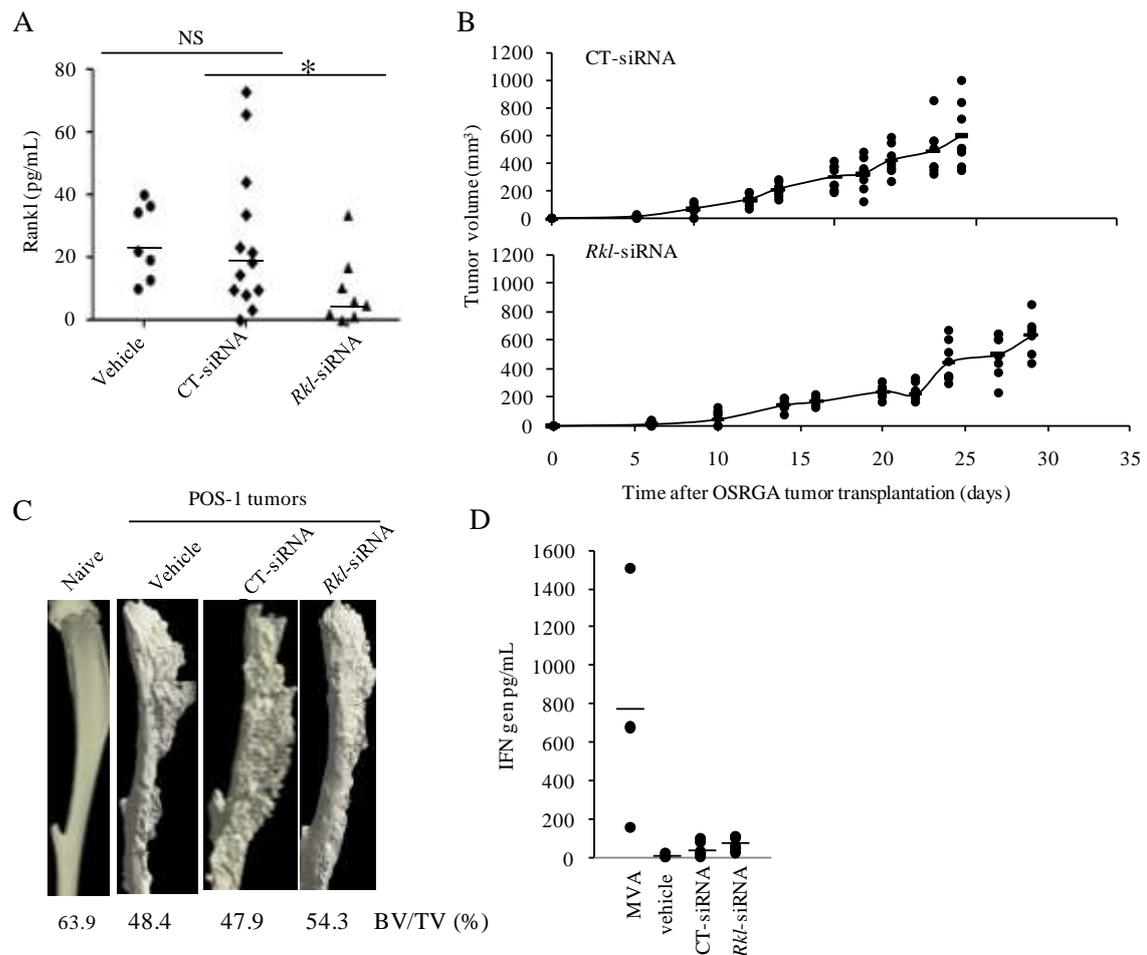


Figure 2: *In vivo* validation of *Rkl*-siRNAs formulated in lipoplexes. (A) Rankl concentration was measured by ELISA assay on blood samples from OSRGA tumor-bearing mice after 3 weeks of treatment. Individual measures are presented as dots and mean concentrations (line) are shown for the groups treated with vehicle, CT-siRNA or *Rkl*-siRNA lipoplexes. Asterisk and NS indicate a significant difference ($P < 0.05$) or a non significant difference respectively (B) Mean tumor volumes (line) and individual measures (dots) are shown for OSRGA tumor-bearing mice treated with CT-siRNA or *Rkl*-siRNA lipoplexes. (C) One representative tibia is shown for a mouse bearing no tumor (naive) or a POS-1 tumor-bearing mouse of each treated group (vehicle, CT-siRNA and *Rkl*-siRNA). Microscanner analyses were performed to evaluate the specific bone volume (BV/TV). (D) Interferon-gamma concentrations were measured by ELISA assay on blood samples from POS-1 tumor-bearing mice treated with vehicle, CT-siRNA or *Rkl*-siRNA lipoplexes ($n=8$) and compared to mice ($n=3$) injected with Modified Vaccinia virus Ankara empty plasmid (MVA). Individual measures are presented as dots and mean concentrations as lines.

untransfected or transfected by LucF-siRNA lipoplexes. Moreover, cell counting after trypan blue staining (data not shown) confirm that *in vitro* proliferation of mouse and rat osteosarcoma cells were not affected by *Rkl*-siRNAs lipoplexe transfections.

***Rankl*-directed siRNAs injected alone have no effect on tumor growth, but reduce osteosarcoma induced osteolysis.**

When the rat OSRGA tumor was induced in a nude mouse, we observed a measurable concentration of Rankl in blood serum, in contrast the Rankl level remains low in serum of C3H/HeN mouse bearing POS-1 tumor. In a first attempt, we took advantage of this OSRGA model to test the silencing efficiency of *Rkl*-siRNAs by following Rankl in blood serum. Mice were transplanted with OSRGA tumor fragment and three groups were constituted: NaCl considered as untreated (vehicle), CT-siRNA and *Rkl*-siRNA groups. The siRNA treatment was based on the optimized protocol previously described which consists in 3 intra-tumoral injections of 2.5 µg complexed siRNAs per week, the first injection beginning at the time of the tumor clinical detection²⁵. Despite variability in Rankl level between each animal, the *Rkl*-siRNA injected mice showed a decrease in systemic Rankl concentration of 48.5% as compared to the CT-siRNA group after 3 weeks of treatment (Figure 2A). However, the Rankl-down regulation was not associated with OSRGA tumor growth modulation. Indeed, the progression of tumor volume was similar between the *Rkl*-siRNA and the CT-siRNA groups (Figure 2B).

Anti-bone resorptive effects are difficult to quantify in the OSRGA model because osteolysis is masked by the strong osteogenic lesions on tumor bearing tibia. To test whether Rankl-down regulation by *Rkl*-siRNAs could have a specific inhibitory effect on bone resorption, we next injected siRNAs with the same protocol as previously used for OSRGA tumors in the mouse osteolytic POS-1 model. Similarly to previous observations, the *Rkl*-siRNA injections alone did not modify the tumor growth (data not shown). However the micro-architecture analysis of a representative tibia for each group showed a protective effect of *Rkl*-siRNAs against the tumor-induced bone lesions as compared to CT-siRNA or vehicle treated groups (BV/TV of 54.3% versus 48.4% and 47.9% respectively, Figure 2C).

Additionally, the production of interferon-gamma, which could be due to immune innate and/or adaptive response and corresponds to an unspecific off-target effect of siRNAs, was quantified in the blood serum of mice. As compared to the vehicle group, we observed a 10-fold increase of interferon response associated to vectorised siRNA

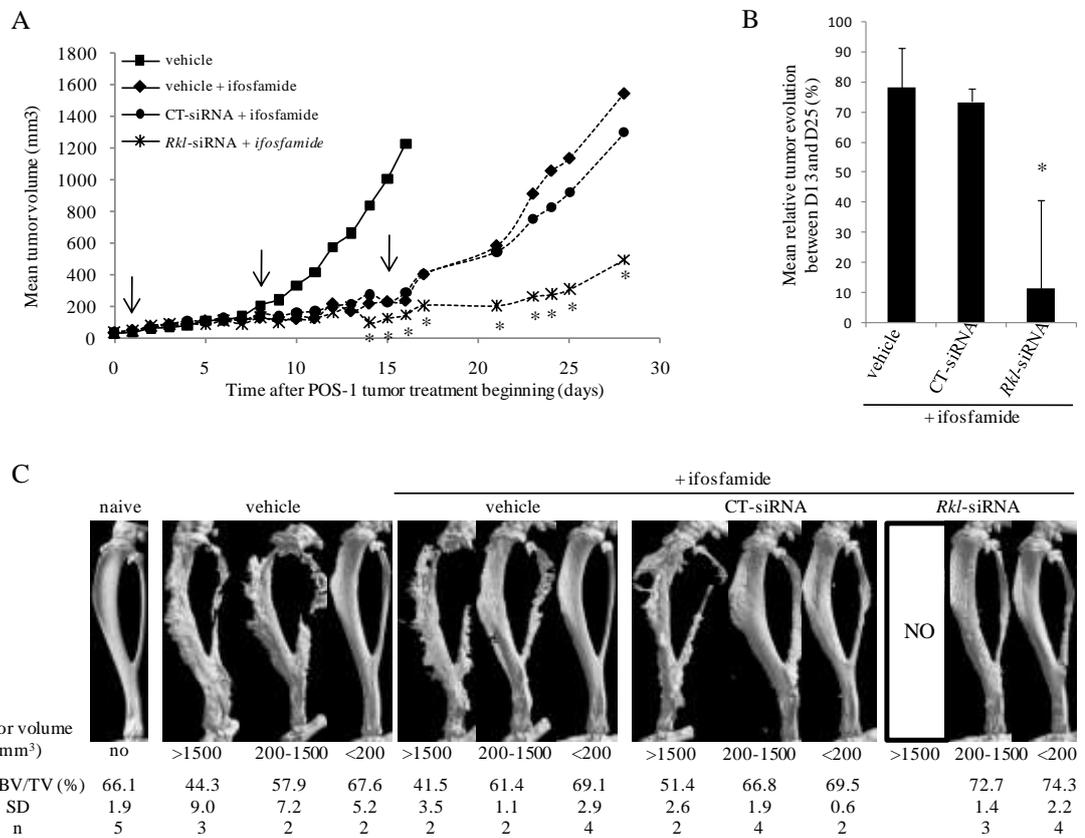


Figure 3: *Rkl*-siRNA injections combined with ifosfamide in the osteolytic POS-1 osteosarcoma model. C3H/HeN mice were transplanted with POS-1 tumor fragment and divided in 4 groups: vehicle (NaCl injections) associated or not with ifosfamide treatment, CT-siRNA and *Rkl*-siRNA groups were both combined with the chemotherapeutic agent. Because individual start of treatment was performed for each animal, results are shown as the tumor growth since the first siRNAs injection day (A). The mean tumor volume evolution of each group after 3 cures of ifosfamide (represented with arrows) is shown and calculated as a percentage with the following formula: (Tumor volume at day 25 – Tumor volume at day 13)/ Tumor volume at day 13 (B). Asterisks indicate significant differences between CT- and *Rkl*-siRNA groups ($p < 0.05$) for (A) and (B). (C) Microscanner analyses and BV/TV percentage calculations were performed. Mean BV/TV %, standard deviation (SD) and animal number (n) are indicated for each treated group divided in three groups of tumor volume values.

injections in C3H/HeN mice bearing POS-1 tumor, while a 150-fold increase was observed in same strain mice injected with MVA empty vectors (Figure 2D). Same results were noticed for the OSRGA model induced in nude mice with a 3-fold increase of IFN concentration after vectorised siRNA injections. This increase was 35-fold reduced as compared to the one observed in animals that received MVA vectors (data not shown).

In an osteolytic osteosarcoma model, *Rankl*-directed siRNAs enhanced tumor response to chemotherapy and slowed tumor regrowth after chemotherapy arrest.

Because the *Rkl*-siRNAs enabled to protect bone from osteolysis induced by osteosarcoma, we next asked whether the *Rkl*-siRNAs could enhance the chemotherapy effects. Therefore, new experiments using the POS-1 osteolytic osteosarcoma model were conducted combining the *Rkl*-siRNAs with the chemotherapeutic agent ifosfamide which was already shown to slowdown tumor progression in the same osteosarcoma model for approximately 50%²⁵.

The results presented in figure 3A clearly demonstrated a significant decrease of the mean tumor volume in the three groups of mice treated with ifosfamide (ifosfamide associated with either vehicle, CT-siRNAs or *Rkl*-siRNAs) as compared to the control group (vehicle) as early as day 9 after POS-1 tumor treatment beginning, when two courses of ifosfamide have been administered at day 1 and day 8. At day 14 and during the last ifosfamid course (between days 15 and 17), the mean tumor volume of mice treated with ifosfamide plus *Rkl*-siRNAs was significantly lower than those of mice treated with either ifosfamide alone or plus CT-siRNAs ($p < 0.05$, Figure 3A). This result indicated an additive effect of *Rkl*-siRNA injections to chemotherapy response as compared to CT-siRNA injections. The last course of ifosfamide was administrated at days 15, 16 and 17, while the vehicle, CT-siRNA and *Rkl*-siRNA injections were continued. After the last ifosfamide course, the tumors of mice treated with vehicle or CT-siRNAs grew faster than those of mice treated with *Rkl*-siRNAs until the end of the experiment at day 28 ($p < 0.05$, Figure 3A). This slower tumor progression induced by the *Rkl*-siRNA injections is evidenced in figure 3B which presents the averages of relative tumor progression in each group for each animal between day 13 and day 25 corresponding to tumor relapse.

The effects of *Rkl*-siRNAs were also analysed at the bone level by micro-scanner analyses (Figure 3C). Bones in contact to a tumor with volume greater than 1500 mm³ were associated with a low specific bone volume as compared to tibia of naïve mice: mean BV/TV of 44%, 41.5% or 51.4% respectively for the groups treated with vehicle or

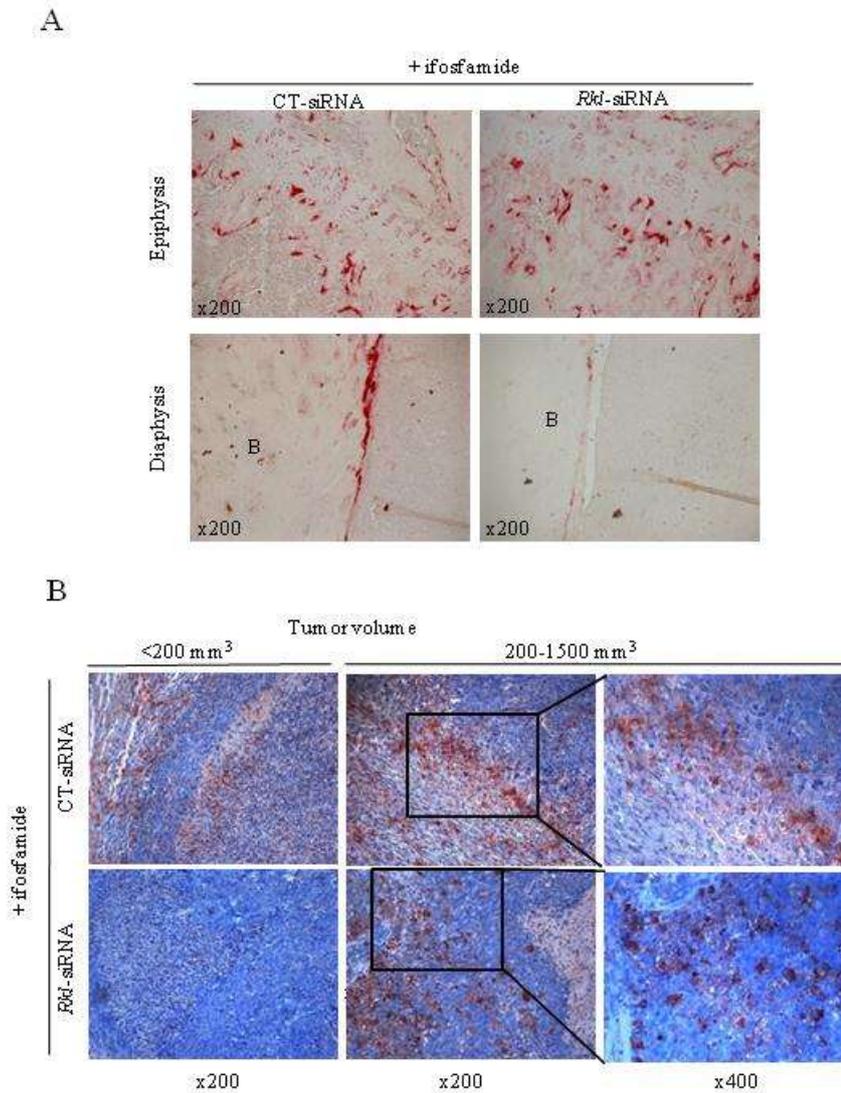


Figure 4: Trap and Rankl detection after *Rkl*-siRNA injections in POS-1 osteosarcomas. One representative photomicrograph of histology analyses is shown for the group of POS-1 tumor-bearing mice treated with ifosfamide plus CT-siRNAs or the one treated with ifosfamide plus *Rkl*-siRNAs. **(A)** Trap staining was performed to identify osteoclasts at the interface between tumor and cortical bone **(B)**. **(B)** Immuno-detection of Rankl was performed in tumor tissues.

ifosfamide or ifosfamide plus CT-siRNAs versus 66.1% for tibia without tumor. In contrast; small tumors (volume less than 200 mm³) were associated with weak bone lesions with specific bone volumes identical or slightly increased as compared to tibia of naïve mice (mean BV/TV of 67.6%, 69.1% or 69.5% respectively for the groups treated with vehicle, ifosfamide or ifosfamide plus CT-siRNAs). Intermediate specific bone volumes (57.9% to 66.8%) were calculated for tumors of intermediate size (between 200 to 1500 mm³). The group treated with ifosfamide plus *Rkl*-siRNAs did not present tumor greater than 1500 mm³ and showed the highest specific bone volumes: 72.7% and 74.3% for tumor volumes of 200 to 1500 mm³ or less than 200 mm³ respectively. Overall, these values highlighted a marked osteolysis for mice bearing big tumor and demonstrated the efficiency of *Rkl*-siRNAs toward bone degradation as evidenced by the more elevated BV/TV ratio in this group as compared to all other groups even to the naïve mice.

This prevention of para-tumoral osteolytic bone lesions was associated to a decrease of osteoclastic cells detected by Trap staining for *Rkl*-siRNA treated tumors as compared to the control group treated with ifosfamide plus CT-siRNAs (Figure 4A) and as compared to other control groups (vehicle, ifosfamide plus vehicle or naïve tibia; data not shown). This decrease of osteoclast number was observed only in close contact between tumor and tibia metaphyses that corresponds to the site of lipoplexe injections, while numerous osteoclasts were still detected by Trap staining within the epiphyses near growth plates (Figure 4A).

The immunohistochemistry detection of Rankl revealed Rankl positive cells within the tumor samples of mice treated with ifosfamide plus CT-siRNAs, especially at the interface of necrotic areas and proliferative areas of tumors (Figure 4B). In contrast for mice treated with ifosfamide plus *Rkl*-siRNAs, the Rankl positive cells were not detected within small tumors (volume less than 200 mm³) and were less abundant and more dispersed within larger tumors than their counterparts in mice treated with ifosfamide plus CT-siRNAs. These results suggested that *Rkl*-siRNA injections have effectively down-regulated the Rankl production within osteosarcomas and have inhibited the osteoclast differentiation at the bone-tumor interface.

In an osteogenic osteosarcoma model, *Rankl*-directed siRNAs induced tumor regrowth delay after cessation of chemotherapy.

We next investigated the effect of *Rkl*-siRNAs combined with ifosfamide in a model of osteosarcoma which induces osteolytic lesions together with predominant osteogenic

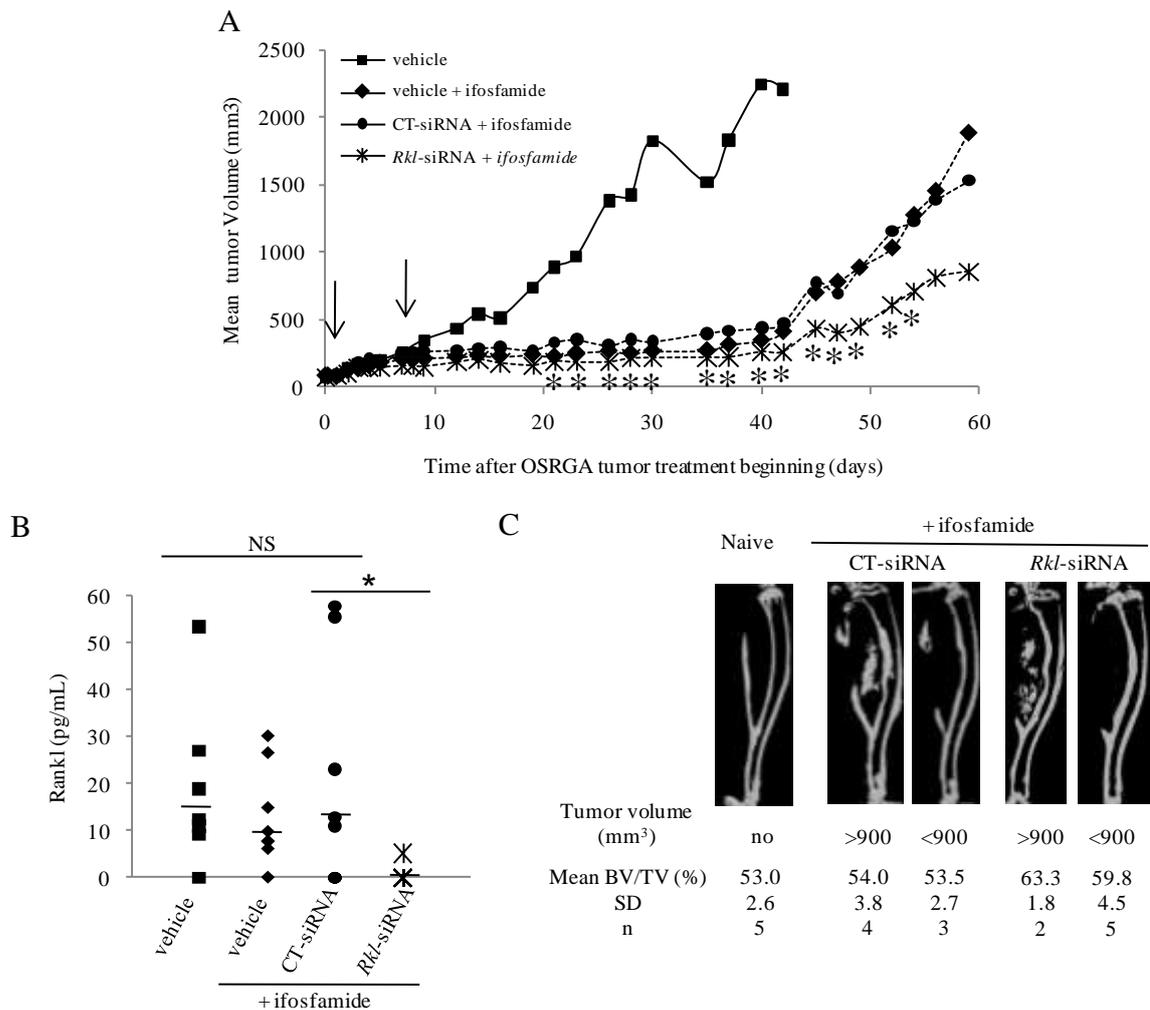


Figure 5: *Rkl*-siRNA injections combined with ifosfamide in the osteocondensant OSRGA osteosarcoma model. Nude mice were transplanted with OSRGA tumor fragment and divided in 4 groups: vehicle associated or not with ifosfamide, CT-siRNA and *Rkl*-siRNA groups plus ifosfamide. Because individual start of treatment was performed for each animal, results are shown as the tumor growth since the first siRNAs injection day (A). Mean tumor volume evolution of each group after 2 courses of ifosfamide (represented with arrows) is shown. (B) Systemic Rankl concentration was evaluated on blood serums by ELISA assay. Asterisks show statistically differences between CT- and *Rkl*-siRNA groups ($p < 0.05$) for (A) and (B). (C) Microscanner analyses and BV/TV percentage calculations were performed. Mean BV/TV %, standard deviation (SD) and animal number (n) are presented for each treated group divided in two groups of tumor volume values and for naïve bone.

ones as observed in patients. To this aim, rat OSRGA cells were used to induce osteosarcoma in nude mice as previously described²⁵. As shown in the figure 5A, the courses of ifosfamide were highly efficient to stop the tumor development in the three treated groups of mice (ifosfamide associated with either vehicle, CT-siRNAs or *Rkl*-siRNAs) as compared to the untreated group (vehicle) as early as day 9 after OSRGA tumor treatment beginning. Thirteen days after the last ifosfamide injection, the animals with prolonged injections of *Rkl*-siRNAs showed smaller tumor volumes than those with prolonged injections of vehicle or CT-siRNAs. Moreover, the *Rkl*-siRNA-treated tumors grew significantly slower from day 42 until day 54 as compared to the two control groups previously treated with ifosfamide (Figure 5A).

At the end of the experiment, the concentration of Rankl was measured in blood serum for each animal. As presented in figure 5B, all mice (n=8) treated with ifosfamide plus *Rkl*-siRNAs showed lower Rankl concentration (less than 6pg/mL) than mice treated with ifosfamide plus vehicle or plus CT-siRNAs. These observations could result both from the down-regulation of *Rankl* expression by RNA interference or from the moderate development of tumors in the group of mice treated with *Rkl*-siRNAs.

Despite visible bone remodeling induced by the tumor development, the BV/TV calculations showed no difference for untreated tumors (50.6 and 51.5 % for tumor greater than or less than 900 mm³ respectively) as compared to the naïve bone (53 %) (Figure 5C). These results highlight the difficulty to discriminate the cortical bone from the ectopic bone formation by OSRGA tumor itself. Ifosfamide treatments may have induced a slight gain of bone (55.4 and 57.3 % for ifosfamide alone; 54.0 and 53.5 % for ifosfamide plus CT-siRNAs injections). The tibias of animals treated with ifosfamide plus *Rkl*-siRNAs seemed to exhibit a greater BV/TV of 63.3% for tumors greater than 900 mm³ and 59.8 % for small ones. Therefore the *Rkl*-siRNA injections enabled to inhibit Rankl production in serum and to contain osteosarcoma progression even when the bone formation is predominant compared to the osteolysis.

Discussion

The central role of the proresorptive cytokine RANKL make it an attractive therapeutic target in anti bone resorption strategies in order to limit tumor proliferation at tumor bone site and enhance tumor cell response to anti-tumoral agents^{15,31,32}. Our study showed a new methodology for specific inhibition of RANKL production in bone tumor microenvironment. Indeed, our results validated a designed siRNA sequence which was efficient to decrease local and systemic Rankl production in the osteolytic POS-1 and the osteogenic OSRGA animal models respectively. This inhibition was associated to a decrease of Rankl function showed by the prevention of para-tumoral osteolytic lesions. Moreover, siRNA molecules present some advantages of chemicals molecules and others of proteins and antibodies, the two types of anti-bone resorption agent already developed in clinic. Like therapeutic proteins (OPG) and antibodies (Denosumab®), siRNAs show a stronger affinity and specificity to their target in contrast to chemical molecules such as Zometa®. Moreover, as compared to the recombinant OPG or Denosumab®, siRNAs are easier and less expensive to produce. Finally, the identification of efficient siRNAs and pharmaceutical development is faster than other anti-bone resorption strategies^{22,33}. Indeed, the design of two siRNA sequences directed against *Rankl* transcript and following Reynolds et al criterias³⁰ was sufficient to identify an efficient sequence. Furthermore, instead of blocking RANKL in the tumor microenvironment siRNAs directly inhibit its production.

The efficiency of siRNAs *in vivo* transfection was optimized by the association of nucleic acid with a cationic liposome (RPR209120/DOPE) in a protocol that was not associated to any unspecific effect on tumor cell themselves by targeting a reporter gene which was not involved in tumor proliferation or death²⁵. Indeed, the efficient activation of RNA interference pathway in osteosarcoma cell lines modified to express the luciferase gene by transfection with LucF-siRNA lipoplexes or *Rkl*-siRNA ones was not associated with any effects on cell viability and proliferation. However the injections of lipoplexes that contained 2.5 µg of *Rkl*-siRNAs were efficient to decrease Rankl production and prevented from para-tumoral osteolysis but this inhibition of bone resorption had no effect on osteosarcoma tumor proliferation even if several experiments showed a tendency of tumor slowdown (data not shown). The increase of siRNA quantity could improve this effect on tumor progression itself but could be associated to unspecific effects. These effects may result from the activation of innate immune response through nucleic acid

recognition by Toll Like Receptor (TLR) 3, 7 and 8 in immune cells ³⁴ or Melanoma Differentiation Associated gene (MDA) – 5 in other cells ³⁵ that induce IFN secretion. This IFN response is associated to a complete inhibition of protein synthesis and total RNA degradation without any relationship with the targeted transcript through protein kinase R and RNase L activation respectively ³⁶. Furthermore, the cationic liposome could also be associated to toxicity especially by modifying lipid organization in the cell membrane that could be associated to cell necrosis. The transfection efficiency of these particules was optimized by the addition of a DNA cargo which has minor effect on lipoplexe structure but allows a better dissociation (Rhinn, 2009). Unfortunately, this DNA cargo in lipoplexes formulation should be replaced for a clinical development of the particules.

We can not exclude the possibility of *Rkl*-siRNAs efficiency to slowdown alone osteosarcoma tumor progression as observed by overexpression of OPG or RANK-Fc ^{20,21}; but the quantity of nucleic acid injected is limited to their possible effects on immune system and the possible necrosis due to the use of cationic liposomes. One possibility to improve *Rkl*-siRNA efficiency without any increasing of siRNA dosage and injection frequency is to accumulate lipoplexes particules to the target cells. Moreover, the local administration of siRNAs used in this study was efficient to interfere with Rankl production but is limited to accessible and detected tumors and does not prevent micrometastases development in a second bone site. The active development of vectors for gene transfer and their modifications for blood stability and for delivery improvement to target tissues or cells allows to consider a specific inhibition of RANKL expression localized to the tumor site after systemic injection of vectorised *RANKL* targeting siRNAs. Because of the great amount of positive charges present as the surface of the cationic lipoplexes they can interfere with blood proteins inducing a lower transfection efficiency and the formation of aggregates associated to embolism. The use of polyethylene glycol (PEG) to mask the positive charges showed a better stability of the particules after systemic injections ³⁷(Garinot, 2007). This option could be associated or not to the presence of a specific ligand for an accumulation of lipoplexes particules at the tumor bone site ³⁸. Indeed, after intravenous injections lipoplexes accumulate in lungs, liver and rate ³⁹. Mouse sarcomas are known to express $\alpha v \beta 3$ integrins which present an affinity for RGD peptides (Arg-Gly_Asp). The expression of these integrins was also noticed in SaOS2 human osteosarcoma model induced in nude mice ⁴⁰. Moreover, the use

of these peptides was already performed in a context of vectorisation in tumor imaging ⁴¹. The specific delivery of lipoplexes to osteosarcoma tumors after intravenous injections will prevent from undesirable effect associated to a systemic RANKL decrease that could affect bone growth, immune and vascular functions of the cytokine. This vectorisation will also prevent from unspecific effects of siRNAs on immune system activation but also from saturation of RNAi mechanism. Indeed, several studies showed the possible competition between endogeneous pathway of RNAi mediated by microRNAs and high dosage of exogeneous synthetic siRNAs for incorporation in RISC complex.

Numerous preclinical and clinical data highlight the role of molecular and cellular interactions of tumor cells with the microenvironment in influencing cancer growth, survival, invasiveness and dissemination. In the context of tumor development in bone, like osteosarcomas, the use of anti-bone resorption molecules could improve the survival by containing tumor proliferation but these different strategies could not replace chemotherapeutic agents because they have no effect on tumor cells themselves and will not be able to prevent and treat metastases in soft tissues. In this context, OPG administration in a human bone metastases model enhanced therapeutic effect of an antibody targeting the Epidermal growth factor receptor implicated in cell growth and death ³¹. This protein also improved the response of prostate cancer bone metastases to docetaxel known to induce a cell cycle arrest and apoptosis of tumor cells ³². In the French clinical trials of osteosarcoma treatment OS2006, the injections of zoledronic acid are associated to conventional chemotherapy. In our study, the association between *Rkl*-siRNA injections and ifosfamide cures showed a synergistic effect on containing tumor progression and delay tumor relapse by constant administration of siRNAs. In this context, the association of an anti-bone resorption siRNA and an anti-tumoral one offers new interesting opportunities to develop bi-therapy protocols. Some preclinical studies on osteosarcoma tumors already validated RNA interference molecules targeting genes implicated in tumor metabolism like the Glucose transporter protein 1 ⁴², cell cycle with inhibition of stathmin production ⁴³ or apoptosis by targeting Bcl-2 ⁴⁴. This offers new opportunities for multitargeting in a context of tumor development at bone site by the injection of lipoplexes containing an anti-resorptive siRNA and an anti-tumoral one. This possibility to complex several siRNAs in the same lipoplexe was already performed by Khoury et al study in which 3 vectorised siRNAs targeting 3 different transcripts (with the same cationic liposome RPR209120/DOPE used in our study) improved significantly

the clinical pattern of murin arthritis as compared to each vectorised siRNA alone ²³. Moreover, the use of siRNAs allows to inhibit the expression of new target for which no chemical molecules or antibodies are yet developed ^{22,33}.

Acknowledgments We thank Dr Georges Vassaux and Lucile Tran from the U948 unit for providing serum of vaccine mice with MVA vectors. Moreover, this study was supported by the Re'gion des Pays de la Loire (JG/ND/RECH N 660, fellowship for JR) and the Agence Nationale de la Recherche 2007 'Pathophysiology of Human diseases' Project N R07196NS.

1. Linet, M.S., Ries, L.A., Smith, M.A., Tarone, R.E. & Devesa, S.S. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J. Natl. Cancer Inst* **91**, 1051-1058 (1999).
2. Desandes, E. et al. Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr Blood Cancer* **43**, 749-757 (2004).
3. Kim, H.J., Chalmers, P.N. & Morris, C.D. Pediatric osteogenic sarcoma. *Curr. Opin. Pediatr* **22**, 61-66 (2010).
4. Picci, P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis* **2**, 6 (2007).
5. Ward, W.G. et al. Pulmonary metastases of stage IIB extremity osteosarcoma and subsequent pulmonary metastases. *J. Clin. Oncol* **12**, 1849-1858 (1994).
6. Heymann, D. et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* **37**, 74-86 (2005).
7. Roelofs, A.J., Thompson, K., Gordon, S. & Rogers, M.J. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin. Cancer Res* **12**, 6222s-6230s (2006).
8. Ory, B. et al. Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* **104**, 2522-2529 (2005).
9. Coleman, R.E. Risks and benefits of bisphosphonates. *Br. J. Cancer* **98**, 1736-1740 (2008).
10. Hoff, A.O. et al. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J. Bone Miner. Res* **23**, 826-836 (2008).
11. Pozzi, S. et al. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin. Cancer Res* **15**, 5829-5839 (2009).
12. Rauch, F., Cornibert, S., Cheung, M. & Glorieux, F.H. Long-bone changes after pamidronate discontinuation in children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *Bone* **40**, 821-827 (2007).
13. Smith, E.J. et al. Transient disturbance in physeal morphology is associated with long-term effects of nitrogen-containing bisphosphonates in growing rabbits. *J. Bone Miner. Res* **20**, 1731-1741 (2005).
14. Baud'huin, M. et al. Key roles of the OPG-RANK-RANKL system in bone oncology. *Expert Rev Anticancer Ther* **7**, 221-232 (2007).
15. Neville-Webbe, H.L. & Coleman, R.E. Bisphosphonates and RANK ligand inhibitors for the treatment and prevention of metastatic bone disease. *Eur. J. Cancer* **46**, 1211-1222 (2010).
16. Oyajobi, B.O. et al. Therapeutic efficacy of a soluble receptor activator of nuclear factor kappaB-IgG Fc fusion protein in suppressing bone resorption and hypercalcemia in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res* **61**, 2572-2578 (2001).
17. Jones, D.H. et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* **440**, 692-696 (2006).
18. Heath, D.J. et al. An osteoprotegerin-like peptidomimetic inhibits osteoclastic bone resorption and osteolytic bone disease in myeloma. *Cancer Res* **67**, 202-208 (2007).
19. Vallet, S., Smith, M.R. & Raje, N. Novel bone-targeted strategies in oncology. *Clin. Cancer Res* **16**, 4084-4093 (2010).
20. Lamoureux, F. 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* **7**, 3389-3398 (2008).
21. Lamoureux, F. et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and

- bone resorption. *Cancer Res* **67**, 7308-7318 (2007).
22. López-Fraga, M., Martínez, T. & Jiménez, A. RNA interference technologies and therapeutics: from basic research to products. *BioDrugs* **23**, 305-332 (2009).
 23. Houry, M. et al. Efficient suppression of murine arthritis by combined anticytokine small interfering RNA lipoplexes. *Arthritis Rheum* **58**, 2356-2367 (2008).
 24. Houry, M. et al. Efficient new cationic liposome formulation for systemic delivery of small interfering RNA silencing tumor necrosis factor alpha in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* **54**, 1867-1877 (2006).
 25. Rousseau, J. et al. Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models. *Cancer Gene Ther* **17**, 387-397 (2010).
 26. Uesugi, M., Koshino, T., Mitsugi, N. & Hiruma, T. Predictive value of serum immunosuppressive acidic protein for lung metastasis after amputation of murine osteosarcoma of the lower limb. *Cancer Lett* **155**, 169-172 (2000).
 27. Thiéry, J., Perdereau, B., Gongora, G. & Mazabraud, A. Un modèle expérimental d'ostéosarcome chez le rat. 1686-9 (1982).
 28. Cherrier, B. et al. A new experimental rat model of osteosarcoma established by intrafemoral tumor cell inoculation, useful for biology and therapy investigations. *Tumour Biol* **26**, 121-130 (2005).
 29. Kutscher, S. et al. MVA-nef induces HIV-1-specific polyfunctional and proliferative T-cell responses revealed by the combination of short- and long-term immune assays. *Gene Ther* (2010).doi:10.1038/gt.2010.90
 30. Reynolds, A. et al. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol* **22**, 326-330 (2004).
 31. Canon, J. et al. Inhibition of RANKL increases the anti-tumor effect of the EGFR inhibitor panitumumab in a murine model of bone metastasis. *Bone* **46**, 1613-1619 (2010).
 32. Miller, R.E. et al. RANK ligand inhibition plus docetaxel improves survival and reduces tumor burden in a murine model of prostate cancer bone metastasis. *Mol. Cancer Ther* **7**, 2160-2169 (2008).
 33. Bumcrot, D., Manoharan, M., Kotliansky, V. & Sah, D.W.Y. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat. Chem. Biol* **2**, 711-719 (2006).
 34. Marques, J.T. & Williams, B.R.G. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat. Biotechnol* **23**, 1399-1405 (2005).
 35. Kato, H. et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-105 (2006).
 36. Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. & Williams, B.R.G. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol* **5**, 834-839 (2003).
 37. Garinot, M. et al. Amphiphilic polyether branched molecules to increase the circulation time of cationic particles. *Bioorg. Med. Chem* **15**, 3176-3186 (2007).
 38. Ogris, M. & Wagner, E. Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes. *Somat. Cell Mol. Genet* **27**, 85-95 (2002).
 39. Thomas, M. & Klibanov, A.M. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **62**, 27-34 (2003).
 40. Duan, X. et al. Association of alphavbeta3 integrin expression with the metastatic potential and migratory and chemotactic ability of human osteosarcoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* **21**, 747-753 (2004).
 41. Chopra A 1-[18F]Fluoro-3,6-dioxatetracosane [Molecular Imaging and Contrast Agent Database. 2004] - PubMed result. (2009).à

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed>>

42. Fan, J., Zhou, J., Yu, G. & Lu, D. Glucose transporter protein 1-targeted RNA interference inhibits growth and invasion of the osteosarcoma cell line MG63 in vitro. *Cancer Biother. Radiopharm* **25**, 521-527 (2010).
43. Wang, R. et al. Inhibiting proliferation and enhancing chemosensitivity to taxanes in osteosarcoma cells by RNA interference-mediated downregulation of stathmin expression. *Mol. Med* **13**, 567-575 (2007).
44. Zhao, Y. et al. Enhanced chemosensitivity of drug-resistant osteosarcoma cells by lentivirus-mediated Bcl-2 silencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **390**, 642-647 (2009).

3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus montrent qu'il est possible d'inhiber de manière spécifique l'expression d'une protéine impliquée dans la cancérogenèse de l'ostéosarcome par une stratégie d'ARN interférence. Ainsi le ciblage de Rankl par des siRNAs complexés avec le liposome RPR209120/DOPE permet une inhibition significative de son expression sans réponse interféron significative. Cette inhibition prévient les lésions ostéolytiques associées au développement tumoral et améliore les effets de l'ifosfamide dans un protocole de bi-thérapie.

Cependant, ces résultats ont été obtenus après injection locale de siRNAs, l'étape suivante consiste à établir un protocole d'administration des complexes siRNAs / liposomes par voie systémique de manière à se rapprocher au plus près d'un protocole clinique chez l'Homme. En effet, l'application de siRNAs en oncologie implique une action sur les différents sites tumoraux, sites qui ne sont pas toujours accessibles sans chirurgie.

L'optimisation de ce protocole passe notamment par un adressage efficace des lipoplexes jusqu'au tissu cible, à savoir le microenvironnement tumoral de l'ostéosarcome. Ceci implique une stabilité des complexes dans la circulation sanguine, un échappement au système de surveillance immunitaire et l'arrivée d'un fort pourcentage de molécules injectées sur le site ciblé.

De par le rapport de charge utilisé pour produire les lipoplexes, ces particules présentent à leur surface une quantité importante de charges positives. La présence de ces charges utiles à la complexation des acides nucléiques et le passage de la membrane plasmique représente cependant un obstacle à leur administration par voie sanguine. En effet, une administration par voie intraveineuse peut conduire à l'interaction des lipoplexes avec des protéines sériques ou des cellules sanguines circulantes ce qui entraîne la formation d'agrégats qui inhibent la transfection et peuvent conduire à une embolisation au niveau de la microcirculation des organes. Les lipoplexes sont alors immédiatement neutralisés, conduisant à leur accumulation dans les premiers tissus irrigués comme les poumons, le foie ou la rate ²⁷⁸. Une première possibilité consiste à masquer les charges positives des complexes, la molécule la plus utilisée étant le polyéthylène glycol (PEG) ²⁷⁹. Mais cette stratégie va de paire avec une diminution des interactions électrostatiques avec les membranes

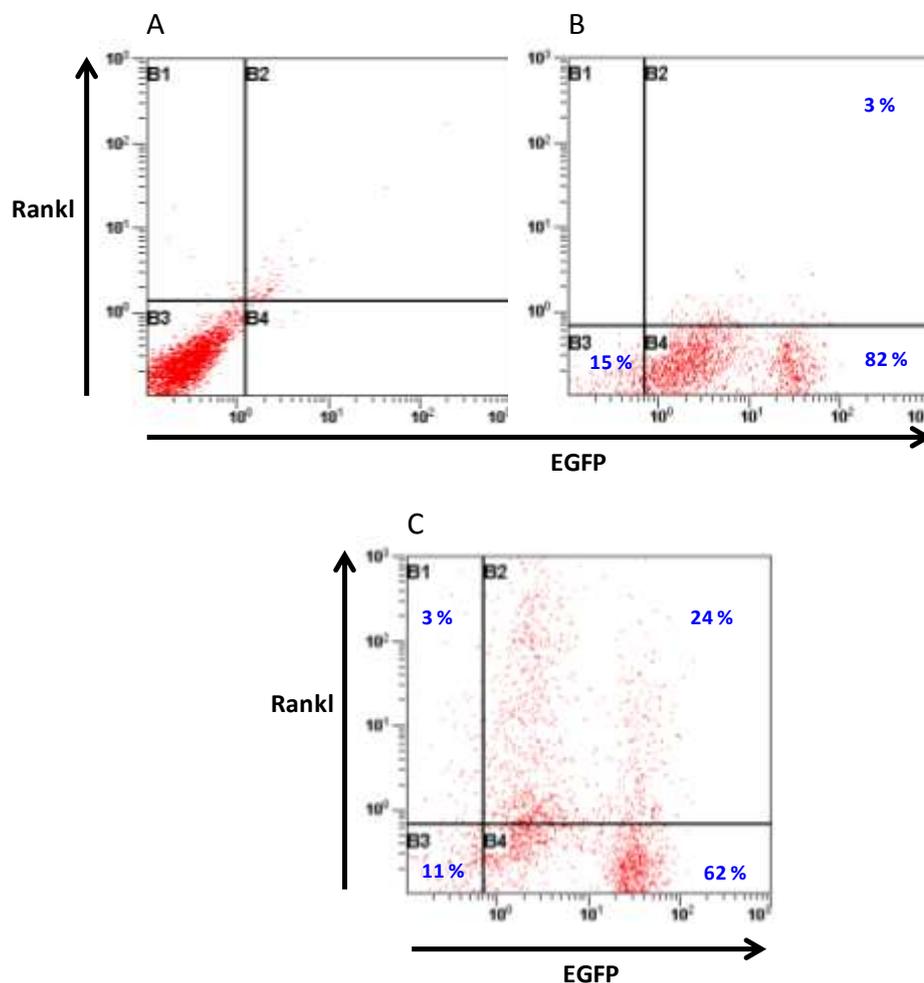


Figure 40 : Analyse de l'expression de Rankl dans la tumeur POS-1 exprimant l'EGFP par cytométrie en flux. (A) Analyse de cellules issues d'une tumeur POS-1 non EGFP et non marquées avec l'anticorps anti-Rankl. Quantification de l'expression de l'EGFP dans une tumeur LucF-POS-1 sans **(B)** et avec marquage par l'anticorps anti-Rankl **(C)**. La totalité du tissu tumoral est dilacérée puis digérée par la collagénase 0,1% et 0,3% d'élastase pendant 2h à 37°C. Après filtration et saturation des sites aspécifiques et des récepteurs aux fragments Fc, les cellules sont marquées avec 0,8µg d'anticorps anti-Rankl (BD biosciences, clone IK22-5). L'analyse de l'expression endogène de l'EGFP par les cellules tumorales et de Rankl suite au marquage est réalisée par le cytomètre FC500 (Beckman Coulter).

cellulaires conduisant à une perte d'efficacité de transfection ²⁸⁰. Une deuxième possibilité consiste à ajouter une tête de ciblage exposée à la surface des complexes. Le ciblage d'un type cellulaire peut être envisagé par liaison covalente ou électrostatique sur le vecteur de ligands reconnaissant des récepteurs spécifiques des membranes plasmiques des cellules à traiter ²⁸¹. Certaines stratégies développées utilisent une combinaison de ces deux possibilités à savoir la présence de composés PEG et d'un ligand spécifique ²⁸².

Dans notre étude de ciblage d'expression de Rankl dans le microenvironnement tumoral, l'ajout d'un ligand implique (1) d'identifier clairement la population cellulaire majoritairement impliquée dans la sécrétion de Rankl lors du développement des ostéosarcomes POS-1 et OSRGA et (2) d'optimiser le ciblage de ces cellules.

3.1. Source de Rankl dans les modèles murins d'ostéosarcome

De manière à identifier les cellules à l'origine de l'expression de Rankl au sein des tumeurs d'ostéosarcome utilisées dans notre étude, des expériences de cytométrie en flux ont été réalisées sur des tumeurs LucF-POS-1. En effet, les cellules tumorales expriment non seulement la luciférase mais également l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) pour 97% d'entre elles (voir chapitre 1 des résultats, Figure 1 de Rousseau et *al*, 2010) nous permettant ainsi de distinguer la population tumorale exprimant l'EGFP des cellules stromales du microenvironnement. Le marquage des tumeurs par un anticorps spécifique de Rankl nous a permis d'étudier l'expression de la cytokine par cytométrie en flux en fonction de la population cellulaire d'intérêt. L'analyse de l'expression de Rankl en fonction de l'expression de l'EGFP présentée dans la figure 40 montre une expression de Rankl par les cellules stromales (non EGFP, 3% des cellules totales) et par les cellules tumorales (24% des cellules totales). Autrement dit, dans le tissu tumoral la source de Rankl serait majoritairement les cellules tumorales elles-mêmes dans le modèle ostéolytique POS-1.

La lignée POS-1 n'exprime pas la cytokine Rankl *in vitro* mais les résultats de cytométrie montrent que l'induction de son expression reste possible *in vivo*. Le développement de l'ostéosarcome et la résorption osseuse qui en résulte sont considérés comme des phénomènes inflammatoires faisant intervenir des cytokines

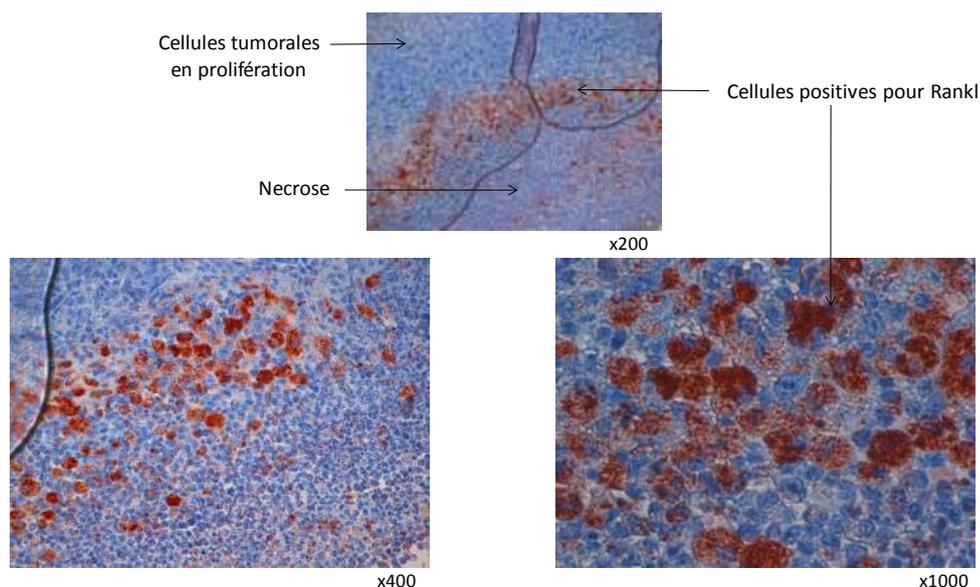


Figure 42 : Détection de Rankl par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs POS-1. Les tumeurs sont préalablement fixées dans un tampon contenant 4% de paraformaldéhyde avant d'être incluses en paraffine. L'immunohistochimie est ensuite réalisée sur des coupes de 5 μ m d'épaisseur déparaffinées et réhydratées. Le pré-traitement des lames par de l'eau oxygénée à 3% permet d'inhiber les peroxydases endogènes, puis les sites aspécifiques sont saturés par une solution de PBS-BSA 4%. L'anticorps anti-Rankl (N19 au 1/30^{ème}, Santa Cruz, Heidelberg, Allemagne) est ensuite utilisé et révélé par (1) ajout d'un anticorps secondaire couplé à la biotine (Vector laboratories, Burlingame, CA) et (2) ajout d'une solution de peroxydase couplée à la streptavidine. La détection du signal se fait grâce au système AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole, Sigma-Aldrich). Les coupes sont ensuite contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer.

de la famille des interleukines ou encore du TNF, cytokines connues pour être capables d'induire l'expression de Rankl (voir paragraphe 1.1.1 de ce même chapitre) dans des lignées d'ostéoblastes murins tels que les MC3T3. C'est pourquoi nous avons cultivé cette lignée d'ostéosarcome en présence de ces cytokines ou encore de lipopolysaccharides (LPS). Une expression de Rankl a ainsi pu être mise en évidence par RT-PCR pour les cellules MC3T3 (Figure 41A) et celles de la lignée POS-1 en présence d'IL-1 (Figure 41B). Dans une deuxième expérience nous avons testé l'effet d'un cocktail de molécules composé d'OSM, de PTH, d'IL-1, de TNF α (toutes à 100ng/mL), 10nM de vitamine D3 et 10nM de dexaméthazone ; la culture des cellules POS-1 en présence de ces agents induit la transcription de Rankl au sein de cette lignée d'ostéosarcome dès 24h (Figure 41C).

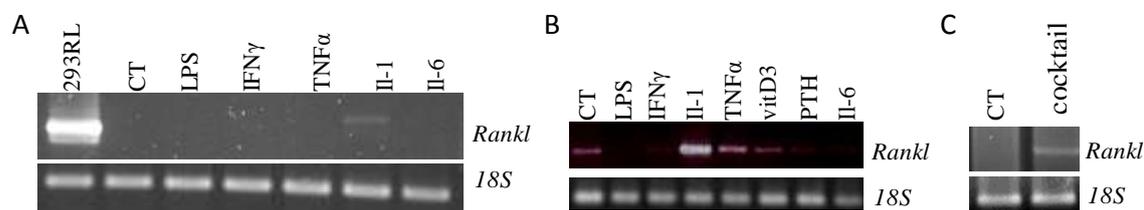


Figure 41 : Induction de la transcription de Rankl dans une lignée d'ostéoblastes (MC3T3) et dans une lignée d'ostéosarcome (POS-1). Trois cent mille cellules MC3T3 (A) et 40 000 cellules POS-1 sont cultivées en présence de cytokines inflammatoires, connues pour induire l'expression de Rankl dans les cellules stromales ostéoblastiques, à 100ng/mL seules (B) ou en association (C) pendant 12h. Les cellules sont ensuite lysées pour en extraire les ARN totaux. L'analyse de l'expression de Rankl est réalisée par PCR semi-quantitative sur les ARNm rétro-transcrits grâce à la Platinum High fidelity (Invitrogen) avec le duplex de primers suivant : sens 5'ATGCGCCGGGCCAGCCGAGACTACGGCAAGT 3' et antisens 5' TCAGTCTATGTCCTGAACTTTGAAAGCCCCAAAGTACGTGCG 3'. Les primers sens 5' TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTTCG 3' et antisens 5' TTATGCTCAATCTCGGGTGGCTG 3' sont utilisés pour amplifier le gène 18S utilisé comme contrôle de chargement. La RT-PCR à partir de la lignée 293RL exprimant le transcrit Rankl de souris nous sert ici de témoin positif.

Enfin, l'analyse des données d'immunohistologie montre que l'expression de Rankl semble concentrée aux zones d'interfaces entre nécrose et cellules en prolifération (Figure 42 ci-contre). Knowles et al, ont récemment montré dans un modèle de tumeur osseuse primitive (sarcome d'Ewing et ostéosarcome) une expression de la caspase 3 et du facteur HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor α) dans ces zones d'interface²⁸³. Autrement dit, ces cellules exprimant fortement Rankl dans le microenvironnement tumoral de l'ostéosarcome pourraient correspondre à des cellules en hypoxie. C'est le cas notamment dans le cartilage où seuls les

chondrocytes hypoxiques expriment RANKL. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'expression de Rankl par RT-PCR sur des cultures de cellules POS-1 en présence d'agents chélateurs d'oxygène telle que la desferoxamine (DFO) ou le chlorure de cobalt (Cl_2Co) (Figure 43). La présence de DFO dans le milieu de culture induit l'expression du facteur hypoxique HIF-1 α (Figure 43A) et de *Rankl* (Figure 43B) de manière dépendante de la dose. En ce qui concerne le Cl_2Co , *Rankl* est détecté pour toutes les concentrations malgré une induction dose dépendante d'HIF1 α . Le regroupement de cellules positives pour l'expression de Rankl dans les zones d'interface entre nécrose et tumeur en prolifération, ainsi que les données obtenues par induction artificielle d'un environnement pauvre en oxygène suggèrent que ces cellules positives pourraient être des cellules en hypoxie.

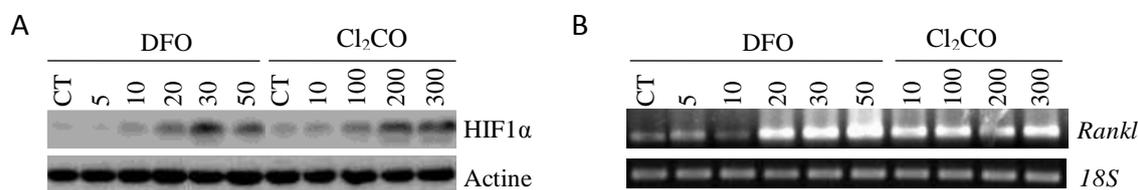


Figure 43 : Induction de l'expression de Rankl dans des conditions mimant l'hypoxie.

La desferoxamine (DFO) ou le chlorure de cobalt (Cl_2Co) sont ajoutés dans le milieu de culture des cellules POS-1 (les concentrations sont exprimées en nM). Après 48h, les protéines totales sont extraites par un tampon de lyse (Chlorure de sodium 150mM, Tris 50mM pH 7,4 (Merck, Damstadt, Allemagne), Nonidet P-40 1%, Sodium désoxycholate 0,25%, Sodium fluoride 1mM, Glycérol 10% (Sigma), PIC (Protease Inhibitor Cocktail) 4% (Roche, Penzberg, Allemagne)) et l'expression du facteur hypoxique HIF1 α est analysée par western blot sur 20 μg de protéines (Anticorps Santa Cruz dilué au 1/1000) (A). (B) L'expression de Rankl est analysée par PCR semi-quantitative sur 2 μg d'ARN rétro-transcrit (voir Figure 41).

Ces résultats préliminaires doivent désormais être confirmés sur un nombre plus important d'échantillon et dans des conditions de transfection de siRNAs ciblant *Rankl* *in vitro* et *in vivo*. Les mêmes investigations devront également être mises en place dans le modèle OSRGA.

3.2. Ciblage des lipoplexes et peptides RDG

L'ensemble de ces études préliminaires montre que les cellules d'ostéosarcome utilisées dans nos investigations représentent une source non négligeable de Rankl dans le microenvironnement tumoral. Ainsi l'adressage des

lipoplexes transportant les siRNAs anti-*Rankl* pourrait cibler les cellules tumorales elles-mêmes. Les tumeurs d'ostéosarcome n'expriment pas de ligand spécifique mais les sarcomes de souris présentent une certaine affinité pour les peptides RGD (séquence Arg-Gly-Asp) dont la séquence peut notamment être reconnue par les intégrines $\alpha v\beta 3$. Cette intégrine est exprimée essentiellement dans les néovaisseaux (angiogenèse embryonnaire, tumorale et inflammatoire) mais peu dans les vaisseaux quiescents. Elle est aussi présente dans les leucocytes, les macrophages, les ostéoclastes et dans certaines tumeurs malignes. Son expression a ainsi été mise en évidence dans un modèle d'ostéosarcome humain inductible chez la souris nude : SaOS2 ²⁸⁴.

Les peptides RGD marqués sont également utilisés pour l'imagerie des tumeurs y compris des métastases osseuses ²⁸⁵⁻²⁸⁷. Concernant l'ostéosarcome, les travaux d'Aurélié Dutour réalisés dans le modèle de rat OSRGA ont récemment permis de développer une méthode d'imagerie pour la visualisation des marges de résection lors de l'exérèse de la tumeur en utilisant des peptides RGD couplés à une molécule fluorescente dans l'infrarouge ²⁸⁸. Le marquage de ces peptides avec des radioisotopes permet également leur détection par des techniques d'imagerie nucléaire : PET et SPECT offrant une forte résolution d'image. La pharmacocinétique de lipides cationiques et de liposomes a ainsi pu être suivie chez l'animal par ces techniques d'imagerie ^{289,290} y compris dans un contexte tumoral ²⁹¹.

Autrement dit, l'utilisation de peptides RGD radiomarqués permettrait (1) d'améliorer le ciblage des cellules d'ostéosarcome chez l'animal en vue d'une injection systémique et (2) d'étudier la biodistribution et la pharmacocinétique des lipoplexes par des techniques d'imagerie nucléaire (PET et SPECT).

4. DISCUSSION

Cette étude d'administration de siRNAs ciblant l'expression de Rankl dans deux modèles d'ostéosarcome développés chez la souris a permis de valider l'utilisation des siRNAs en tant que vecteurs thérapeutiques mais également d'apporter une nouvelle justification de l'inhibition de RANKL comme une stratégie de thérapie.

En effet, le tissu osseux est un tissu dynamique de par les phases de résorption et d'apposition. Le cercle vicieux qui s'établit entre cette résorption osseuse et la croissance tumorale est un facteur favorisant la cancérogenèse (voir paragraphe 3.4 de l'introduction bibliographique). En effet, chez les patients atteints d'ostéosarcome, une suractivation des ostéoclastes est un facteur de mauvais pronostic ²⁹². C'est pourquoi, le laboratoire de Physiopathologie de résorption osseuse propose désormais de bloquer la résorption osseuse à des fins thérapeutiques ²⁹³.

Les bisphosphonates constituent la classe d'agents anti-résorption la plus efficace et la plus utilisée dans le traitement des hypercalcémies associées aux pathologies osseuses métaboliques ou aux ostéolyses tumorales ¹³¹. Ces molécules chimiques de par leurs groupements phosphate montrent une plus forte affinité pour l'os que pour les autres tissus. Cependant, leur champ d'action n'est pas limité qu'aux ostéoclastes. En effet, les bisphosphonates de 3^{ème} génération tel que l'acide zolédronique inhibent la FPP synthase, enzyme hautement conservée et ubiquitaire. C'est pourquoi les bisphosphonates peuvent potentiellement affecter n'importe quel type cellulaire *in vitro* et *in vivo* ²⁹⁴.

RANKL représente la cytokine pro-résorptive par excellence et son expression est fortement augmentée dans un contexte tumoral en site osseux. Un nombre croissant d'études montrent que l'inhibition de son expression par des récepteurs solubles (OPG ou RANK-Fc), par des anticorps (Denosumab®) ou par des siRNAs comme c'est le cas dans notre étude, est associée à un ralentissement significatif de la progression tumorale dans des tumeurs osseuses primaires et secondaires ²⁹⁵.

D'après les études menées au laboratoire, cet effet thérapeutique s'observe dans le cas des tumeurs ostéolytiques (modèle POS-1 d'ostéosarcome) mais également dans des modèles ostéogéniques (modèle OSRGA) où les marqueurs de

la résorption osseuse sont également augmentés ²⁹⁶ comme en témoignent les analyses par ELISA des serum de souris développant une tumeur OSRGA (Figure 2 du manuscrit Rousseau et *al.* en cours d'écriture). De plus, l'utilisation de bisphosphonates s'avère être également efficace dans des modèles où le remodelage osseux est en faveur de la formation d'ostéoïde tumoral ^{297,298} indiquant ainsi l'implication de l'activité ostéoclastique quelque soit la caractéristique de la tumeur.

4.1. Les inhibiteurs de RANKL

Les récepteurs solubles de RANKL tels que l'OPG-Fc (injectée sous forme de protéine recombinante) ayant donné des résultats précliniques prometteurs et montré un effet significatif sur l'inhibition de la résorption osseuse chez des femmes atteintes d'ostéoporose ²⁹⁹, ils ont rapidement été proposés pour le traitement des tumeurs osseuses. Ainsi des patients présentant un myélome multiple ou un carcinome mammaire dont les lésions ostéolytiques étaient confirmées par radiographie ont reçu des injections d'OPG-Fc (AMGN-0007) ³⁰⁰. Ces résultats ont conduit de nombreuses équipes à identifier l'implication de la triade OPG/RANK/RANKL dans le développement de désordres osseux associés à des lésions ostéolytiques tels que l'ostéoporose, le myélome multiple, les métastases osseuses issues du cancer du sein ou de la prostate, des douleurs osseuses associées à la présence de métastases, l'ostéosarcome, la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrite psoriasique, l'ostéolyse expansive familiale, la maladie de Paget, les tumeurs à cellules géantes et la perte osseuse périprothétique ^{301,302}.

Cependant, cet essai clinique fut interrompu. En effet, l'injection d'une protéine recombinante à forte dose peut entraîner la production d'anticorps par le système immunitaire neutralisant ainsi l'OPG-Fc et l'OPG endogène (ce phénomène fut observé chez une patiente ayant reçu de l'OPG-Fc). Une autre limite à l'utilisation de l'OPG-Fc dans un contexte tumoral est son affinité pour la cytokine proapoptotique TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand), l'interaction de ces deux protéines a notamment pu être démontrée *in vitro* ³⁰³. Cette possible fixation à TRAIL peut ainsi interférer avec un processus naturel mis en place contre la cancérogenèse par induction de l'apoptose des cellules tumorales ³⁰⁴.

Depuis, un anticorps humanisé spécifique de RANKL (le denosumab®, AMG 162 ; Amgen) a été développé. Il s'est avéré être plus efficace à des doses plus faibles pour inhiber la résorption osseuse et moins dangereux car non immunogène et incapable de se fixer à TRAIL ³⁰⁵. Le denosumab® a été généré chez la souris immunisée avec la protéine humaine RANKL totale (RANKL 1) produisant ainsi des IgG2 dirigées contre un épitope présentant un acide aminé de différence avec la protéine de souris. Cette différence d'épitope rend l'anticorps inutilisable dans les modèles précliniques induits chez le rongeur, c'est pourquoi le développement préclinique de cet anticorps n'a pu être réalisé que chez le singe ³⁰⁶. La forte affinité que présente le denosumab® pour RANKL a permis de mettre en place plusieurs essais cliniques sur l'ostéoporose mais aussi chez des patients présentant des lésions ostéolytiques d'origine tumorale (pour revue : Schwarz et Ritchlin, 2007, ³⁰⁷).

De plus, malgré leurs effets thérapeutiques, l'utilisation des bisphosphonates présente un certain nombre de limites. En effet, ils sont associés à une certaine toxicité au niveau des reins et sont pas conséquent contre-indiqués chez des patients présentant une insuffisance rénale ³⁰⁸. De plus, l'administration répétée par voie intraveineuse de bisphosphonates a montré chez quelques rares patients une ostéonécrose de la mâchoire notamment chez des patients traités pour des métastases osseuses ³⁰⁹. Au niveau clinique, l'utilisation du Denosumab® s'avère être plus simple et moins risquée car ne nécessite qu'une simple injection en sous cutanée tous les 6 mois alors que les injections de bisphosphonates se font le plus souvent par voie veineuse et plus fréquemment.

En ciblant RANKL, le denosumab® permet un ciblage thérapeutique moins large que les bisphosphonates qui ont tendance à s'accumuler dans le tissu osseux mais pénètrent dans toutes les cellules sans exception. D'après les premières études, il serait relativement mieux toléré. Cependant, nous possédons moins de recul sur l'utilisation clinique de cet anticorps que les bisphosphonates et des effets néfastes tels que des ostéonécroses de la mâchoire pourraient également être décrits dans les prochaines années témoignant d'un effet général de l'inactivation de l'ostéoclastogénèse quelque soit la molécule utilisée.

Les inhibiteurs de RANKL offrent donc de nouvelles perspectives de thérapie dans le traitement des ostéolyses para-tumorales. De plus, dans notre étude nous avons également montré que les siRNAs pouvaient représenter une nouvelle classe d'inhibiteurs de RANKL. Ces molécules possèdent une forte affinité ARN-ARN pour le transcrit ciblé, affinité qui est comparable aux interactions protéine-protéine des

récepteurs solubles et des anticorps avec la cytokine RANKL, mais qui ont l'avantage d'empêcher la synthèse même de la protéine. Leur coût de production est relativement faible par rapport aux protéines recombinantes et au Denosumab®. De plus, les vecteurs de transfert de gène utilisés pour l'administration de siRNAs *in vivo* permettent un adressage des molécules aux cellules cibles. L'inhibition localisée de la résorption osseuse qui en résulte permettrait d'éviter les phénomènes néfastes tels que l'ostéonécrose de la mâchoire. Cependant, l'optimisation de cet adressage reste à développer. Ainsi de nombreuses étapes restent à optimiser et à évaluer avant d'envisager une utilisation des siRNAs dans une étude clinique chez l'Homme. Une de ces étapes consiste notamment à dessiner des séquences de siRNAs ciblant le transcrite codant la protéine humaine et évaluer son efficacité *in vivo*. En effet, le *Rkl*-siRNA dessiné pour inhiber l'expression des transcrits murins ne présentent qu'une homologie de séquence partielle avec le transcrite *RANKL* humain. L'utilisation de modèle d'ostéosarcome induit chez la souris immunodéficiente à partir des lignées d'ostéosarcome humaines U2OS³¹⁰, SaOS2 (annexe 1, Perrot et al, 2010) et Hu09³¹¹ permettrait de valider la séquence de siRNA en question.

4.2. Les thérapies combinées

Le traitement actuel de l'ostéosarcome repose sur une exérèse de la tumeur associée à une polychimiothérapie pré et post-opératoire. Ce protocole a ainsi permis d'augmenter drastiquement le taux de survie des patients jusqu'à 70%. C'est pourquoi, malgré le développement des approches anti-résorption osseuse, l'utilisation des molécules de chimiothérapie ne peut être abolie, notamment en ce qui concerne la prévention du développement de métastases en tissus mous. L'essai clinique visant à tester l'effet de l'acide zolédronique associe donc l'agent anti-résorption à la chimiothérapie (protocole OS2006). En effet, dans le cadre du développement tumoral en site osseux caractérisé par la mise en place d'un cercle vicieux, le ciblage du microenvironnement osseux par l'inhibition de l'activité des ostéoclastes permettrait de réduire la croissance tumorale et de favoriser ainsi les effets anti-tumoraux des molécules ciblant la tumeur elle-même²⁹⁵. Les protocoles précliniques évalués dans les modèles murins d'ostéosarcome permettent le plus souvent de ralentir le développement tumoral mais ne sont pas toujours associés à une rémission complète de la tumeur. Dans notre étude cette observation s'est

avérée vraie puisque les siRNAs seuls bien qu'inhibant l'expression de Rankl et prévenant ainsi les lésions ostéolytiques n'étaient pas suffisants pour contrecarrer le développement de l'ostéosarcome.

L'association d'une molécule anti-résorptive à des agents de chimiothérapie peut être élargie également aux inhibiteurs de RANKL puisque des études, y compris la notre, associent l'inhibition de RANKL à des agents chimiques anti-tumoraux. Ainsi, dans un modèle de métastases osseuses humaines, l'administration d'OPG-Fc améliore les effets anti-tumoraux du panitumab, un anticorps ciblant spécifiquement l'EGFR (Epidermal growth factor receptor, régulant la croissance et la mort cellulaire)³¹². L'OPG-Fc administrée chez la souris dans un modèle de métastases osseuses issues du cancer de la prostate permet également de sensibiliser les cellules tumorales à l'action du docetaxel, molécule de chimiothérapie utilisée dans le traitement du cancer de la prostate qui induit un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules tumorales³¹³. Dans cette optique, les siRNAs apportent de nouvelles opportunités de développement de bithérapie par association de plusieurs molécules de siRNAs ciblant plusieurs transcrits distincts au sein d'un même lipoplexe. Dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde, l'administration de 3 siRNAs ciblant 3 cytokines inflammatoires distinctes, complexés au sein d'un même liposome RPR209120/DOPE améliore significativement le tableau clinique³¹⁴. Ce type de stratégie pourrait être testé dans un contexte d'ostéosarcome par association de siRNAs pour une action anti-résorptive mais aussi pour une action anti-tumorale par ciblage de l'expression de molécules impliquées dans le cycle cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse ou encore la dissémination métastatique.

CHAPITRE 3 : Identification et clonage de séquences « shRNA » spécifiques d'un transcrit muté dans un modèle d'ostéogenèse imparfaite

1. INTRODUCTION

Les molécules anti-résorption osseuse telles que les bisphosphonates sont également utilisées pour pallier une partie des désordres osseux liés à l'ostéogenèse imparfaite, pathologie caractérisée par une fragilité osseuse excessive. En effet, dans cette pathologie, l'inhibition de l'ostéoclastogenèse permet de diminuer l'incidence des fractures. De la même manière que pour l'ostéosarcome, la molécule RANK-Fc a été utilisée dans un modèle de souris présentant une ostéogenèse imparfaite et a montré une augmentation de la densité osseuse et une résistance accrue de l'os à un stress mécanique ³¹⁵. Au regard de ces résultats, les siRNAs ciblant l'expression de *Rankl* validés dans le chapitre précédent pourraient représenter une nouvelle stratégie de thérapie de l'ostéogenèse imparfaite. Cependant cette maladie est une maladie génétique caractérisée par la présence de mutations dominantes négatives dans un des gènes codant les chaînes du collagène de type I conduisant à un défaut quantitatif et/ou qualitatif de la molécule de collagène. Autrement dit, contrairement à l'ostéosarcome, il s'agit d'une pathologie chronique pour laquelle l'administration de molécules anti-résorption serait nécessaire tout au long de la vie des patients, impliquant des effets à long terme de ces molécules qui sont encore mal connus. Ces stratégies ne sont donc considérées que comme des traitements palliatifs visant à améliorer les conditions de vie mais aucune ne cible la cause génétique de la pathologie. C'est pourquoi des stratégies innovantes visant à rétablir un phénotype « quasi-normal » sont activement développées dans des modèles murins d'ostéogenèse imparfaite.

1.1. Le collagène de type I

Le collagène de type I appartient à la famille des collagènes fibrillaires. Cette famille est caractérisée par le fait que chaque molécule forme une longue triple hélice ininterrompue et que, dans l'espace extracellulaire, les molécules homologues s'organisent en fibrilles, qui sont formées de molécules parallèles les unes aux autres et régulièrement espacées. Une des propriétés essentielles de ces fibrilles est leur résistance extrêmement importante à la tension. Le collagène de type I est le type de collagène le plus abondant, que l'on retrouve dans le tissu osseux mais aussi dans

la peau et les tendons. Sa triple hélice hétérodimérique est constituée de deux chaînes $\alpha 1$ codées par le gène *COL1A1* et d'une chaîne $\alpha 2$ codée par le gène *COL1A2*.

Une fois synthétisée, chaque chaîne polypeptidique va subir des hydroxylations et des glycosylations, alors que les propeptides C-terminaux de deux chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$ s'associent et que la triple hélice se forme comme on fermerait une fermeture éclair. Les molécules de collagène I s'associent alors à une molécule chaperone spécifique, Hsp47³¹⁶, au sein du réticulum endoplasmique, qui stabilise les triples hélices. Les molécules de collagène I sont ensuite transportées dans des vésicules de Golgi et secrétées dans l'espace extracellulaire sous forme de procollagène. Les propeptides N et C terminaux sont rapidement clivés par des protéases spécifiques et les molécules de collagène matures s'assemblent pour former des fibrilles. A ces fibrilles de collagène I vont s'associer des fibrilles de collagène V qui participent à la régulation de la taille des fibrilles de collagène de type I, ainsi que des molécules de collagène XII et XIV. Les fibrilles de collagène de type I peuvent elles-mêmes s'assembler pour former des fibres composées de fibrilles parallèles les unes aux autres, comme dans les tendons, ou former des réseaux complexes de fibrilles enchevêtrées, comme dans la peau. Dans le tissu osseux, le réseau s'assemble au contact de protéoglycanes, ce qui crée un environnement favorable à la formation de cristaux d'hydroxyapatite qui constituent l'os.

Bien que présent dans la quasi-totalité des organes, le collagène de type I n'est synthétisé que par un nombre limité de cellules, principalement les fibroblastes, les ostéoblastes et les odontoblastes. Ce contrôle d'expression spécifique d'un tissu s'expliquerait par la présence d'éléments activateurs et répresseurs de la transcription des gènes du collagène de type I au sein de ces 3 types cellulaires et par une conformation de la chromatine propice à l'activation de leur transcription. Des éléments de régulation de l'expression basale du collagène de type I ont également été identifiés dans le premier intron³¹⁷. Enfin, comme pour un certain nombre d'autres gènes, la méthylation de ces zones de régulation de la transcription des gènes *COL1A1* et *COL1A2* entraîne la répression de leur expression³¹⁸. A cette régulation spécifique d'un tissu s'ajoute une régulation temporelle de l'expression des chaînes de collagène de type I. En effet, après la naissance, la synthèse de collagène diminue. Il semble même que le renouvellement des fibrilles soit extrêmement lent chez l'adulte. C'est pourquoi les gènes codant le collagène

exon 23 WT

1626 GGT CCT TCC GGT GAA CGT GGT GCT CCC GGA CCT GCT GGT CCC AAA GGT
G P S G E R G A P G P A G P K G

TCT CCT GGT GAA GCT **GGT** **CGC** CCC GGT GAA GCT GGT **CTC** CCT GGT G

1675 S P G E A **G** R P G E A G **L** P G

exon 23 Mut

1626 GGT CCT TCC GGT GAA CGT GGT GCT CCC GGA CCT GCT GGT CCC AAA GGT
G P S G E R G A P G P A G P K G

TCT CCT GGT GAA GCT **TGT** **CGT** CCC GGT GAA GCT GGT **ATG** CCT GGT G

1675 S P G E A **C** R P G E A G **M** P G

Figure 44 : Comparaison de séquences de l'exon 23 Wild Type (WT) et Muté (Mut). Substitution d'une guanine en thymine provoquant le changement d'une glycine en cystéine (en rouge). Substitution d'une cytosine en thymine provoquant une mutation silencieuse (en orange). Substitution d'une cytosine en adénine et d'une cytosine en guanine provoquant le changement d'une leucine en méthionine (en vert).

de type I sont hautement régulés par des cytokines circulantes profibrosantes comme le TGF β ou proinflammatoires tel que le TNFa^{319,320}.

Toute dérégulation par mutation des gènes du collagène de type I ou une mauvaise régulation de leur expression conduit à une accumulation ou à un défaut quantitatif voir qualitatif de matrice extracellulaire et est associée à l'apparition de pathologies³²¹⁻³²³. Les modèles animaux mimant l'ostéogenèse imparfaite visent donc à reproduire les divers phénotypes retrouvés chez l'Homme par des modèles knock-out ou par insertion de mutations caractéristiques au sein d'un des deux allèles codant les chaînes alpha du collagène de type I.

1.2. Le modèle BrtIV

Le modèle de souris BrtIV, décrit par Forlino et al en 1999, est le premier modèle de knock-in non létal présentant des mutations au sein d'un des deux allèles *Col1a1* codant la chaîne $\alpha 1$ de la triple hélice du collagène de type I. Il a été initialement induit par recombinaison homologue grâce à un système cre/lox permettant d'introduire un codon STOP dans l'exon 22 et 4 mutations ponctuelles au sein de l'exon 23 de *Col1a1*³²⁴ (Figure 44 ci-contre) :

- La substitution d'une guanine par une thymine au sein de la séquence génomique entraîne la substitution de la glycine 349 par une cystéine au niveau de la chaîne protéique
- La substitution d'une cytosine en thymine est une mutation silencieuse permettant d'introduire un site de clivage pour un ribozyme
- Enfin, le remplacement d'une cytosine par une adénine et d'une seconde cytosine par une guanine permettent la substitution de la leucine 356 par une méthionine.

La substitution de la glycine 349 par une cystéine modifie le repliement de la chaîne $\alpha 1$. En effet, des glycines sont présentes tous les 3 acides aminés dans la structure de la protéine sauvage et sont codées par le même triplet d'acides nucléiques : GGT. Cet acide aminé est particulièrement important dans la conformation de la structure secondaire de la protéine. C'est pourquoi chez les patients atteints d'ostéogenèse imparfaite, les mutations impliquant la substitution d'une glycine sont très fréquem-

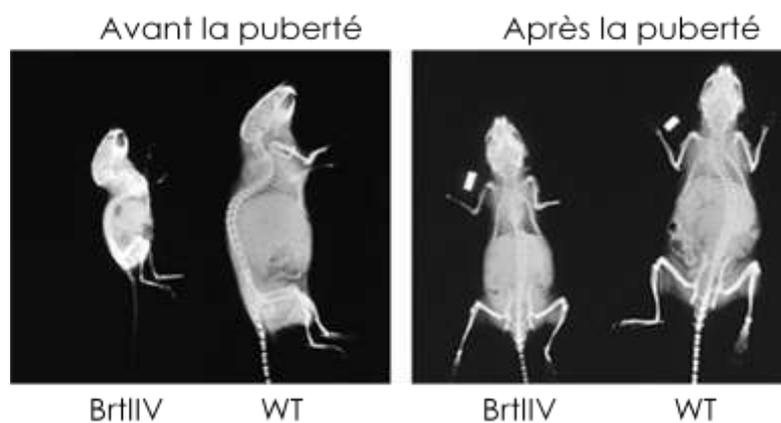


Figure 45 : Comparaison par analyse radiographique de souris sauvages (WT) et du modèle d'ostéogenèse imparfaite BrtlIV en croissance et à l'âge adulte. Les clichés montrent la taille réduite de la souris viable BrtlIV en période pubertaire, cette différence de taille étant moindre à l'âge adulte. On note également la perte de minéralisation osseuse globale et des déformations de la cage thoracique et de la région pelvienne par rapport à la souris sauvage (WT).

-ment retrouvées.

En plus de la structure secondaire, la structure tertiaire de la triple hélice de collagène de type I formée par l'association de 2 chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$ est également perturbée par l'incorporation d'une chaîne mutée. Des études de structure de cette molécule de collagène après incorporation de la chaîne $\alpha 1$ mutée ont montré la présence de $25\pm 5\%$ de chaînes $\alpha 1$ mutées dans différents tissus et extraits de matrice extracellulaire chez les souris BrtlIV. En effet, les chaînes mutées seraient incorporées de manière équivalente et avec la même affinité que les chaînes sauvages dans la matrice collagénique ³²⁵.

En terme de phénotype, la mutation peut être létale pour certains individus ou permettre une survie jusqu'à un âge de reproduction et de transmission de la copie mutée. La modulation de la sévérité du phénotype s'explique par des différences d'expression d'autres protéines. Ainsi, chez les souris BrtlIV, l'expression d'une protéine relative au stress (*Gadd153*) est augmentée chez tous les souriceaux non viables alors que chez les animaux viables une surexpression de la protéine chaperonne αB est observée ³²⁶. Ces souris BrtlIV hétérozygotes pour le gène *Colla1* présentent des déformations osseuses visibles au niveau de la cage thoracique et des membres qui sont également plus fins que ceux d'une souris homozygote issue de la même portée. Une déformation trop importante de la cage thoracique peut expliquer le caractère létal de la mutation chez certains individus souffrant d'une insuffisance respiratoire. La variation de sévérité des désordres osseux peut également s'expliquer par la modulation du taux d'expression de certaines protéines comme les protéines cartilagineuses Prelp (proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein), *Bmp6* et *Bmp7* ³²⁶. En ce qui concerne les souriceaux viables, leur croissance est ralentie à partir de la 4^{ème} semaine après la naissance, ce qui a pour conséquence de diviser par deux leur taille par rapport à des souris consanguines normales à 6 semaines ³²⁷. Cette cinétique de ralentissement de croissance est semblable à celle observée chez les patients atteints d'une ostéogenèse imparfaite de sévérité modérée. Pour les individus atteignant l'âge adulte, aucune déformation significative des os longs n'est constatée ³²⁸, ce qui est en accord avec les observations cliniques des patients atteints d'une ostéogenèse imparfaite de sévérité modérée pour lesquels la fréquence des fractures diminue après la puberté (Figure 45 ci-contre).

Ces souris présentant un phénotype mimant celui observé chez des patients atteints d'une ostéogenèse imparfaite de type IV ont donc été baptisées Brittle (fragile) IV (BrtlIV) en référence à la classification des ostéogenèses imparfaites chez l'Homme (voir paragraphe 4.1 de l'introduction bibliographique).

1.3. Stratégies innovantes développées pour le traitement de l'ostéogenèse imparfaite

Plusieurs stratégies innovantes ont été proposées afin de rétablir un phénotype normal par expression de la protéine fonctionnelle de collagène (voir paragraphe 4.5.2 de l'introduction bibliographique). La première consiste à apporter une copie fonctionnelle du gène déficient par allogreffe de cellules souches mésenchymateuses ou par thérapie génique à l'aide d'une cassette génomique de type ADN codant la protéine sauvage. Ainsi dans des modèles de souris présentant un défaut quantitatif de la chaîne $\alpha 1$ ou $\alpha 2$, l'introduction du gène en question permet de rétablir une conformation normale et fonctionnelle de la molécule de collagène ^{329,330}.

Cependant, l'apport d'un gène fonctionnel ne suffit pas à contrecarrer l'expression de la protéine mutée et les effets délétères qui en découlent. En effet, dans le cas où l'ostéogenèse imparfaite est associée à un défaut non pas quantitatif mais qualitatif du collagène de type I, l'apport d'un gène fonctionnel sans inhibition de l'expression de l'allèle muté reste inefficace ³³¹. Aussi, la suppression de l'expression des gènes mutés a été évaluée en utilisant des oligonucléotides antisens. Cependant la nature répétitive du transcrite codant les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ est un frein au développement d'antisens assez spécifiques et efficaces pour un essai thérapeutique ¹⁹¹. De plus, l'utilisation de ce type d'oligonucléotides présente un risque non négligeable d'induction de réponse IFN (voir paragraphe 1.3.1 de l'introduction bibliographique).

C'est pourquoi des molécules plus spécifiques telles que les ribozymes induisant la dégradation d'un messenger grâce à une séquence complémentaire au transcrite ont été testées. L'utilisation de vecteurs AAV (adeno-associated virus) portant une telle séquence s'est avérée efficace pour inhiber spécifiquement l'expression du gène

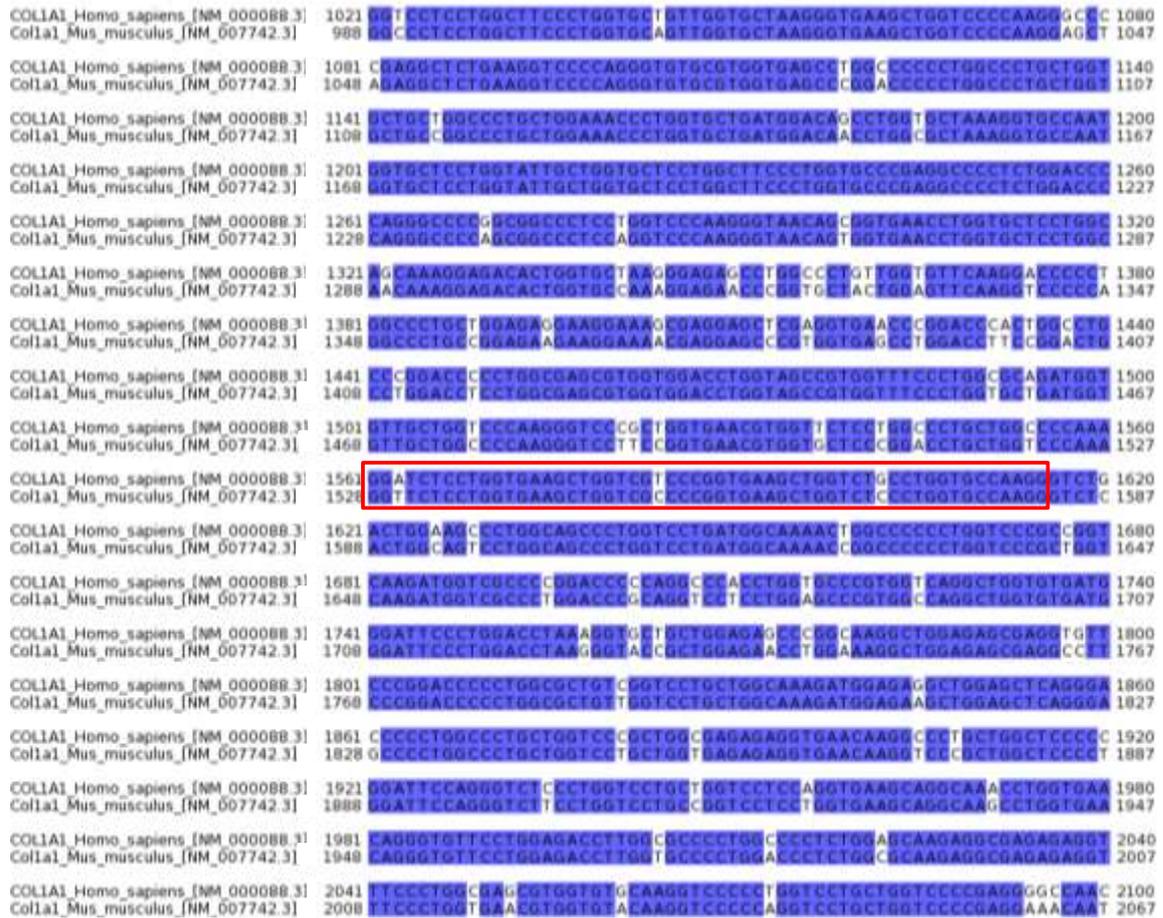


Figure 46 : Alignement d'une partie des séquences des transcrits codant Col1a1 chez la souris (*Mus musculus*) et chez l'Homme (*Homo sapiens*). Les séquences sauvages issues de la base de données NCBI sont alignées grâce au logiciel Jalview à partir de l'ATG et sur toute la longueur de l'ORF. Etant donnée la longueur des transcrits (environ 5000 bases), seule une partie de cet alignement correspondant à la séquence d'intérêt du modèle Br11V (carré rouge) est montré. Les carrés bleus montrent les régions conservées chez les 2 espèces. NB : la numérotation indiquée n'est pas représentative de la numérotation du transcrit puisqu'ici l'alignement ne prend pas en compte la région 5'UTR.

*COL1A1*³³² ou *COL1A2* muté³³³. Cependant les ribozymes sont des molécules peu stables et peu développées dans les essais cliniques.

Les molécules d'ARN interférence ont donc rapidement été proposées pour inhiber de manière spécifique l'expression du transcrit muté. Cependant, les mutations qui engendrent un phénotype d'ostéogenèse imparfaite sont le plus souvent des mutations ponctuelles. Ainsi, la séquence de siRNA sera parfaitement complémentaire à l'allèle muté mais présentera un seul nucléotide de différence avec la séquence sauvage. La difficulté de cette stratégie repose donc sur le dessin des séquences de siRNA afin d'inhiber spécifiquement l'expression de la chaîne mutée tout en préservant celle de la chaîne sauvage.

1.4. Développement d'une stratégie basée sur l'utilisation de molécules d'ARNi

1.4.1. Le gène *Colla1*

Le gène *COL1A1* codant la chaîne $\alpha 1$ se situe sur le chromosome 17 chez l'Homme (NC_000017.10, référence NCBI) et 11 chez la souris (NC_000077.5). *COL1A1* code un transcrit de 5927 bases (NM_000088.3) générant une protéine de 1464 acides aminés (NP_000079.2). Chez la souris, l'ARNm de *Colla1* est un transcrit de 4709 bases (NM_007742.3), présentant 89% d'identité avec le transcrit humain (Figure 46 ci-contre), la protéine qui en résulte est une chaîne de 1453 acides aminés (NP_031768.2).

Chez l'Homme comme chez la souris, ces gènes codant les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ possèdent une structure très semblable, qui est également très proche de la structure des autres gènes codant des collagènes fibrillaires (Figure 47).

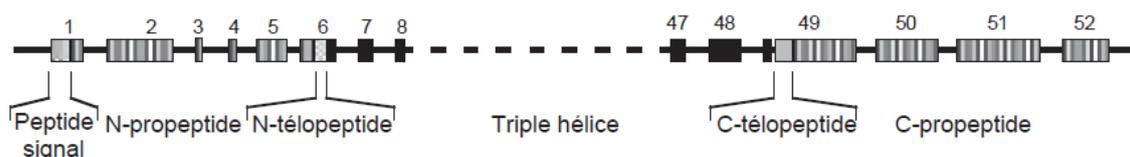


Figure 47 : Structure des gènes codant les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I. Issu de la publication de Rossert,³³⁴.

1.4.2. Développement de séquences siRNAs spécifiques du transcrit *Col1a1* muté chez la souris *BrtlIV*

Le but de ce travail a donc été de déterminer s'il est possible de diminuer de manière spécifique et significative l'expression d'un transcrit ayant une mutation ponctuelle par une séquence siRNA identique tout en préservant l'expression du transcrit sauvage présentant une différence d'une seule base azotée avec la séquence siRNA.

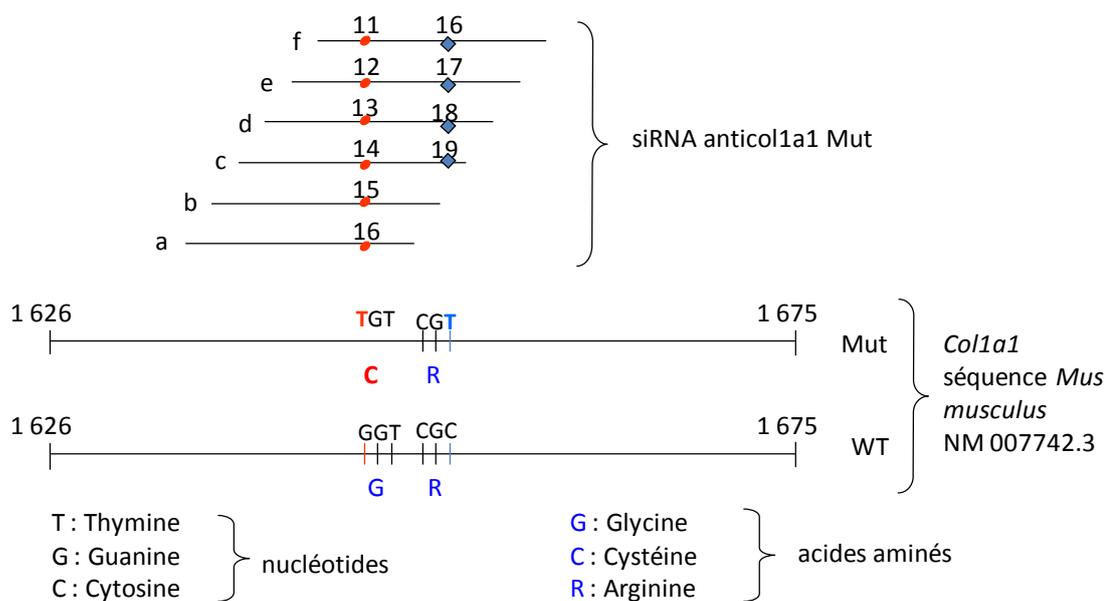
Millington-Ward et al ont proposé une étude de faisabilité d'une telle stratégie en testant 3 séquences de siRNA ciblant le transcrit muté de *COL1A1* dans des cellules souches mésenchymateuses de patients. Malgré une inhibition de la synthèse de collagène pouvant atteindre 85%, aucune de ces séquences ne s'est révélée complètement spécifique de l'allèle muté³³⁵. Pourtant l'utilisation de siRNAs dans des pathologies dominantes négatives a pu être validée^{40,336-340} notamment pour discriminer deux transcrits différant seulement par un seul nucléotide dans plusieurs études. C'est le cas dans un modèle d'ostéopétrose autosomale dominante où le transcrit *CIC7* muté est inhibé par une séquence siRNA allèle-spécifique³⁴¹, mais également par l'utilisation d'une séquence shRNA discriminante vis-à-vis du transcrit sauvage et efficace pour inhiber l'expression de l'allèle *SOD1* muté dans un modèle de sclérose³⁴².

L'ensemble des résultats obtenus dans ces études montrent que le ciblage d'une mutation ponctuelle par des molécules d'ARN interférence est possible mais nécessite de tester un certain nombre de séquences. En effet, dans ce même modèle de sclérose induite par la mutation du gène *SOD1*, Schwarz et al ont proposé de tester 19 séquences de siRNA de manière à identifier la position de la mutation pour laquelle le siRNA semble être le plus efficace pour inhiber le transcrit muté et le plus discriminant vis à vis de la séquence sauvage. Leur étude a permis de montrer que, dans ce modèle, la position et la nature de la mutation influence l'efficacité et la spécificité des siRNAs. En effet, un maximum de discrimination entre les deux transcrits est possible lorsque la position de la mutation se situe dans la région centrale ou à l'extrémité 3' du brin antisens du siRNA. Ainsi, les positions 5, 9, 10, 13, 14, 15 et 16 permettent une inhibition significative du transcrit muté et dans une moindre mesure les positions 12 et 19. Cependant, seules les positions 12 et 16 permettent un clivage de *SOD1* muté 24h après transfection des siRNAs. Ainsi, à

l'issue de cette étude sur les transcrits *SOD1*, une position de la mutation dans la zone centrale de la séquence du siRNA augmente la spécificité de la molécule avec une prédominance pour les positions 12 et 16 qui permettent le clivage de l'ARNm ciblé

343.

Dans notre modèle d'étude, nous avons donc choisi de mettre à profit ces résultats pour dessiner et tester plusieurs séquences de siRNA dans le contexte génétique du modèle de souris *BrlIV*. Etant donné que la substitution d'une glycine est la mutation prépondérante chez les patients atteints d'ostéogenèse imparfaite, les séquences siRNAs dessinées visent la mutation Guanine→Thymine dans l'exon 23 de *Col1a1*. Six séquences de siRNA (« a-f ») ont été dessinées en faisant varier la position de la mutation sur le brin antisens de la séquence des siRNAs de la position 11 à la position 16. Il est important de noter la présence d'une seconde mutation silencieuse : Cytosine→Thymine située à proximité qui impose un deuxième nucléotide différent pour les séquences siRNA « c, d, e et f » (Figure 48).



- Mutation nucléotidique ponctuelle provoquant le changement d'une glycine en cystéine
- ◆ Mutation provoquant la substitution d'une cytosine en thymine

Figure 48 : Positionnement des séquences de siRNA ciblant le transcrit *Col1a1* muté chez la souris *BrlIV*.

1.5. Stratégie d'étude

Une étude préliminaire a consisté à identifier la séquence siRNA la plus efficace et spécifique pour éliminer le transcrit muté de l'exon 23 du gène *Col1a1*. Une partie de l'exon 23 sauvage (WT) ou muté (Mut) a été clonée dans la région 3' non codante du gène rapporteur de la luciférase. Une lignée facilement transfectable (lignée embryonnaire humaine HEK 293) a par la suite été modifiée par technologie lentivirale pour exprimer stablement les constructions *LucF-Col1a1WT* ou *Mut*. Les 6 séquences de siRNA ont été alors testées sur les cellules modifiées afin d'identifier une ou plusieurs séquences efficaces pour diminuer l'expression du transcrit *LucF-Mut* et ayant peu d'effet sur l'activité luciférase au sein des cellules HEK-Exon23*Col1a1-Mut*.

A long terme, afin d'améliorer la qualité de la matrice extracellulaire chez les souris atteintes d'ostéogenèse imparfaite, il faudrait apporter une cassette génomique produisant stablement un shRNA spécifique de l'allèle muté au sein de cellules souches mésenchymateuses. En effet, ces cellules sont à l'origine des ostéoblastes et des fibroblastes, source majeure de collagène de type I. Dans cette optique, des séquences ADN ont été dessinées à partir des séquences de siRNA spécifiques du transcrit muté de manière à transcrire les shRNAs correspondants. Ces cassettes de shRNA sous le contrôle d'un promoteur de la polymérase III ont ensuite été clonées dans un vecteur lentiviral de manière à transduire stablement des cellules issues des souris BrtlV.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Culture cellulaire

Milieux, Solutions et Matériels utilisés

- Milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biowhittaker, Verviers, Belgique) à 4.5 g/l de glucose, 2mM L-glutamine
- Sérum de veau foetal (SVF ; Hyclone Perbio, Logan, USA)
- Antibiotiques : Penicilline 100U/ml et Streptomycine 100µg/ml (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France)
- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline sans Ca ni Mg ; Biowhittaker)
- Versene:Trypsine 0.05% / EDTA 0.02% (Biowhittaker)
- Supports plastiques stériles (Corning Costar, Dominique Dutscher, Brumath, France)

La lignée HEK 293 FT (Invitrogen)

Les cellules HEK 293 FT sont utilisées pour la production de particules lentivirales via le ViraPower™ Lentiviral Expression System (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Ce clone de cellules facilement cultivables et transfectables dérive de la lignée HEK 293 (cellules humaines de rein foetal) modifiée pour une expression stable et constitutive de l'antigène T du virus SV40 (virus simien 40 ou virus vacuolant, membre des virus nommés *Polyomavirus* trouvés chez le singe rhésus), ce qui améliore la production de particules virales.

Culture primaire de fibroblastes

Les fibroblastes sont obtenus à partir du modèle de souris BrtlIV atteintes d'ostéogenèse imparfaite de type IV et de souris sauvages de la même souche. Ces cellules nous ont été données par le Dr Forlino (Département de biochimie "A. Castellani", Section Médecine et Pharmacie, Université de Pavia, Pavia, Italie).

Tous les types cellulaires sont cultivés dans un milieu DMEM complétementé avec 10% de SVF et incubés dans une atmosphère à 37°C avec 5% de CO₂.

2.2. Transfection de siRNAs

2.2.1. Dessin des siRNAs ciblant spécifiquement le transcrit *Col1a1* muté

La mutation Guanine → Thymine conduisant à la substitution d'une glycine au sein de la chaîne $\alpha 1$ étant la plus abondante chez les patients atteints d'ostéogenèse imparfaite, nous avons choisi de dessiner des séquences de siRNAs ciblant spécifiquement cette mutation. Ainsi 6 siRNAs ont été choisis et produits par Eurogentec (Angers, France). Leur efficacité a été évaluée en comparaison à 3 siRNAs contrôles : (1) un siRNA n'ayant aucune cible dans les cellules de mammifère et servant ainsi de contrôle négatif pour les cellules humaines et murines (CT-siRNA), (2) un siRNA ciblant la luciférase *firefly* : LucF-siRNA et (3) un siRNA ciblant l'expression du transcrit *Col1a1* sauvage (siRNA-eWT) tous deux utilisés comme contrôles positifs.

siRNAs anti-*Col1a1* muté

siRNA a :

sens 5' UCUCCUGGUGAAGCUUGUCUU
 |||||
 anti-sens 3' UUAGAGGACCACUUCGAACAG

Mutation en position 16

siRNA b :

sens 5' CUCCUGGUGAAGCUUGUCGUU
 |||||
 anti-sens 3' UUGAGGACCACUUCGAACAGC

Mutation en position 15

siRNA c :

sens 5' UCCUGGUGAAGCUUGUCGUUU
 |||||
 anti-sens 3' UUAGGACCACUUCGAACAGCA

Mutation en position 14 et 19

siRNA d :

sens 5' CCUGGUGAAGCUUGUCGUCUU
 |||||
 anti-sens 3' UUGGACCACUUCGAACAGCAG

Mutation en position 13 et 18

siRNA e :

sens 5' CUGGUGAAGCUUGUCGUCCUU
 |||||
 anti-sens 3' UUGACCACUUCGAACAGCAGG

Mutation en position 12 et 17

siRNA f :

sens 5' UGGUGAAGCUUGUCGUCCUU
 |||||
 anti-sens 3' UUACCACUUCGAACAGCAGGG

Mutation en position 11 et 16

siRNAs contrôles :

CT-siRNA
 Sens 5' UUCUC CGAACGUGUCACGUTT
 |||||
 Antisens 3' TTAAGAGGCUUGCACAGUGCA

siRNA-cWT
 Sens 5' CUGGUGAAGCUUGUCGUCCTT
 |||||
 Antisens 3' TTGACCACUUCGAACAGCAGG

LucF-siRNA
 Sens 5' CUUACGCGAGUACUUCGATT
 |||||
 Antisens 3' TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU

2.2.2. Clonage des séquences de l'exon 23 *Colla1* sauvage ou muté

Stratégie :

Des séquences contenant une partie de l'exon 23 de la séquence sauvage ou de la séquence mutée sont clonées dans le pLNT-LucF dans la région 3' non traduite du gène luciférase pour générer les vecteurs lentiviraux pLNT-LucF-*Colla1*WT (séquence sauvage) et pLNT-LucF-*Colla1*Mut (séquence mutée) (Figure 49).

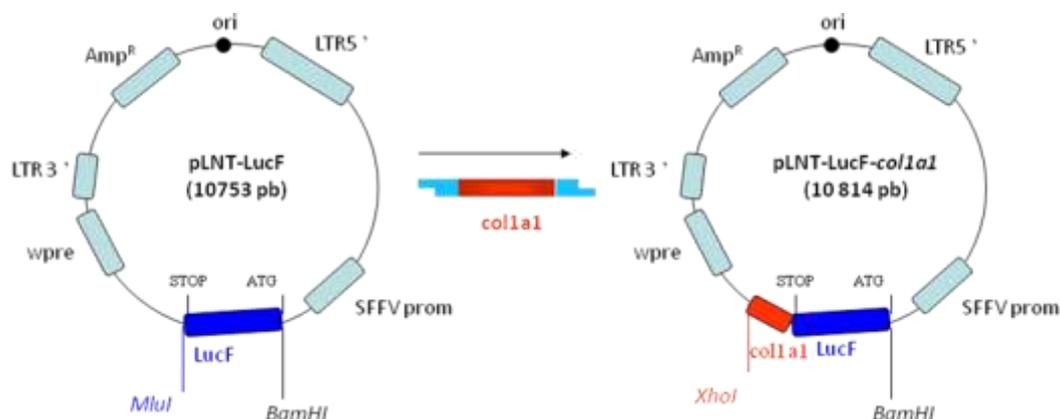


Figure 49 : Stratégie de clonage des séquences codant une partie de l'exon 23 du gène *Colla1* sauvage ou muté dans un vecteur lentiviral : le pLNT-LucF.

Vecteur plasmidique

Le vecteur pLNT/SffvMCS a été optimisé à partir d'un vecteur lentiviral dérivant du HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus type 1³⁴⁴). Le plasmide pLNT-LucF correspond à ce vecteur pLNT/SffvMCS dans lequel le gène codant la luciférase *firefly* a été cloné sous contrôle du promoteur SFFV (voir chapitre 1 des résultats, Rousseau et al, 2010). Il contient des séquences LTR (Long Terminal Repeat) 5' et 3' nécessaires à la production de particules lentivirales entre lesquelles les éléments génomiques seront insérés dans le génome de la cellule hôte. Le LTR 3' contient les

Protocole :

Deux µg du pLNT-LucF dans 50µL sont linéarisés par *MluI* de manière à y insérer un duplex d'oligonucléotides (Sigma) contenant le site *XhoI* (voir séquence des oligonucléotides à cloner) grâce à l'action de la T4 DNA ligase (Invitrogen). Deux µL du produit de ligation sont introduits par choc électrique dans des bactéries *E.Coli* TOP 10 électrocompétentes. Cent µL de la suspension bactérienne sont étalés sur une gélose de LB contenant 100µg/mL d'ampicilline (Sigma) et incubés toute la nuit à 37°C.

Le lendemain, quelques colonies bactériennes sont amplifiées toute la nuit dans 2mL de LB avec ampicilline. L'ADN plasmidique est alors extrait par minipréparation d'ADN sur colonne échangeuse d'ions (Kit *NucleoSpin[®]Plasmid* de Macherey-Nagel, Hoerd, France) puis digéré par *XhoI* afin de vérifier la présence du nouveau site de restriction. Après validation, le plasmide pLNT-LucF-*Col1a1* est purifié et amplifié à l'aide du kit de maxi-préparation d'ADN (Kit *NucleoBond[®]Xtra Midi/Maxi plus* de Macherey-Nagel).

2.2.3. Modification stable de cellules HEK

Vecteurs plasmidiques

Le plasmide pFG12 est un plasmide lentiviral ³⁴⁵ qui porte le gène codant l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) inséré entre les LTR 5' et 3'. Dans notre étude ce plasmide est utilisé pour cloner les cassettes ADN des shRNAs spécifiques du transcrit *Col1a1* muté. L'expression en parallèle de l'EGFP permet de déterminer par cytométrie en flux le pourcentage de cellules ayant effectivement intégré le génome viral et donc la cassette ADN des shRNAs.

Les vecteurs complémentaires pLP1, pLP2 et pLP/VSV-G provenant du kit « ViraPower™ Lentiviral Expression System » (Invitrogen) dérivent du HIV-1. Ils codent des protéines de structure ou de régulation nécessaires à la production des particules lentivirales.

Production des particules lentivirales

La production des particules lentivirales est basée sur l'utilisation du kit du « ViraPower™ Lentiviral Expression System » (Invitrogen) qui permet la synthèse de ces

particules après transfection des HEK 293FT avec un vecteur possédant des séquences LTR. La transfection des cellules s'effectue à l'aide du PEI (Polyéthylène imine, fourni par le Dr B.Pitard, INSERM U915, Nantes) qui est un polymère cationique non lipidique formant des complexes avec l'ADN plasmidique^{346,347}. Le PEI crée une interface entre la membrane plasmique et l'ADN ce qui permet une endocytose de ce complexe qui va pouvoir diffuser jusqu'au noyau.

La suite du protocole s'effectue dans un laboratoire de niveau de sécurité L2 adapté à la manipulation des particules lentivirales faiblement pathogènes (c'est-à-dire défectueuses pour la réplication et pour lesquelles le transgène n'est pas pathogène). La production des particules lentivirales possédant dans leur génome viral le gène codant la luciférase avec dans sa région 3' non traduite les séquences *Colla1* est réalisée en coproduction avec des particules possédant le gène de l'EGFP. Cette coproduction de particules dans des proportions 10 : 1 pour les particules luciférase et EGFP respectivement permet de déterminer par cytométrie en flux le pourcentage de cellules exprimant la protéine fluorescente et d'en déduire la proportion 10 fois plus importante de cellules exprimant la luciférase. Ainsi, 3.10^6 cellules HEK 293 FT ensemencées la veille en boîtes de culture de 10 cm de diamètre sont transfectées par le PEI avec pour chaque boîte 9µg de pLNT-LucF-*Colla1*WT ou Mut, 0,9µg de pFG12 et 3µg de chaque plasmide complémentaire (pLP1, pLP2, pLP/VSV-G). Quarante huit heures après transfection, le surnageant de culture contenant les particules lentivirales est récupéré puis concentré 60 fois par ultrafiltration (Tubes Amicon Ultra PL-100, Millipore, Grande-Bretagne) à 4000rpm pendant 20min.

Transduction de cellules cibles

Une certaine quantité de particules lentivirales (LucF-*Colla1*WT / EGFP ou LucF-*Colla1*Mut / EGFP) est déposée sur les cellules en culture permettant ainsi l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule transduite pour une expression stable et constitutive du transgène. La transduction s'effectue dans le laboratoire de type L2. Mille cellules sont ensemencées la veille en plaque 96 puits et transduites avec 10 à 50µL de solution contenant les particules lentivirales. Le lendemain, le milieu est remplacé et après 48h, les cellules peuvent être amplifiées dans un laboratoire de niveau L1.

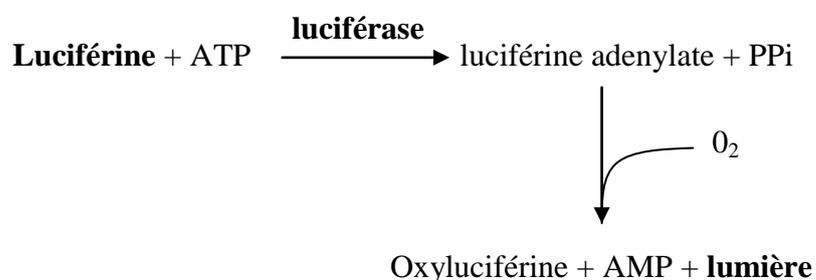
Les cellules HEK 293FT transduites avec les particules lentivirales LucF-*Colla1*WT ou LucF-*Colla1*Mut seront appelées respectivement HEK-*Colla1*-exon23WT et HEK-

Colla1-exon23Mut.

Evaluation de l'efficacité de la transduction

La cytométrie en flux est utilisée pour évaluer le nombre de cellules exprimant l'EGFP après transduction. Deux cent mille cellules sont rincées en DPBS, puis remises en suspension dans 200µL de DPBS et transférées dans un tube pour lecture au cytomètre (FC500, Beckman Coulter).

La mesure de l'activité luciférase permet de déterminer l'activité luciférase globale des cellules transduites. L'activité luciférase est mesurée en utilisant le kit « Steady-Glo[®] Luciferase Assay System » (Promega, Charbonnières, France) qui permet la détection du dégagement de lumière due à l'oxydation du substrat luciférine selon la réaction suivante :



Cent mille cellules sont placées dans un puits d'une plaque 96 puits à parois opaques (96 Well Optical bottom plates, NUNC, USA) et 100µL du réactif permettant à la fois la lyse des cellules et la mesure de l'activité luciférase dans le surnageant sont ajoutés. Le dégagement de lumière est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre sur 10s après 5min d'incubation, le résultat correspondant à l'activité luciférase est exprimé en unités relatives de luminescence (URL).

2.2.4. Transfection transitoire de siRNAs

La transfection de siRNAs au sein de ces cellules est réalisée grâce à des agents de transfection efficaces *in vitro* : la lipofectamine 2000 (Invitrogen) et l'interféline (PolyPlus transfection). Le choix de l'un ou l'autre des agents dépend de la lignée considérée, en effet, pour chaque type cellulaire l'agent présentant la meilleure efficacité de transfection a été choisi. En ce qui concerne les HEK stablement modifiées pour exprimer les transcrits LucF-*Colla1*, 10 000 cellules

ensemencées la veille en plaque 96 puits sont transfectées avec 11 ou 33nM de siRNA complexés avec 0,75µL de lipofectamine mélangée volume à volume. Un triplicat est réalisé pour chaque condition. Les fibroblastes sont quant à eux transfectés avec 1 ou 10nM de siRNAs complexés avec 2µL d'interféline pour 10 000 ou 20 000 cellules ensemencées en 24 puits.

2.3. Clonage de séquence shRNA

La transfection de siRNAs ne permettant qu'une inhibition transitoire du transcrit *Colla1* muté, nous avons choisi de cloner des séquences ADN pour la production de shRNAs qui après prise en charge par la machinerie cellulaire de l'ARN interférence donneront les siRNAs validés comme discriminants entre la séquence de l'exon 23 de *Colla1* muté et sauvage.

Le plasmide pSUPER

Le pSUPER (SUPpression of Endogenous RNA) a été décrit par Brummelkamp et al., en 2002³⁴⁸. Il possède un promoteur H1 qui est reconnu par l'ARN polymérase III. Cette dernière permet la transcription d'un insert situé en aval du promoteur. Aussi, l'ARN polymérase III génère un transcrit avec en région terminale 3' deux résidus Uridine qui permettront la prise en charge du transcrit par la machinerie d'ARN interférence de la cellule. Un promoteur T7 est présent et sera utilisé lors du séquençage. Le pSUPER comporte également un gène de résistance à l'ampicilline qui permet de sélectionner les bactéries ayant incorporé le plasmide.

Séquences pour la production de shRNA

Les shRNAs sont caractérisés par une séquence de 19 nucléotides parfaitement complémentaire au messenger ciblé (Reverse N19). Leur transcription est induite à partir d'une séquence d'ADN clonée en aval d'un promoteur reconnu par une ARN polymérase III (ici le promoteur H1 dans le plasmide pSUPER). La séquence d'ADN servant à la synthèse des shRNA est formée à partir de deux oligonucléotides parfaitement complémentaires (Figure 50) qu'il faut cloner dans le plasmide pSUPER. Après transcription ces siRNAs seront pris en charge par la machinerie de l'ARN interférence pour générer les siRNAs correspondants avec un brin sens (N19) et un brin antisens (ReverseN19).

Sens 5' -gatccccN19ttcaagagaReverseN19tttttgaaa-3'
 Antisens 5' -agcttttccaaaaN19tctcttgaaReverseN19ggg-3'

Figure 50 : Schéma de la cassette ADN pour la production de séquences shRNA. La séquence sens de la molécule de siRNA composée de 19 nucléotides (N19) est séparée de la séquence antisens (ReverseN19) par une boucle caractéristique de miRNAs endogènes (en bleu). La partie antisens correspond au brin actif de la molécule, complémentaire avec le transcrit *Colla1* muté.

Stratégie de clonage

Le clonage des séquences produisant les shRNAs est inspiré des travaux de Chang et al. ³⁴⁹. Selon leur stratégie, les deux séquences d'oligonucléotides sont complémentaires seulement pour la séquence intercalante. Les oligonucléotides présentent ainsi après appariement une séquence double brin correspondant uniquement à la séquence de la boucle du shRNA. A leurs extrémités 5' sont également ajoutées des extrémités compatibles avec les sites de clonage *HindIII* et *BglIII* présents dans le plasmide pSUPER. La structure générale des oligonucléotides servant à la synthèse des shRNA est présentée dans la figure 51.



Figure 51 : Représentation schématique de l'appariement des oligonucléotides pour le clonage de séquences servant à la production de shRNAs selon la stratégie établie par Chang et al. ³⁴⁹.

Séquences des oligonucléotides

Les séquences de shRNAs sont dessinées à partir des séquences de siRNAs montrées comme efficaces pour inhiber spécifiquement le transcrit *Colla1* muté : siRNAs « e et f » (voir partie résultats à suivre). Leur nom est donc inspiré du nom de ces siRNAs.

Les séquences d'oligonucléotides utilisées pour le clonage des cassettes de shRNA sont les suivantes :

Oligonucléotides chevauchants complémentaires pour le shRNAColl1-E :

Sens 5' -gatccccCTGGTGAAGCTGTCGCTCttcaagagaG-3'
 Antisens 5' -agcttaaaaaCTGGTGAAGCTGTCGCTCtctcttgaaG-3'

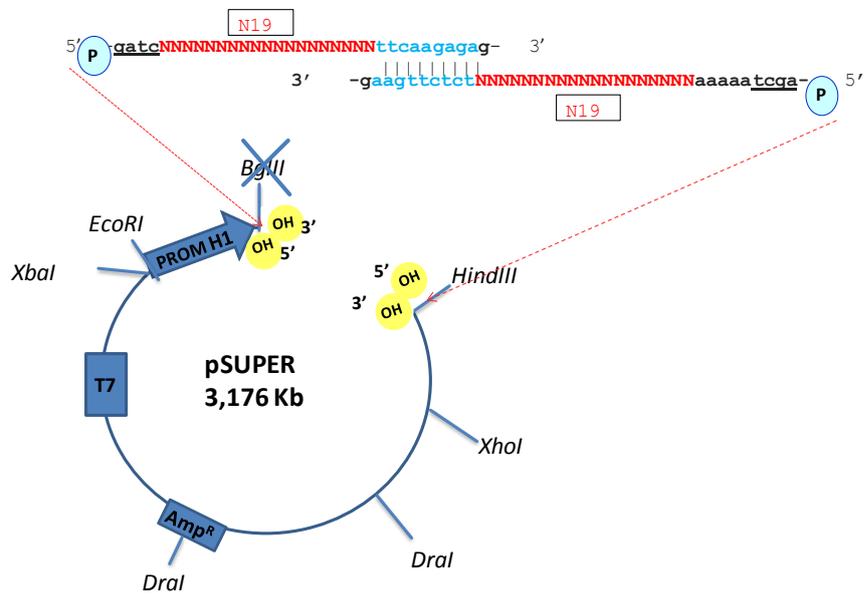


Figure 52: Première étape du clonage des duplex d'oligonucléotides dans le plasmide pSUPER.

Oligonucléotides chevauchants complémentaires pour le shRNACol1 α 1-F :

Sens 5'-gatccccTGGTGAAGCTTGTCTGCCcttcaagagaG-3'

Antisens 5'-agcttaaaaaTGGTGAAGCTTGTCTGCCcttctcttgaaG-3'

Oligonucléotides chevauchants complémentaires pour le shRNACol1 α 1-WT :

Sens 5'-gatccccCTGGTGAAGCTTGTCTGCCcttcaagagaG-3'

Antisens 5'-agcttaaaaaCTGGTGAAGCTTGTCTGCCcttctcttgaaG-3'

Les bactéries STBL3

Les bactéries STBL3 (Invitrogen) sont issues de la souche bactérienne *Escherichia Coli*, elles sont chimiocompétentes et ont une efficacité de transformation supérieure à 10⁸ colonies par μ g de plasmide. L'utilisation de cette souche est recommandée pour l'amplification de vecteurs contenant des séquences répétées comme les LTR et des répétitions inversées comme les séquences pour la production de shRNAs. En effet, elles présentent des modifications génotypiques permettant de réduire les fréquences des recombinaisons homologues qui pourraient modifier les séquences de structure répétées-inversées des LTRs et des oligonucléotides à cloner.

Protocole

Cinq μ g du plasmide pSUPER dans 50 μ L finaux sont linéarisés par les enzymes de restriction *Bgl*III et *Hind*III de manière à y insérer les duplexes d'oligonucléotides chevauchants (Eurogentec, Angers, France) contenant les séquences pour la synthèse de shRNAs (Figure 52 ci-contre). Pour optimiser les conditions de ligation, le plasmide linéarisé est purifié sur colonne *QIAquick* (Qiagen) puis déphosphorylé par traitement avec une phosphatase alcaline (Ozyme). Les oligonucléotides sont quant à eux phosphorylés par la T4 polynucléotide kinase (Ozyme) puis appariés. La ligation par la T4 DNA ligase (Invitrogen) permet de lier les oligonucléotides phosphorylés et appariés avec le vecteur pSUPER linéarisé et déphosphorylé. Après précipitation de l'ADN plasmidique, 2 μ L du produit de ligation sont introduits par choc thermique dans les bactéries STBL3. Deux cents μ L de la suspension bactérienne sont étalés sur une gélose de LB avec 100 μ g/mL d'ampicilline (Sigma) et incubés toute la nuit à 37°C. Plusieurs minipréparations de plasmide sont réalisées et vérifiées par digestion enzymatique afin d'isoler un plasmide pSUPER ayant intégré un duplex d'oligonucléotides pour chaque construction. Une étape de séquençage est alors nécessaire afin de s'assurer de la conformité de la séquence de chaque cassette

ADN (Beckman Coulter Genomics, Grenoble, France) puis une maxipréparation de plasmide est réalisée.

La deuxième partie du clonage consiste à intégrer la cassette promoteur H1 + séquence pour la synthèse des shRNAs dans un vecteur lentiviral : le pFG12 (Figure 53). Ainsi le plasmide pSUPER-shRNA et le vecteur pFG12 sont linéarisés par *Xba*I et *Xho*I. L'insert est ensuite ligaturé dans le pFG12 entre les séquences LTR par la T4 DNA ligase (Invitrogen). De même que précédemment, des minipréparations et maxipréparations de plasmides sont réalisées à partir de la transformation bactérienne du produit de ligation dans les bactéries STBL3.

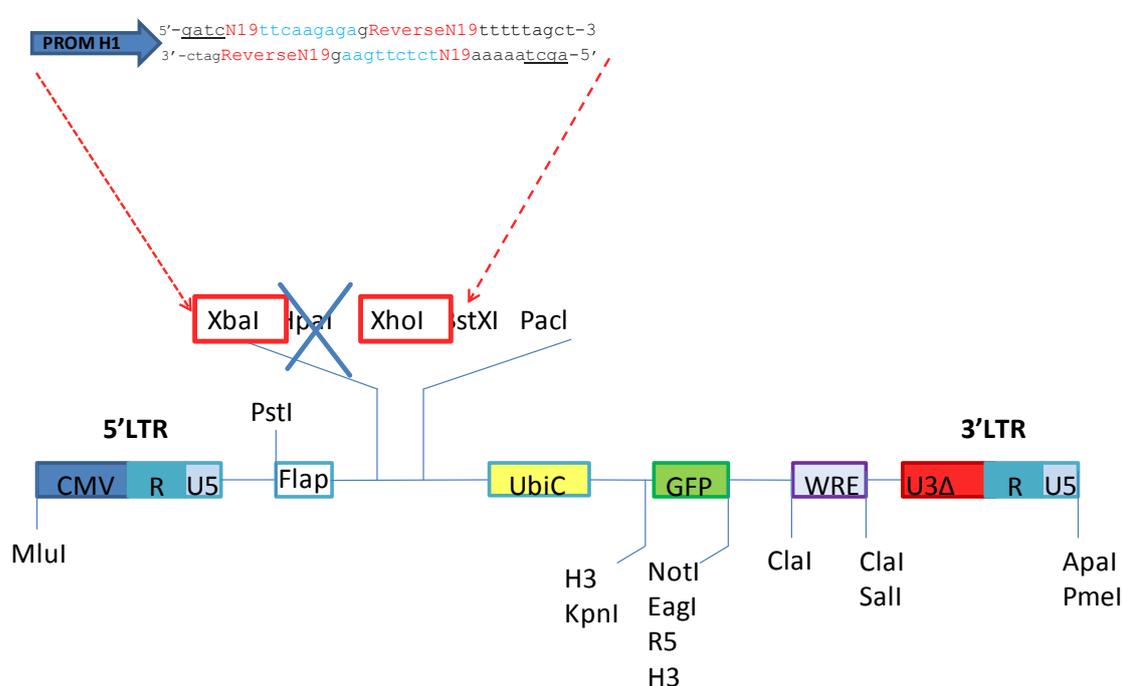


Figure 53 : Deuxième étape du clonage de la cassette promoteur H1 + cassette ADN pour la production des shRNAs dans le vecteur lentiviral pFG12.

Ces plasmides pFG12-shRNA sont ensuite utilisés afin de produire des particules lentivirales capable d'apporter et d'intégrer au sein du génome de cellules transduites une cassette shRNA (voir paragraphe 2.2.3 dans ce même chapitre). Ces particules lentivirales ont notamment été utilisées pour modifier stablement des cultures de fibroblastes issus du modèle murin BrtlIV. Ainsi 30 000 fibroblastes ensemencés en plaque 24 puits ont été modifiés par 10, 50 ou 100 μ L de production lentivirale.

2.4. RT-qPCR *Col1a1*

Les ARN totaux des fibroblastes transfectés transitoirement par les siRNAs ou stablement modifiés pour exprimer les cassettes H1-shRNAs sont extraits sur 100 000 à 500 000 cellules à l'aide du kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel).

RT-qPCR

Cinq µg d'ARN totaux sont dans un premier temps rétrotranscrits pendant 1h à 37°C dans un volume final de 50µL contenant le tampon de Reverse Transcriptase, 0,5µg de random primers, 0,5mM de dNTP, 20U de RNaseOUT et 400U de la Murine moloney leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). La réaction de qPCR qui s'en suit est réalisée en triplicat pour chaque condition sur 10ng de cDNA en présence de 300nM de primers sens et antisens et 5µL de tampon SybrGreen (BioRad, Marnes la Coquette, France) dans un volume final de 10µL. Les mesures de DO sont réalisées par le système de qPCR Chromo4 (BioRad). Les oligonucléotides 5' CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT 3' et 5' GCAGCTGACTTCAGGGATGT 3' sont utilisés pour amplifier un fragment du gène *Col1a1* de souris. L'amplification sur les ADN complémentaires (ADNc) des gènes codant l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt* 1, 5'-TCCTCCTCAGACCGCTTTT-3' et 5'-CCTGGTTCATCATCGCTAATC-3') et la cyclophyline B (*cycloB*, 5'-ACAGGAGGAAAGAGCATCTA-3' et 5'-CTTGACTGTAGTTATGAAGAACT-3') de *Mus musculus* sont utilisées comme contrôles afin de normaliser l'expression des transcrits *Col1a1*. Les résultats sont analysés selon la méthode Vandesompele³⁵⁰.

qPCR allèle spécifique

Pour chaque échantillon, 1 à 10µg d'ARN sont rétrotranscrits en ADNc par le cDNA Archive kit (Applied Biosystems) selon les recommandations du fournisseur, dans un volume final de 100µL. L'identification spécifique de chaque allèle (*Col1a1* sauvage et muté) est ensuite réalisée par quantification relative grâce à des primers P1 5'-TGCTGGTCCCAAAGGTCTC-3' (1614-1633 pb, Gene Bank NM_007742) et P2 5'-GCCAGGACTGCCAGTGA-3' (1701-1685 pb) et des sondes TaqMan spécifiques de l'allèle WT : 5'- [6FAM]TGGTGAAGCT[+G]GTCG[TAM]-3' et de l'allèle muté 5'- [6FAM]TGGTGAAG[+C]T[+T]G[+T]CG[TAM]-3' (1635-1649 pb), contenant respectivement 1 et 3 nucléotides de type LNA (Locked Nucleic Acid) indiqués entre crochets (Sigma Proligo). La réaction d'amplification est assurée à l'aide du mélange universel TaqMan (Applied Biosystems) dans 25µL avec 900nM de chaque primer et

150nM de sondes. Le cycle de température est le suivant : 2min à 50°C, 10min à 95°C, 15s à 95°C et 1min à 60°C pendant 45 cycles. La réaction est réalisée en triplicat pour chaque échantillon et le niveau d'expression de chaque allèle est rapporté à celui de la GAPDH.

Les étapes de reverse transcription et de qPCR ont été réalisées par le Dr Forlino (Pavia, Italie).

3.RESULTATS

3.1. Production de lignées cellulaires exprimant un transcrit luciférase couplé aux séquences *Col1a1* WT ou Mut

Deux modèles cellulaires de cellules HEK permettant la transcription d'une partie de l'exon 23 de *Col1a1* sauvage (WT) ou issu du modèle murin d'ostéogenèse imparfaite BrtlIV (Mut), sont générés par technologie lentivirale. L'efficacité et la spécificité des siRNAs anti-*Col1a1* muté sont alors évaluées par mesure de l'activité luciférase au sein de ces deux types cellulaires (Figure 54).

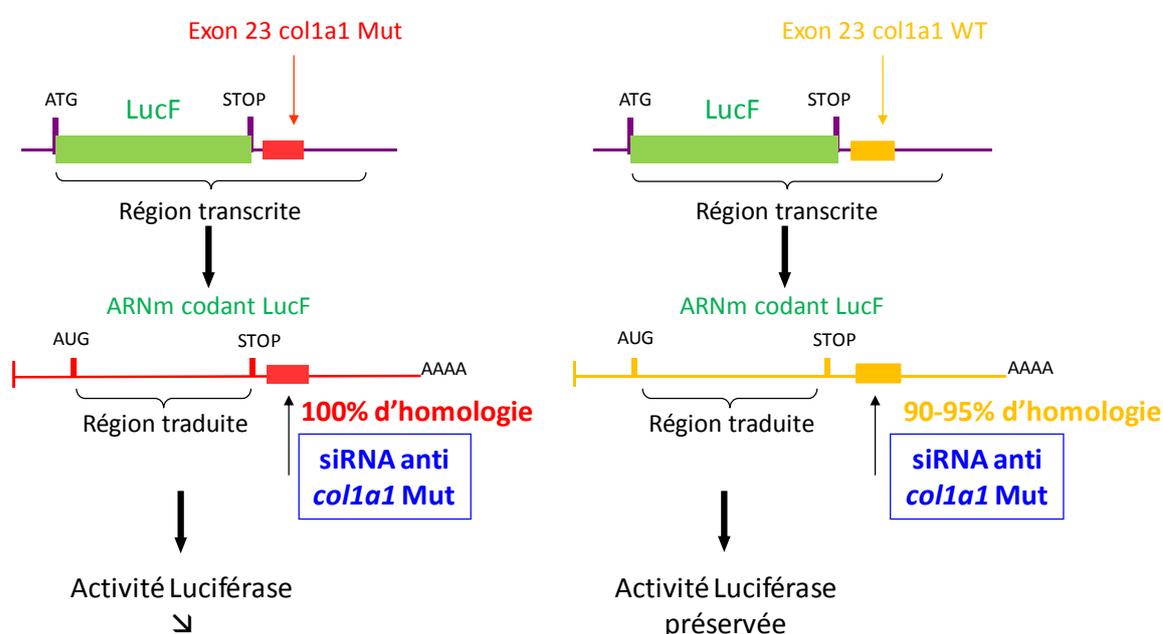


Figure 54 : Stratégie mise en place pour évaluer l'effet des 6 séquences de siRNA anti-*Col1a1* muté sur une partie du transcrit muté lui-même ou du transcrit sauvage codant la luciférase.

Les oligonucléotides double brins de 60 paires de bases ont été introduits par des techniques de clonage conventionnel dans un vecteur lentiviral : le pLNT-*LucF* (chapitre 1 des résultats, Rousseau et al, 2010). L'insertion de ces oligonucléotides portant une partie de l'exon 23 de *Col1a1* WT ou Mut est réalisée dans la partie 3' non codante du gène codant la luciférase *firefly*, c'est-à-dire entre le codon STOP du gène rapporteur et le signal de terminaison de la transcription. De cette manière, les séquences introduites font intégralement partie de l'ARNm codant la luciférase mais ne sont pas traduites lors de la production de la protéine.

Ces constructions plasmidiques sont ensuite utilisées pour la production de particules lentivirales recombinantes capables de transduire efficacement un large spectre de cellules et d'introduire leur génome viral au sein du génome de la cellule hôte. Ces particules sont cependant défectueuses pour la réplication. La transduction de cellules HEK par les particules LucF-*Col1a1*-exon23WT ou LucF-*Col1a1*-exon23Mut permet de générer ainsi les cellules HEK-*Col1a1*-exon23WT et HEK-*Col1a1*-exon23Mut respectivement. Ces modèles cellulaires ont permis de tester l'efficacité de différents siRNAs anti *Col1a1* muté en suivant l'activité de l'enzyme par luminescence.

Afin de comparer les effets des siRNAs sur chaque construction LucF-*Col1a1*-exon23WT et Mut, nous avons choisi de travailler avec des cellules présentant une activité luciférase comparable témoignant d'un taux de transcrits LucF-*Col1a1*-exon23 équivalent. En effet, l'efficacité de production de particules lentivirales et de transduction des cellules pouvant varier d'une condition à une autre, les cellules ont été transduites avec des quantités croissantes de particules lentivirales. Nous avons choisi de conserver pour la suite des investigations les cellules HEK-*Col1a1*-Exon23WT transduites avec 10 μ L et les cellules HEK-*Col1a1*-exon23Mut transduites avec 20 μ L présentant une activité luciférase de 11388 et 9589 URL respectivement pour un même nombre de cellules (10⁵) (Figure 55).

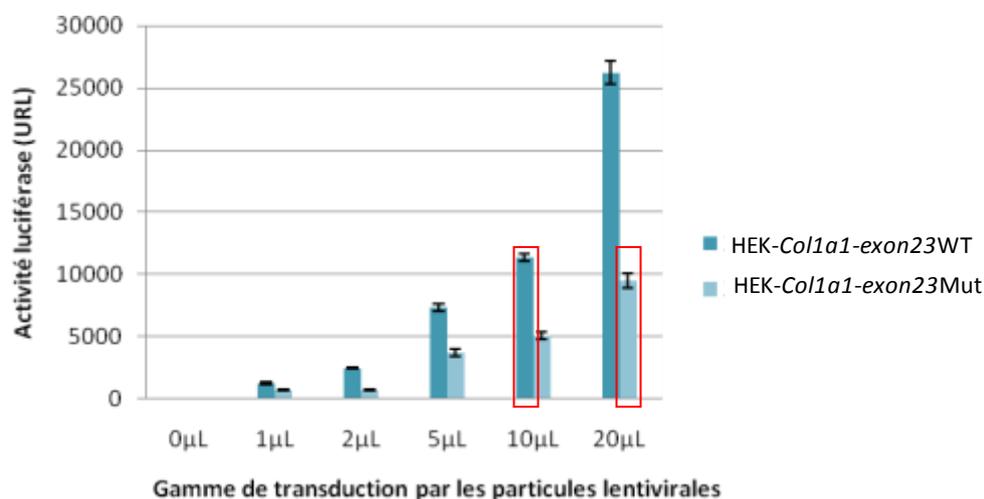


Figure 55: Mesure de l'activité luciférase après transduction par des volumes croissants de particules lentivirales LucF-WT et LucF-Mut dans les cellules HEK. L'activité luciférase est mesurée sur 100 000 cellules avec 100 μ L de Steady-Glo Luciferase Assay System. Le résultat est exprimé par la moyenne d'un triplicat pour chaque condition \pm écart-type.

3.2. Identification de siRNAs anti *Col1a1* muté dans les modèles cellulaires HEK-*Col1a1-exon23WT* et HEK-*Col1a1-exon23Mut*

De manière à valider les effets spécifiques des siRNAs anti-*Col1a1*-Mut, deux séquences de siRNA contrôles sont également transfectées. Le CT-siRNA sert de témoin négatif, car il ne reconnaît aucune séquence transcrite dans la cellule eucaryote. L'activité luciférase devrait donc être identique au contrôle non transfecté (NT) à condition que la transfection elle-même n'exerce pas un effet non spécifique inattendu. Le LucF-siRNA est le témoin positif de la transfection efficace des siRNAs. Il permet d'induire une forte diminution de l'activité luciférase puisqu'il cible le transcrit luciférase dans sa partie codante. Une diminution semblable est espérée pour les siRNAs anti-*Col1a1*-Mut sur les transcrits codant la luciférase couplés à la séquence *Col1a1* mutée.

Dans un premier temps, nous avons transfecté les siRNAs contrôles (CT-siRNA et LucF-siRNA) afin de valider des conditions de transfection efficaces des cellules HEK modifiées pour exprimer stablement la luciférase sans séquences *Col1a1*. La condition permettant une forte diminution spécifique de l'activité luciférase a été obtenue après transfection de 33nM de siRNA complexés avec la lipofectamine (Figure 56A), condition pour laquelle le siRNA contrôle négatif (CT-siRNA) ne modifie pas l'activité de l'enzyme. Dans un second temps, ce protocole de transfection a pu être appliqué aux siRNA anti-*Col1a1*-Mut afin d'évaluer leur efficacité et leur spécificité vis-à-vis du transcrit muté dans les cellules HEK-*Col1a1-exon23Mut* et sauvage dans les cellules HEK-*Col1a1-Exon23WT* (Figure 56B). Dans ces conditions, les siRNAs « a, b, c et d » inhibent de manière plus importante le transcrit muté (de 40 à 53% selon le siRNA) que le transcrit WT, mais entraînent également une inhibition significative de l'expression de la séquence sauvage (entre 20 et 41% contre seulement 8% avec le CT-siRNA). Ceci suggère que l'inhibition du transcrit WT est due non pas à un effet non spécifique de transfection mais bien à une activation du système d'ARNi par les siRNAs anti-*Col1a1* muté vis-à-vis des transcrits LucF-*Col1a1-exon23WT*. Les séquences « e » et « f » montrent quant à elles une inhibition spécifique de l'activité luciférase de 57% après transfection au sein des cellules HEK-*Col1a1-exon23Mut*, cette inhibition étant comparable à celle obtenue avec le LucF-siRNA (52% dans le même type cellulaire). De plus, la transfection par les siRNAs « e »

et « f » n'entraîne aucun changement significatif de l'activité luciférase dans les cellules HEK-*Col1a1*-exon23WT alors que le LucF-siRNA dans ces mêmes cellules permet d'inhiber efficacement son activité enzymatique (52%) (Figure 56B). Ces résultats montrent que les siRNAs « e » et « f » sont efficaces pour diminuer l'expression d'un transcrit muté portant la séquence *Col1a1*-exon23Mut et sont discriminants vis-à-vis d'un transcrit portant la séquence de l'exon 23 du *Col1a1* sauvage.

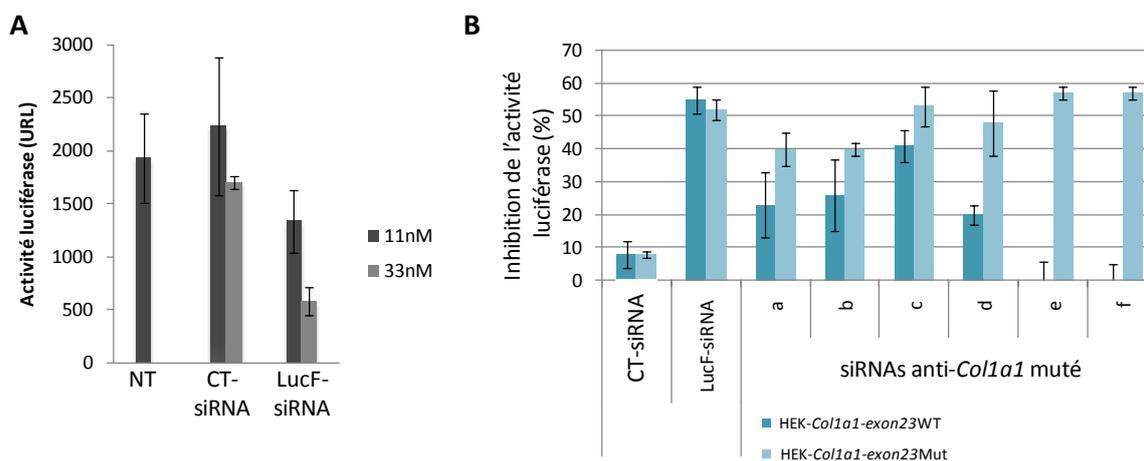


Figure 56 : Inhibition de l'activité luciférase après transfection transitoire de siRNAs dans les modèles cellulaires HEK exprimant la luciférase. (A) Mise au point des conditions de transfection par transfection transitoire de 11 ou 33nM de siRNAs contrôles : CT-siRNA et LucF-siRNA dans des cellules HEK modifiées pour le transcrit luciférase seul sans les séquences *Col1a1*. **(B)** Transfection transitoire des 6 siRNAs anti-*Col1a1* muté (33nM) dans les cellules HEK-*Col1a1*-exon23WT et HEK-*Col1a1*-exon23Mut. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité luciférase par rapport à l'activité basale des cellules et comparé au contrôle négatif : le CT-siRNA et au contrôle positif : LucF-siRNA (±écart-types).

3.3. Validation des siRNAs anti *Col1a1* muté dans des fibroblastes de souris BrlIV

Les cellules HEK-*Col1a1*-exon23WT et Mut nous ont permis d'identifier deux séquences de siRNA : « e et f », potentiellement capables d'inhiber spécifiquement et efficacement l'expression de *Col1a1* muté dans le modèle de souris BrlIV. Cependant la limite de ces modèles cellulaires repose sur le fait que seule une petite partie de l'ARNm de *Col1a1* est transcrite et que chaque transcrite (LucF-*Col1a1*-exon23WT et LucF-*Col1a1*-exon23Mut) est produit séparément dans des cellules différentes. L'étape suivante consiste donc à évaluer l'efficacité de ces deux séquences de siRNA « e » et « f » dans des cellules issues des souris BrlIV afin de valider (1) leur efficacité sur des transcrits complets codant les chaînes $\alpha 1$ sauvages et mutées et (2) leur spécificité dans une cellule où les deux transcrits (WT et Mut)

	10 000 cellules					
	1nM			10nM		
	Col1a1-siRNA	e	f	Col1a1-siRNA	e	f
% d'inhibition du WT	50	55	35	80	25	30
% d'inhibition du muté	40	70	60	45	60	70

Tableau 8 : Résultats obtenus par qPCR allèle spécifique après transfection des siRNAs anti *Col1a1* muté « e » et « f » dans les fibroblastes de souris BrtlIV. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition pour chaque allèle (WT ou Mut). Les conditions pour lesquelles l'allèle sauvage est plus fortement inhibé que l'allèle muté sont indiquées en bleues, tandis que les conditions pour lesquelles l'inhibition du transcrit muté dépasse celle du transcrit sauvage sont indiquées en rouge.

sont exprimés simultanément.

Nous avons ainsi travaillé à partir de cultures primaires de fibroblastes issus de souris saines ou BrtlIV (ces cellules ont été fournies par le Dr Forlino, Italie). Comme précédemment, une première étape de validation des conditions de transfection a été nécessaire avant de transférer les siRNAs anti-*Col1a1* « e » et « f ». Dans cet objectif, des fibroblastes sauvages ont été transfectés avec le CT-siRNA ou avec un siRNA permettant d'inhiber spécifiquement l'expression de *Col1a1* WT endogène (siRNA eWT). Cependant la lipofectamine ne permet pas de transférer efficacement des siRNAs dans ce type cellulaire contrairement à l'interféryne qui, quelque soit la quantité de siRNA transférée, a permis d'obtenir une inhibition des transcrits *Col1a1* d'environ 60% avec l'interféryne (mesurée par qPCR, figure 57).

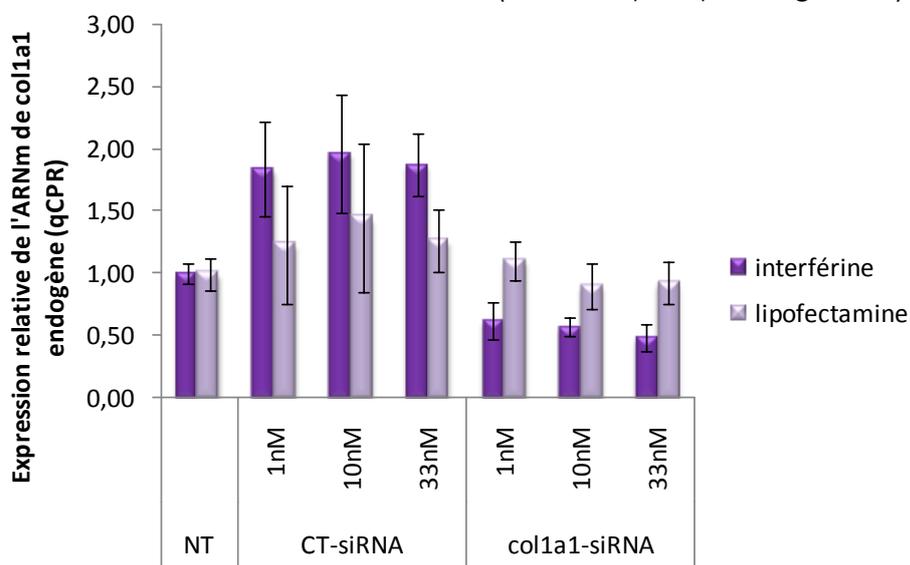


Figure 57 : Niveau d'expression des ARNm *Col1a1* endogènes évalués par qPCR après transfection transitoire de siRNAeWT par deux agents de transfection : la lipofectamine et l'interféryne.

Dix mille ou 20 000 fibroblastes BrtlIV ont ensuite été transfectés avec 1 ou 10nM de siRNAs anti *Col1a1* muté « e » et « f » complexés à l'interféryne. L'analyse de l'expression de chacun des deux transcrits a été réalisée par l'équipe du Dr Forlino par qPCR allèle spécifique dans les conditions où 10 000 cellules ont été transfectées (les conditions utilisant 20 000 cellules sont en cours d'analyse). Les résultats montrent une inhibition significative du transcrit muté avec les deux séquences de siRNA pouvant atteindre 70% d'inhibition (1nM de siRNA « e » ou 10nM de siRNA « f ») tout en préservant l'expression de l'allèle sauvage (entre 25 et 55% d'inhibition selon le siRNA et les conditions de transfection) (Tableau 8 ci-contre). Les meilleures conditions de transfection du siRNA « e » permettent d'inhiber 60% du transcrit muté

et seulement 25% du transcrit sauvage. En ce qui concerne le siRNA « f » les meilleurs résultats ont été obtenus dans les mêmes conditions de transfection avec 70% d'inhibition d'expression de l'ARNm *Col1a1* muté et 30% d'inhibition du WT.

Ces résultats montrent que la quantité relative de transcrit sauvage codant une chaîne $\alpha 1$ fonctionnelle est augmentée par rapport à celle du transcrit muté (Figure 58).

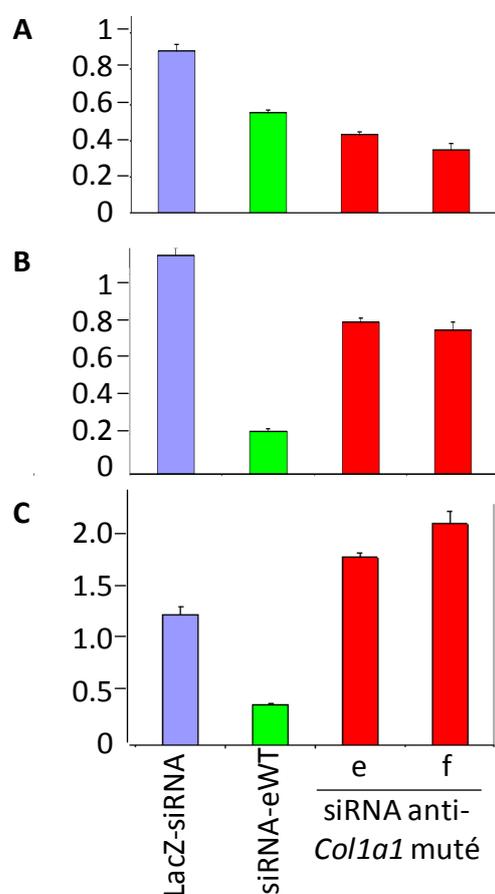


Figure 58 : Expression relative des transcrits *Col1a1* sauvage et muté dans les fibroblastes de souris BrtlIV mesurée par qPCR allèle spécifique. Les résultats sont indiqués en unités relatives d'expression avec pour référence les cellules non transfectées pour lesquelles une valeur arbitraire de 1 a été choisie. Cette technique permet d'évaluer le niveau d'expression des ARNm *Col1a1* muté (A) et sauvage (B) afin de déterminer la part d'expression du transcrit WT par rapport au transcrit Mut (C). Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH et sont exprimés en moyenne \pm écart-types.

3.4. Clonage de séquences « shRNA » à partir des siRNAs « e » et « f »

Ces études préliminaires ont permis d'identifier deux séquences de siRNA permettant une inhibition significative du transcrit *Col1a1* muté dans des fibroblastes de souris BrtlIV tout en préservant le transcrit *Col1a1* sauvage. Cependant ces

inhibitions restent éphémères de par la présence transitoire des siRNAs transfectés. C'est pourquoi afin de permettre une inhibition stable dans le temps du transcrit muté une cassette d'expression de shRNA doit être apportée et intégrée au sein des cellules cibles comme les cellules souches mésenchymateuses des souris BrIIIv. Trois cassettes de shRNA ont été dessinées en vue d'un clonage dans un vecteur lentiviral : 2 cassettes désignées shRNAColl1a1-e et shRNAColl1a1-f car dérivées des séquences de siRNA « e » et « f » respectivement et une cassette basée sur la séquence du siRNA-eWT ciblant le transcrit sauvage (shRNAColl1a1-eWT). En ce qui concerne le CT-siRNA, nous avons choisi d'utiliser une construction de shRNA déjà disponible au laboratoire : le shRNA-LacZ correspondant à un siRNA ciblant le transcrit de la β -galactosidase exprimé par les bactéries uniquement.

Le dessin de la séquence d'ADN servant à la synthèse des shRNA a dans un premier temps été basé sur la publication originale de Brummelkamp et al.³⁴⁸. Cette stratégie implique l'insertion d'oligonucléotides appariés sur toute leur longueur (Figure 59) dans le plasmide pSUPER possédant un promoteur compatible avec l'ARN polymérase III : le promoteur H1. La cassette promoteur H1 + shRNA est ensuite sous-clonée dans un vecteur permettant la production de particules lentivirales : le pFG12. Cette stratégie est utilisée en routine au laboratoire car elle a déjà permis de cloner avec succès un grand nombre de séquences de ce type.

```

Sens      5' GATTCC N19 TTCAAGAGA ReverseN19 TTTTGGAAA 3'
Anti-sens 3' GG ReverseN19 AAGTTCTCT N19 AAAAACCTTTTCGA5'
  
```

Figure 59 : Schéma des oligonucléotides appariés formant une séquence ADN pour le clonage de shRNA selon les recommandations de Brummelkamp et al. Ces oligonucléotides présentent des extrémités sortantes en 5' compatibles avec les sites de clonage du plasmide pSUPER et possèdent au niveau du brin anti-sens les séquences nécessaires à la synthèse de la molécule de shRNA par la polymérase III.

Ce protocole a permis de cloner les séquences shRNAColl1a1-eWT avec un rendement de 52% (pourcentage de miniprep ayant intégré un duplex d'oligonucléotides après digestion enzymatique et migration sur gel d'agarose). Cependant, cette stratégie n'a permis d'obtenir que très peu de clones pour les séquences shRNAColl1a1-e et f (1 et 2% respectivement). De plus, le séquençage des quelques clones ayant intégré les séquences shRNAColl1a1-e et f a montré de nombreux remaniements par rapport aux séquences souhaitées telles que des insertions, délétions ou substitutions (Figure 60). Le taux de réussite du clonage de la

séquence shRNAColl1a1-eWT nous a tout de même permis d'isoler une miniprep positive au séquençage.

↓

Séquence obtenue ₁	GATCCCCCTGGTGAAG-TGGTCGCCCTTCAAGAGAGGGCGACCAGCTTCACCAGTTTTT GGAAA	64
Séquence attendue ₁	GATCCCCCTGGTGAAGCTGGTCGCCCTTCAAGAGAGGGCGACCAGCTTCACCAGTTTTT GGAAA	65

Figure 60 : Exemple d'une délétion révélée par le séquençage d'une minipréparation de plasmide pSUPER-shRNAColl1a1eWT.

Au regard de ces difficultés de clonage inhabituelles, nous avons dans un deuxième temps choisi d'utiliser une autre stratégie de clonage de séquences shRNA dans le plasmide pSUPER en se basant sur les travaux de Chang ³⁴⁹. Selon sa stratégie, les deux séquences d'oligonucléotides sont complémentaires seulement pour la séquence intercalante correspondant à la boucle du shRNA (voir paragraphe 2.3 du matériel et méthodes) ce qui semble faciliter l'insertion du duplex dans le plasmide pSUPER. Ce nouveau dessin des oligonucléotides a permis d'obtenir pour chaque couple d'oligonucléotides semi-appareillés shRNA-Coll1a1-eWT, e et f plusieurs minipreps positives avec une insertion des duplexes (40, 20 et 25% d'efficacité au clonage respectivement) et de retenir pour chaque shRNA une miniprep après séquençage présentant 100% d'identité entre la séquence clonée et la séquence attendue.

La seconde étape du clonage, qui consiste à sous-cloner la cassette « promoteur H1 + shRNA » du plasmide pSUPER vers le vecteur lentiviral pFG12, a été réalisée avec succès. A partir des vecteurs pFG12-shRNA, des particules lentivirales ont pu être produites afin de modifier stablement les fibroblastes de souris BrtlIV. Le pFG12 possède également entre ses séquences LTR une séquence codant l'EGFP nous permettant d'analyser et de comparer l'efficacité de transduction pour chaque construction. Ces analyses ont montré pour chaque transduction deux populations distinctes, l'une correspondant aux cellules non modifiées et l'autre à des cellules exprimant plus ou moins fortement l'EGFP selon les conditions de transduction (Figure 61). L'analyse par qPCR allèle spécifique des effets de l'expression des shRNAs au sein de ces cellules est actuellement en cours d'investigation par comparaison aux effets des deux shRNA contrôles : le shRNAColl1a1-eWT ciblant les ARNm *Coll1a1* sauvages et le shRNA-LacZ n'ayant aucune cible dans les cellules souris. Cependant il sera important de prendre en compte les données de la cytométrie en flux afin de comparer des populations cellulaires exprimant le même taux d'EGFP et

théoriquement le même taux de shRNA (Figure 61). Ainsi, les conditions de transduction 10µL, 100µL et 50µL respectivement pour les cassettes shRNA-LacZ, *Col1a1-e* et f présentant une proportion de cellules et une intensité d'expression de l'EGFP équivalentes (62% de cellules EGFP et 20,7 d'intensité d'expression en moyenne) pourront être utilisées par la suite dans les investigations de qPCR allèle spécifique.

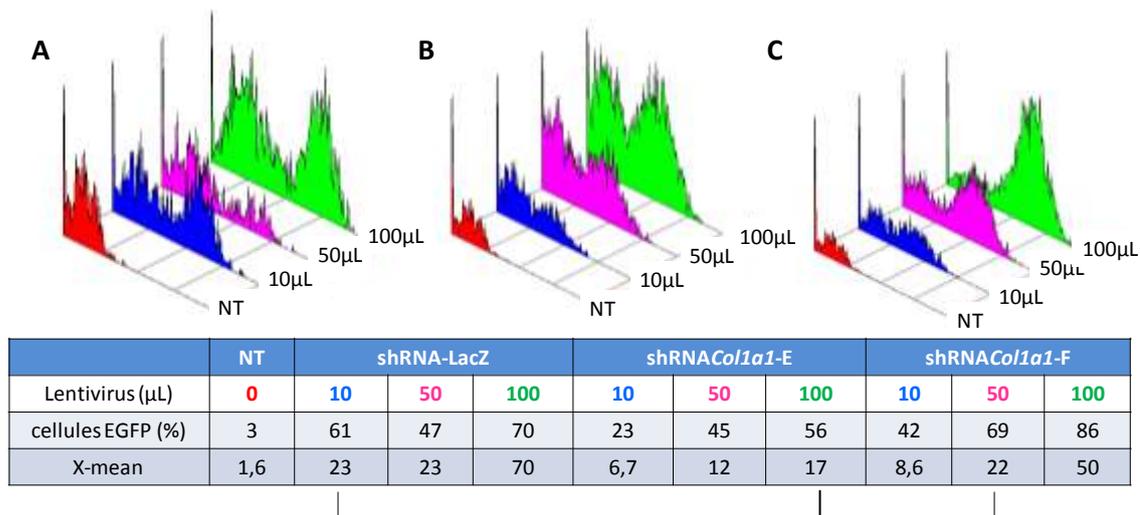


Figure 61: Analyse par cytométrie en flux de l'expression de l'EGFP après transduction par les particules lentivirales « shRNA » des fibroblastes mutés. L'analyse des histogrammes montre la répartition des cellules comparativement aux cellules non transduites (NT) et permet de calculer pour chaque condition de transduction les pourcentages de cellules et l'intensité (X-mean) d'expression de l'EGFP pour les particules lentivirales shRNA-LacZ (A), *Col1a1-e* (B) et -f (C). Les populations cellulaires présentant des taux d'EGFP comparables sont reliées par une ligne noire.

Afin d'améliorer ces études, une étape de tri cellulaire pour isoler les cellules effectivement transduites (par expression de l'EGFP) pourra être effectuée de façon à comparer l'expression relative des transcrits *Col1a1* sauvage et muté dans une population de cellules homogène pour l'expression de séquences shRNA.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les investigations menées ont permis d'identifier deux séquences de siRNA efficaces pour inhiber le transcrit *Colla1* muté et préserver la séquence sauvage dans des fibroblastes de souris BrtlIV. Des analyses de qualité de la matrice collagénique sur les cellules modifiées pour une expression stable des cassettes « shRNA » correspondantes devront être mises en place afin d'évaluer le bénéfice de l'inhibition d'expression de la chaîne mutée. La prochaine étape de cette étude consiste à évaluer l'efficacité thérapeutique de l'expression de ces cassettes « shRNA » chez la souris BrtlIV par thérapie cellulaire et génique via l'autogreffe de cellules souches mésenchymateuses modifiées par les lentivirus shRNAColl1a1-e ou f.

4.1. Thérapie cellulaire : les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont largement développées dans des protocoles cliniques de thérapie cellulaire (121 essais cliniques répertoriés <http://clinicaltrials.gov>) y compris pour des désordres osseux comme l'ostéonécrose (NCT00813267) ou encore l'arthrite articulaire (NCT01183728). Les techniques d'isolement et de purification des CSM sont relativement bien développées et de plus en plus adaptées à la mise en place d'essais cliniques chez l'Homme ^{351,352}. En ce qui concerne l'ostéogenèse imparfaite, plusieurs études ont également montré les effets thérapeutiques bénéfiques d'allogreffes de CSM. En effet, ces cellules sont les progéniteurs des ostéoblastes et des fibroblastes, source essentielle de collagène de type I.

L'injection systémique de CSM autologues exprimant la GFP dans un modèle murin d'ostéogenèse imparfaite montre une expression de la protéine fluorescente dans différents tissus y compris le tissu osseux. Les CSM ont ainsi été retrouvées dans la moelle osseuse, l'os trabéculaire et l'os cortical sur des coupes histologiques de fémur et de tibia. Elles expriment les marqueurs caractéristiques d'une différenciation ostéoblastique et produisent une matrice collagénique fonctionnelle participant à la formation osseuse ³⁵³. Ces injections ont permis d'améliorer le tableau clinique chez la souris malgré un faible pourcentage de prise de greffe. C'est pourquoi un essai

clinique a été mis en place chez des enfants atteints d'ostéogenèse imparfaite impliquant la transplantation de précurseurs mésenchymateux issus de la moelle osseuse de donneurs sains (NCT00187018).

Le pourcentage de prises de greffe des CSM autologues injectées par voie intra-utérine chez la souris BrtlIV gestante était supérieur à celui obtenu dans l'étude précédente. Ces cellules produisaient 20% du collagène de type I total dans le tissu osseux des souriceaux ³⁵⁴. Dans un modèle murin d'ostéogenèse de type III (la souris oim) cette voie d'injection a également montré l'efficacité d'un protocole de xénogreffe par injection de CSM humaines chez la souris gestante. Les CSM ont été majoritairement retrouvées au sein du tissu osseux. Cette greffe a eu pour conséquence une réduction de l'incidence des fractures (58,6% des animaux traités présentaient au moins une lésion contre 97,7% chez les souris contrôles), fractures dont le nombre était significativement diminué par animal (1 au lieu de 3 en médiane). L'injection de ces CSM a également permis d'augmenter la résistance et la longueur des os, l'épaisseur de la corticale et de normaliser la croissance des animaux ³⁵⁵.

La voie d'injection intra-utérine permet donc d'obtenir un meilleur pourcentage de prises de greffe des CSM dans le modèle animal permettant de diminuer l'incidence des fractures et les déformations osseuses. Cette voie d'injection est plus risquée que la greffe de CSM post-natale mais présente un certain nombre d'avantages par rapport aux autres méthodes d'administration ³⁵⁶. Elle permet d'intervenir dès la formation primaire du squelette du fœtus réduisant ainsi les taux de mortalité intra-utérine. De plus, un fœtus dont le système immunitaire est immature accepte plus facilement des antigènes étrangers ³⁵⁷. De par la taille réduite du fœtus un nombre réduit de CSM suffit à permettre la prise de greffe. L'expansion des cellules greffées au sein des différents compartiments anatomiques est également plus facile car les mécanismes de prolifération et d'expansion clonale sont fortement actifs lors du développement embryonnaire. Cette technique a dès lors été utilisée chez une femme enceinte présentant un fœtus avec une ostéogenèse imparfaite sévère. L'injection de CSM allogéniques *in utero* durant la 32^{ème} semaine de grossesse combinée à un traitement par des bisphosphonates dès l'âge de 2 mois après la naissance a permis d'améliorer l'architecture de l'os trabéculaire et de diminuer le risque de fracture (seulement 3 en 2 ans). A l'âge de 2 ans, la croissance et le développement de l'appareil psychomoteur étaient normaux

187.

Cependant cette voie d'injection n'est possible qu'après dépistage pré-natal d'un phénotype d'ostéogenèse imparfaite. Dans les cas où la maladie n'est détectée qu'à la naissance ou dans la petite enfance, les techniques de transplantation nécessitent de trouver un donneur HLA compatible afin d'optimiser les prises de greffe. Une manière de s'affranchir du problème de compatibilité du donneur et du receveur serait de pouvoir corriger stablement les CSM du patient en vue d'une autogreffe.

Nous proposons de tester cette possibilité par modification des CSM de souris BrtlV par production stable des molécules de shRNAs, spécifiques du transcrit *Col1a1* muté, clonées dans notre étude. Les effets sur la qualité de la matrice de collagène et son impact sur l'architecture osseuse pourront être comparés à ceux obtenus par allogreffe de CSM sauvages. Dans un premier temps, les protocoles testés pourraient utiliser la voie d'injection intra-utérine avant d'envisager de réelles autogreffes. Les particules lentivirales que nous avons produites seront utilisées afin de modifier stablement les CSM BrtlV. En effet, les CSM sont efficacement transduites par ces vecteurs (voir conclusions et discussion du chapitre 1 des résultats). De plus, les particules lentivirales représentent une classe de vecteurs ayant un fort potentiel de transfert de gène et sont activement développées pour une utilisation en clinique.

4.2. Thérapie génique : les vecteurs rétroviraux

Les vecteurs rétroviraux utilisent les capacités intégratrices des rétrovirus permettant une expression stable et constitutive du transgène tout en étant inefficaces pour la réplication. En effet, les gènes viraux de réplication (*gag*, *pol* et *env*) sont remplacés par le transgène et le vecteur conserve les séquences LTR indispensables à l'intégration au sein du génome de la cellule cible et à l'expression du gène d'intérêt. Cependant, les limites à l'utilisation de ce genre de vecteur résident dans le fait qu'ils ne peuvent transduire que des cellules en division.

Le premier essai clinique utilisant ces vecteurs rétroviraux fut mené par le professeur Alain Fischer à l'Hôpital Necker en 1999 sur des enfants atteints d'un déficit immunitaire combiné sévère (DICS). Ces enfants dont le système immunitaire est défaillant suite à la mutation dans le gène codant la chaîne commune gamma du récepteur à l'interleukine 2 (indispensable au fonctionnement des lymphocytes T) sont maintenus à l'écart de virus et de bactéries extérieurs dans des bulles à

atmosphère stérile. La stratégie envisagée consistait en une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques du patient modifiées *ex vivo* à l'aide d'un rétrovirus codant le gène fonctionnel de la chaîne γ . Ainsi, 10 enfants ont pu être traités avec ce protocole permettant ainsi une production de lymphocytes T fonctionnels (production complète ou partielle par rapport à un individu sain). Malheureusement, chez deux d'entre eux, l'insertion du transgène se fit à proximité d'un proto-oncogène : LM02 (impliqué dans le contrôle de l'hématopoïèse) dont l'expression fut activée par les séquences LTR conduisant à une leucémie ^{358,359}. L'un d'eux décéda 5 ans plus tard. Ces essais ont donc permis de sauver 17 « enfants bulles » sur 20 traités au total en France et en Angleterre ; et de mettre en évidence la dangerosité potentielle d'insertion mutationnelle des vecteurs rétroviraux ³⁶⁰.

Depuis quelques années, une nouvelle classe de vecteurs rétroviraux, les vecteurs lentiviraux, majoritairement développés à partir du HIV-1 (Human immunodeficiency virus – 1), sont activement développés. Ils ont une capacité de clonage allant jusqu'à 9 kb permettant l'insertion de transgènes et de promoteurs de grande taille. Ils peuvent transduire à la fois des cellules en division et post-mitotiques grâce à leur complexe de préintégration ³⁶¹ et permettent de par l'intégration de leur génome au sein du génome de la cellule hôte une expression stable du transgène. De même que précédemment, les vecteurs lentiviraux sont inefficaces à la réplication de par le remplacement des gènes viraux nécessaires à cette étape par le transgène d'intérêt.

Les études actuelles sur le développement des vecteurs lentiviraux visent à améliorer leur efficacité de transfert de gène et la sécurité biologique. Ainsi, l'amélioration de leur efficacité passe par l'augmentation des titres de production, de l'efficacité de la transduction et de l'expression du transgène. Des lignées de production des particules lentivirales ont été modifiées pour exprimer de manière inductible la VSV-G (glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire) permettant une production de vecteurs à grande échelle ³⁶². L'expression de la VSV-G permet également d'augmenter l'efficacité de transduction y compris dans des types cellulaires peu permissifs voire réfractaires via la reconnaissance de cette protéine d'enveloppe par les chaînes de glycosaminoglycanes des protéoglycanes présents à la surface des membranes cellulaires offrant ainsi un large tropisme cellulaire aux particules lentivirales ³⁶³. C'est le cas par exemple des hépatocytes primaires, des astrocytes, des lymphocytes T, des macrophages et des cellules dendritiques. L'expression du transgène peut quant à elle être améliorée au niveau

transcriptionnel par l'ajout d'une séquence *Matrix attachment region* (MAR) améliorant la conformation du provirus dans la chromatine et favorisant ainsi la fixation des facteurs de transcription ³⁶⁴, ou encore par l'utilisation d'un promoteur fort. Au niveau post-transcriptionnel, l'insertion de séquences de type wpre (Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) ou de type région 3' / 5' non traduites (UTR) permettent de favoriser la stabilité des ARNm et leur transport vers le cytoplasme ³⁴⁴.

Une application très prometteuse des vecteurs lentiviraux concerne la modification de cellules ex vivo difficiles à transfecter avec les méthodes classiques. Un essai a notamment été mené chez deux enfants âgés de 7 ans atteints d'adrénoleucodystrophie liée à l'X, une pathologie neurodégénérative sévère associée à une démyélinisation progressive du système nerveux central et périphérique. Cette pathologie se caractérise par la mutation du gène ABCD1 codant la protéine de l'adrénoleucosytrophie (ALD). A ce jour, la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques issues d'un donneur sain est la seule thérapie efficace, mais ce type de stratégie pose le problème de compatibilité entre donneur et receveur et est également liée à un fort risque de mortalité. Dans cet essai clinique, deux patients atteints d'adrénoleucodystrophie ont été traités par allogreffe de cellules CD34⁺ stimulées et modifiées ex vivo par un vecteur lentiviral dérivé du HIV-1 codant la protéine ALD. Le promoteur utilisé est un promoteur MND (myeloproliférative sarcoma virus enhancer) modifié afin d'éviter l'activation de gènes à proximité du site d'insertion dans le génome de la cellule hôte. L'utilisation de ce vecteur lentiviral a permis une transduction efficace des cellules CD34⁺. Après réinjection chez le patient, 25% des cellules du sang périphérique expriment l'ALD et un arrêt de la progression de la maladie au niveau du système nerveux central a pu être observé. Enfin, l'analyse longitudinale de l'insertion du transgène n'a montré aucun effet délétère ³⁶⁵.

Ces avancées technologiques et la mise en place d'essai clinique sont un espoir pour le transfert de gène dans différentes pathologies y compris dans l'ostéogenèse imparfaite.

5. DISCUSSION

Cette étude, ainsi que le nombre croissant de publications, montrent la faisabilité de l'utilisation des molécules d'ARNi pour cibler spécifiquement et efficacement l'expression d'un transcrit muté ne différant que d'un ou deux nucléotides par rapport au transcrit sauvage codant la protéine fonctionnelle.

Nos résultats nous ont permis d'identifier deux séquences de siRNA efficaces pour inhiber *ex vivo* efficacement et spécifiquement l'expression du transcrit *Colla1* muté des souris *BrlIV*. Cependant, les brins antisens des siRNAs « e » et « f » présentent non pas un mais deux nucléotides différant avec la séquence sauvage. En effet, la présence de la mutation silencieuse à proximité de la mutation ciblée par les siRNAs entraînant la substitution d'une glycine ne nous a pas permis de tester dans les meilleures conditions plusieurs séquences de siRNA ne présentant qu'un nucléotide de différence comme ce serait le cas dans le traitement d'un patient atteint d'ostéogenèse imparfaite. Pour les siRNAs présentant une seule différence (« a et b »), l'avantage du positionnement de la mutation sur la 16^{ème} base du brin sens du siRNA « a » décrit par Schwarz et al. ³⁴³ n'est pas retrouvé. En effet, comparativement au siRNA « b » présentant la mutation en position 15, les pourcentages d'inhibition des deux transcrits sauvage et muté sont équivalents (23-26% et 40% respectivement, tableau 9). De plus, les pourcentages d'inhibition moyens présentés dans le tableau 9 montrent que la transfection des cellules HEK-*Colla1*-exon23Mut par les siRNAs « c, d, e et f » présentant deux nucléotides de différence permet une augmentation de l'inhibition de l'expression du transcrit *Colla1* muté comparativement aux effets des siRNAs « a et b » ne présentant qu'une seule différence (de 48% à 57% dans les meilleures séries contre 40% respectivement). L'efficacité d'inhibition du transcrit *Colla1* muté est optimale avec les siRNAs « e et f ». Ces deux molécules de siRNA préservent l'expression du transcrit sauvage contrairement au siRNA « c » qui l'inhibe à 41% bien que présentant deux nucléotides de différence avec cet ARNm. Néanmoins, il peut être noté que l'un de ces nucléotides ciblant une des deux mutations ponctuelles est situé en position 12 pour le siRNA « e » et 16 pour le « f », positions qui avait été montrées comme efficaces pour induire le clivage spécifique du transcrit muté par Schwarz et al. ³⁴³. Ainsi, le nombre de variations nucléotidiques et le positionnement des siRNAs sur les transcrits *Colla1* sauvage et muté semblent être des facteurs impliqués dans l'efficacité des siRNAs.

siRNA <i>coll1a1</i> Mut	Inhibition du transcrit LucF ayant la séquence <i>coll1a1</i> WT	Inhibition du transcrit LucF ayant la séquence <i>coll1a1</i> Mut
f 11 16	0%	57%
e 12 17	0%	57%
d 13 18	20%	48%
c 14 19	41%	53%
b 15	26%	40%
a 16	23%	40%

- Mutation nucléotidique ponctuelle provoquant le changement d'une glycine en cystéine
- ◆ Mutation silencieuse provoquant la substitution d'une cytosine en thymine

Tableau 9 : Relation entre le nombre de mutation et leur positionnement sur les séquences siRNA anti-*Col1a1* Mut avec leur effet d'inhibition du transcrit LucF-WT et LucF-Mut.

Afin d'évaluer la possibilité de cibler une mutation ponctuelle par les molécules d'ARNi, une nouvelle étude avec un dessin de plusieurs séquences de siRNA pourrait être mise en place en se basant sur des cultures primaires de cellules issues de patients dont la mutation ponctuelle est clairement identifiée. La production des shRNA issues du dessin et de l'identification de séquences siRNA adaptées à cette mutation permettra de modifier stablement des CSM issues de ce même patient et d'en étudier les effets bénéfiques. Des vecteurs lentiviraux optimisés pour améliorer l'efficacité de transduction et minimiser les effets délétères pourront être utilisés dans ce cas. Cependant, cette technique de transfert de gène peut être associée à une perte des capacités de prolifération et de différenciation des progéniteurs ³⁶⁶. De plus, un fort taux d'expression des shRNAs peut également être associé à une toxicité cellulaire. En effet, ces shRNA pourraient entrer en compétition avec les miRNAs endogènes et entraîner entre autre une saturation de l'Exportin-5 permettant le transport des molécules d'ARNi du noyau vers le cytoplasme. Dans un modèle de shRNAs dirigés contre un transcrit hépatique, la saturation de l'exportine-5 après injection de vecteurs AAV a conduit à la mort de l'animal ³⁶⁷. Une cytotoxicité a également été mise en évidence par expression de shRNAs sous contrôle d'un promoteur fort dans des lymphocytes, alors que la régulation de ce même shRNA au sein de la même population cellulaire sous un promoteur plus faible ne présentait aucune toxicité ³⁶⁸. Ces effets ont également été montrés dans le cerveau ³⁶⁹. En plus de l'Exportin-5, un deuxième niveau de compétition entre les molécules d'ARNi

exogènes et les miRNAs a récemment été observé pour le transport et l'incorporation des brins effecteurs dans les complexes RISC, étape notamment régulée par TRBP (trans-activation-responsive RNA-binding protein)³⁷⁰. Ces résultats ayant été observés avec des fortes concentrations de siRNAs transfectés ou issues de la maturation de shRNAs, les conditions de transduction des CSM devront donc être mises au point afin d'inhiber efficacement l'expression des chaînes mutées au profit d'une conformation fonctionnelle de la triple hélice de collagène de type I tout en évitant ces désagréments.

Enfin, la nature répétitive des transcrits codant les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I est une limite pour le choix de séquences antisens en général. C'est certainement pour cette raison que nous avons rencontré des difficultés lors du clonage des séquences ADN pour la production des shRNAs avec un protocole qui avait pourtant montré son efficacité auparavant. Afin de pallier cette difficulté, plusieurs équipes ont proposé de nouvelles stratégies pour inhiber efficacement l'expression du transcrit muté sans cibler la mutation impliquée dans l'apparition de la pathologie. Ces stratégies sont basées sur le polymorphisme des allèles de collagène induisant la présence d'un PNP (polymorphisme nucléotidique ponctuel) dans les régions non traduites des transcrits dont les séquences se prêtent plus facilement au dessin de séquences antisens³³⁵. Les travaux de Lindhal et al montrent une inhibition significative de l'expression du transcrit *COL1A2* après transfection transitoire de siRNA ciblant le PNP Cytosine / Thymine de l'exon 6 (PNP ID rs1800222). Parmi les 7 siRNAs testés, deux se sont révélés plus efficaces pour inhiber spécifiquement l'expression du transcrit muté : les siRNA dont le polymorphisme nucléotidique ponctuel lié à l'ARNm muté était situé en position 7 et 8 du brin antisens du siRNA³⁷¹.

L'ensemble de ces résultats décrits dans la bibliographie et notre propre étude montrent que quelque soit la stratégie visant à inhiber l'expression d'un transcrit muté (en ciblant la mutation elle-même ou un polymorphisme nucléotidique ponctuel) il est indispensable de tester plusieurs séquences de siRNA afin d'en identifier au moins une qui soit réellement efficace et spécifique.

CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALES

Seulement 10 ans après sa découverte chez le ver *Caenorabditis elegans*, l'ARN interférence s'est révélée être une approche prometteuse pour offrir une véritable plate-forme de développement de médicaments capable de générer des profits à différents niveaux. En effet, la stratégie d'utilisation de la machinerie de l'ARNi est rapidement devenue un outil thérapeutique efficace et applicable à un grand nombre de maladies. Ainsi le développement de ces molécules en thérapie vise à limiter l'étendue de pathologies infectieuses (virus, bactéries, parasites), génétiques associées à des mutations (épissage alternatif aberrant, mutation ponctuelle, mutation missense, polymorphisme nucléotidique ponctuel, fusion anormale de protéines) voire métaboliques (cancers). De plus, un certain nombre de cibles thérapeutiques potentielles, mises en évidence à partir des études génomiques ne pouvant être inhibées par des moyens traditionnels tels que les agents chimiques ou les molécules séquestrant des facteurs extracellulaires (anticorps, récepteurs solubles), pourraient l'être désormais grâce à cette stratégie. Les deux façons les plus courantes pour inhiber l'expression de ces cibles thérapeutiques dans les cellules de mammifères sont l'injection de siRNAs synthétiques exogènes ou l'introduction de « cassettes ADN » conduisant à la synthèse de molécules de types shRNAs.

Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi de tester les effets thérapeutiques potentiels de ces deux types de molécules que sont les siRNAs et les shRNAs dans deux pathologies osseuses rares, une tumeur osseuse primitive : l'ostéosarcome, et une pathologie génétique à caractère dominant : l'ostéogénèse imparfaite.

Nos résultats montrent que des injections locales de siRNAs dans le microenvironnement tumoral de l'ostéosarcome permettent d'inhiber significativement et spécifiquement l'expression de protéines telles que la luciférase (mise au point du protocole d'injection) ou la cytokine Rankl (cible d'intérêt thérapeutique). L'inhibition de l'expression de Rankl prévient les lésions ostéolytiques associées au développement tumoral et retarde la rechute liée à l'arrêt des traitements de chimiothérapie dans deux modèles murins distincts d'ostéosarcome. Jusqu'à présent utilisés pour cibler l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose ou le cycle cellulaire, les résultats obtenus dans notre étude montrent que les siRNAs peuvent également être utilisés pour cibler l'expression de protéines du microenvironnement de l'ostéosarcome. En effet, Rankl semble être exprimé par les

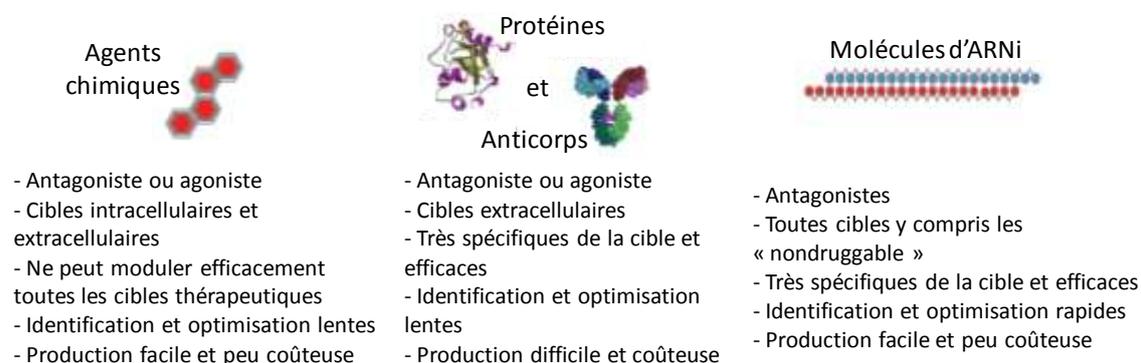


Figure 62 : Principales caractéristiques des deux classes d'agents pharmacologiques utilisés en clinique : les agents chimiques et les agents biologiques (protéines recombinantes et anticorps) comparées aux propriétés des molécules thérapeutiques dérivées de l'ARNi. D'après la revue de Bumcrot et al, ³⁵.

cellules tumorales elles-mêmes mais également par les cellules stromales et lymphocytaires.

Les molécules de siRNAs permettent également d'inhiber efficacement l'expression d'un transcrit muté. En effet, dans notre modèle d'étude de l'ostéogenèse imparfaite nous avons identifié et validé deux séquences capables d'inhiber efficacement l'expression du transcrit *Col1a1* muté tout en préservant l'expression de l'ARNm sauvage ne différant que de 2 nucléotides. Cette étude est la première à montrer la faisabilité d'une telle stratégie pour cette pathologie. Cependant, de nouvelles investigations doivent être menées sur des transcrits *Col1a1* mutés ne différant que d'un seul nucléotide avec la séquence codant la protéine sauvage.

Le nombre croissant d'études précliniques et cliniques ainsi que les présents résultats obtenus ne font que renforcer la puissance de ce nouvel outil thérapeutique, laissant entrevoir un développement clinique à grande échelle des molécules de siRNAs et shRNAs thérapeutiques. L'utilisation de ce type de molécules présente certains avantages par rapport aux molécules déjà utilisées en thérapie comme les molécules chimiques ou les anticorps (Zometa® et Denosumab® dans le cadre de l'ostéosarcome). Leur principal avantage est la possibilité de cibler n'importe quel transcrit au sein de la cellule offrant ainsi de nouvelles opportunités d'inhibition de protéines pour lesquelles aucun agent chimique, ou anticorps dans le cas d'une molécule extracellulaire, n'est connu. De plus, l'identification et le développement pharmacologique des molécules d'ARNi est plus rapide que celui des agents chimiques, des anticorps et des protéines recombinantes (respectivement 2-3 années contre 4-6 à partir de la preuve de concept). Un obstacle supplémentaire à l'utilisation des molécules de séquestration que sont les anticorps et les protéines recombinantes reste leur production qui est en règle générale très coûteuse. A l'inverse, les siRNAs sont faciles et rapides à produire par simple association de nucléotides et ce à grande échelle. Cette synthèse chimique permet également de s'affranchir des aspects de contrôle de conformation indispensables pour la production de protéines thérapeutiques. L'ensemble de ces données sont résumées dans la figure 62 ci-contre.

Cependant, avant d'envisager une application de telles stratégies en clinique à grande échelle, il est nécessaire d'optimiser les protocoles d'administration des molécules d'ARNi pour une utilisation efficace et sans danger pour le patient. Le facteur déterminant est l'adressage des molécules d'ARN interférence au tissu et/ou cellules productrices du transcrite cible. Un certain nombre de méthodes de transport des siRNAs et des shRNAs sont désormais disponibles possédant chacune des avantages et des inconvénients. Aucun de ces agents n'est considéré à l'heure actuelle comme le plus adapté à une administration de ce type de molécules thérapeutiques chez l'Homme. Cependant, le choix de l'une ou l'autre de ces méthodes dépend en grande partie de la pathologie concernée et de la cible cellulaire et transcriptionnelle.

En ce qui concerne les maladies génétiques à caractère dominant (comme l'ostéogénèse imparfaite), de par leur caractère chronique, le traitement de ces pathologies par les molécules d'ARNi ciblant l'expression d'un transcrite muté nécessite une production stable de siRNAs thérapeutiques. C'est pourquoi nous avons produit dans notre étude des particules lentivirales « codant » les shRNAs correspondants aux siRNAs validés pour une modification stable de cellules souches mésenchymateuses en vue d'une allogreffe. Du fait que les mutations diffèrent d'un patient à l'autre, une stratégie de traitement avec ces particules lentivirales requiert une conception personnalisée des molécules de shRNA. En effet, il sera nécessaire de :

- tester plusieurs séquences ciblant le transcrite muté : en ciblant la mutation elle-même ou un polymorphisme nucléotidique ponctuel (PNP) associé à l'allèle muté. Le ciblage des PNP dans les régions non traduites permettrait de s'affranchir des difficultés de conception de siRNAs spécifiques dans des régions présentant une forte répétitivité des bases, répétition caractéristique des parties codantes des transcrits *COL1A1* et *COL1A2*.
- d'utiliser un protocole reproductible de clonage des séquences de shRNA correspondantes. Le protocole utilisé dans le cadre de notre étude a permis d'améliorer significativement le pourcentage d'efficacité du clonage et pourrait être utilisé en routine dans une application clinique
- de produire en quantité suffisante des particules lentivirales, étape déjà validée dans un protocole clinique d'utilisation de lentivirus en thérapie génique de d'adrénoleucodystrophie liée à l'X (voir paragraphe 4.2 du chapitre 3 des résultats).

- de modifier *ex vivo* des cellules souches mésenchymateuses et de tester l'efficacité de cette modification.

Dans un contexte d'injection de siRNAs *in vivo* comme c'est le cas pour la stratégie proposée dans l'ostéosarcome, la voie d'administration locale a permis d'inhiber significativement l'expression de Rankl dans le microenvironnement tumoral. Cette voie d'injection est utile pour faire la preuve de concept en préclinique mais inadaptée au traitement de patient. En effet, elle nécessite que la tumeur soit clairement localisée et accessible et ne permet pas de prévenir le développement de micrométastases dans un second site osseux. C'est pourquoi le succès clinique de l'injection de siRNAs chez l'Homme passe par le développement de protocoles efficaces d'administration de ces molécules par voie systémique. Cependant, cette optimisation est plus compliquée. En effet, contrairement à la modification de cellules *ex vivo*, les notions de stabilité et de toxicité dans le sang et d'adressage des siRNAs jusqu'aux cellules et/ou tissu cible sont à prendre en compte. La stratégie la plus attractive à l'heure actuelle repose sur le transport des siRNAs par des vecteurs de transfert de gène et l'utilisation de ligands spécifiques présents à leur surface. Les cellules d'ostéosarcome n'expriment aucune protéine extracellulaire qui leur est caractéristique ce qui rend le ciblage de ces cellules particulièrement difficile. De plus, les cellules tumorales ne constituent pas la source unique de Rankl dans le microenvironnement. Cependant ces tumeurs surexpriment des intégrines de type $\alpha\beta3$ capables de reconnaître des séquences RGD. Ainsi dans le cadre bien précis des sarcomes osseux, la complexation des siRNAs ciblant RANKL dans des liposomes modifiés pour présenter des peptides RGD permettrait de potentialiser l'effet des molécules effectrices sur le site thérapeutique.

Cet adressage des siRNAs et/ ou shRNAs au tissu cible permet également de limiter les effets d'inhibition de la protéine ciblée en dehors du site thérapeutique. RANKL étant impliqué dans les fonctions immunitaires et vasculaires, son inhibition excessive et systémique entraînerait des effets délétères. L'adressage permet également de réduire les doses et la fréquence des injections des complexes siRNA/vecteurs. Cette diminution est d'autant plus importante qu'elle permet de diminuer les effets néfastes des molécules thérapeutiques d'ARNi via la sécrétion d'interféron ou l'altération des fonctions des miRNAs endogènes. En effet, ces molécules exogènes peuvent altérer le mécanisme naturel de l'ARNi par saturation de l'exportine-5 pour les shRNAs ou saturation des complexes RISC, conduisant à une certaine toxicité de ces molécules.

Enfin, il est important de noter que l'utilisation des molécules d'ARNi en clinique se limite à des pathologies dont la cause est une expression ou une surexpression d'une protéine « pathologique », ou encore la présence d'un organisme exogène. En effet, les siRNAs et les shRNAs auront un bénéfice thérapeutique uniquement dans des situations nécessitant une inhibition d'expression d'une protéine donnée. De plus, malgré le fait que tous les transcrits cellulaires pourraient être la cible de ces agents thérapeutiques d'inhibition post-transcriptionnelle, en pratique, certains sont plus difficiles à inhiber que d'autres. La conception des siRNAs est une étape cruciale dans le développement de ces molécules. Malgré le développement d'algorithmes aidant au dessin de séquences de siRNAs, l'étape préliminaire de validation expérimentale de l'efficacité de ces séquences afin d'identifier « la séquence » la plus à même de pouvoir inhiber le transcrit ciblé, reste nécessaire et indispensable.

ANNEXES

Annexe 1

Innocuité des greffes autologues de graisse, cellules souches mésenchymateuses et rechute d'un ostéosarcome.

Pierre Perrot, Julie Rousseau, Anne-Laure Bouffaut, Françoise Rédini, Elisabeth Cassagnau, Frédéric Deschaseaux, Marie-Françoise Heymann, Dominique Heymann, Franck Duteille, Valérie Trichet et François Gouin

Résumé :

L'ostéosarcome est la tumeur primitive maligne la plus fréquente chez l'adulte jeune, dont le traitement actuel associe chimiothérapie néo-adjuvante, résection chirurgicale et polychimiothérapie adjuvante. Pour la correction de pertes de substances tissulaires consécutives à une intervention chirurgicale ou l'exérèse d'une tumeur, des greffes de tissu adipeux ont été proposées par Coleman en chirurgie plastique et reconstructrice. Nous rapportons ici un cas clinique de récurrence locale tardive d'ostéosarcome survenue 13 ans après la prise en charge initiale et 18 mois après des procédures de Coleman. Cette récurrence était complètement inattendue, ce qui nous a conduit à mettre en place des expérimentations afin d'étudier les interactions entre les tumeurs ostéosarcomateuses et ces injections de graisse riche en cellules souches mésenchymateuses. Les résultats obtenus dans des modèles pré-cliniques d'ostéosarcome ont montré que les injections de graisse ou de cellules progénitrices avaient un effet pro-tumoral. Ce cas clinique et ces résultats expérimentaux posent la question de l'innocuité du lipomodélage en chirurgie reconstructrice, dans un contexte post-tumoral.

NB : à suivre la publication complète

Safety Concern between Autologous Fat Graft, Mesenchymal Stem Cell and Osteosarcoma Recurrence

Pierre Perrot^{1,2,3}, Julie Rousseau^{1,2}, Anne-Laure Bouffaut^{1,2,3}, Françoise Rédini^{1,2}, Elisabeth Cassagnau⁴, Frédéric Deschaseaux⁵, Marie-Françoise Heymann^{1,2,4}, Dominique Heymann^{1,2}, Franck Duteille^{1,2,3}, Valérie Trichet^{1,2}, François Gouin^{1,2,6*}

1 INSERM, U957, Nantes, France, **2** Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, France, **3** Centre Hospitalier Universitaire, Service de Chirurgie Plastique et des Brûlés, Nantes, France, **4** Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Anatomie Pathologique, Nantes, France, **5** Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, EA3855, Tours, France, **6** Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Orthopédie-Traumatologie, Pôle Ostéo-articulaire, Nantes, France

Abstract

Background: Osteosarcoma is the most common malignant primary bone tumour in young adult treated by neo adjuvant chemotherapy, surgical tumor removal and adjuvant multidrug chemotherapy. For correction of soft tissue defect consecutive to surgery and/or tumor treatment, autologous fat graft has been proposed in plastic and reconstructive surgery.

Principal Findings: We report here a case of a late local recurrence of osteosarcoma which occurred 13 years after the initial pathology and 18 months after a lipofilling procedure. Because such recurrence was highly unexpected, we investigated the possible relationship of tumor growth with fat injections and with mesenchymal stem/stromal cell like cells which are largely found in fatty tissue. Results obtained in osteosarcoma pre-clinical models show that fat grafts or progenitor cells promoted tumor growth.

Significance: These observations and results raise the question of whether autologous fat grafting is a safe reconstructive procedure in a known post neoplastic context.

Citation: Perrot P, Rousseau J, Bouffaut A-L, Rédini F, Cassagnau E, et al. (2010) Safety Concern between Autologous Fat Graft, Mesenchymal Stem Cell and Osteosarcoma Recurrence. PLoS ONE 5(6): e10999. doi:10.1371/journal.pone.0010999

Editor: Peter McCulloch, University of Oxford, United Kingdom

Received: October 9, 2009; **Accepted:** May 14, 2010; **Published:** June 8, 2010

Copyright: © 2010 Perrot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fondation pour l'Avenir de la Recherche Médicale Appliquée (study ET 8-486, Paris, France), Ligue contre le cancer/ Canceropole Grand Ouest/Regions Bretagne, Centre, Pays de la Loire, Poitou-Charentes (convention DAFCG/7506, Nantes, France). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: francois.gouin@chu-nantes.fr

Introduction

In plastic and reconstructive surgery, autologous fat grafting enables soft tissue augmentation and is increasingly used for cosmetic indications but also for correction of defect following tumor treatment. This procedure proposed by Coleman was applied first for facial remodelling and more recently for breast augmentation [1,2]. This lipofilling procedure is usually considered as a safe procedure and does not require a permit application. Indeed it consists of autologous tissue injection in a site of defect, directly after harvesting without *ex vivo* expansion.

The only safety concern which was predicted in 1987 by the American Society of Plastic and Reconstructive Surgeons was that fat grafting may compromise breast cancer detection by inducing microcalcifications. In fact a recent clinical study has demonstrated that previous breast augmentation leads to difficulties for breast cancer detection and for tumor management and reconstruction procedure [3]. Concerning breast reconstruction after mastectomy, fat injection seems to be accepted, but it remains controversial to treat cosmetic sequelae after conservative breast surgical treatment [4,5]. Indeed one safety question

concerns the potential risk of recurrence caused by fat injection side effect, but this question remains unanswered for breast cancer as relapse incidence is already high for certain groups of patients.

In contrast, late local recurrence is an unexpected event after complete remission of an osteosarcoma. Only 5% of patients with recurrent disease have local recurrence and such event occurs at a median time ranging from 6 to 28 months as reported by Ferrari *et al.* [6]. Additionally these authors have observed a disease free survival of 46% stable from the 8th to 12th year. In another study, Meyers *et al.* have found the latest recurrence at the 9th year [7]. Bielack *et al.* have only reported 2 cases of late relapse over the 204 patients followed during 10 years; both were distant relapses with no local recurrence [8]. In fact, late local recurrence (after 15 to 20 years) has only been reported for low grade parosteal osteosarcoma subtype [9].

Here we report an unexpected local osteosarcoma relapse which occurred at the exact site of autologous fat grafts in a female patient who did not present any predictive factor of local recurrence. Previous experimental osteosarcoma models have been widely used to set up new therapeutic protocols and to

understand the interactions between osteosarcomas and their environment [10,11,12]. In this study, pre-clinical experiments were set up using a human osteosarcoma model induced in athymic nude mice to determine whether tumor growth may be modified by fat grafts. Because we observed that tumor growth was promoted by fat injection, we investigated the role of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs), as fat tissue is a well-known source of MSC-like cells whose implication in cancer is controversial.

Materials and Methods

Ethics statement

- A surplus of human adipose tissue was used to isolate human mesenchymal stem cells and for injection in mice. This fat surplus was obtained from a female patient in the course of an aesthetic abdominal liposuction. The oral consent of the patient was obtained for the use of fat sample for research. A written consent was not necessary because it was anonymized unlinked research in accordance with French law (Art. L. 1245-2 du code de la santé publique, Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 Journal Officiel du 7 août 2004).

- All research involving animals were conducted following the guidelines (named "Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale") of the French ethical committee (named "Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale") and have been approved by the committee named CEEA.PdL.06.

Coleman's procedure

Coleman's procedure was performed over one female patient under general anesthesia [1]. The fat donor site was the abdominal subcutaneous tissues. The fat was taken using a cannula connected to a 10 ml Luer-Lock syringe. A steel stopper device helped to maintain the vacuum in the syringe during the aspiration phase. The sampling syringes were sealed and centrifuged at 3000 rpm for 3 min. After centrifugation the sample was separated into 3 layers: the upper yellow layer composed of oil from destruction of fat fragment, the middle layer composed of the adipose tissue graft and the bottom one composed of blood. The top and bottom layers were discarded and fatty tissue is injected through 1-mm incisions in subcutaneous and muscle tissue to obtain a filling effect.

Cell culture

SaOS2 cell line. The human osteosarcoma cell line SaOS2 was initially derived from an 11-year old Caucasian girl [13]. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Biowhittaker, Verviers, Belgium) with 1% antibiotic mixture (Penicillin 100 U/ml and Streptomycin 100 mg/l; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Dominique Dutscher, Brumath, France), at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂/95% air). The cells were harvested at confluence with trypsin (0.5 g/l)/EDTA (0.2 g/l) (Cambrex Bio Sciences, Verviers, Belgium).

POS-1 cells. The murine osteosarcoma cell line POS-1, derived from osteosarcoma which spontaneously developed in C3H/HeN mice was kindly provided from Kanagawa Cancer Center (Kanagawa, Japan [14]). The cells were cultured in RPMI 1640 medium (Biowhittaker, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FBS, at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂/95% air). The cells were harvested at confluence with trypsin (0.5 g/l)/EDTA (0.2 g/l).

C3H10T1/2 MSCs. These cells were originally derived from C3H/HeN mouse embryos and were purchased from the American Type Culture Collection (CCL-226, Manassas, VA, USA). They represent a model of murine MSCs, able to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteoblasts [15]. They were cultured in alpha-MEM (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) with 10% FBS.

Co-culture. Thirty thousands osteosarcoma POS-1 cells were seeded in 24 well-plates with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS. Murine C3H10T1/2 MSCs (15 000) were seeded in BD Falcon Cell Culture Insert (pore size 3 microns, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) with alpha-MEM supplemented with 10% FBS. One day after cell seeding, the murine MSCs were incubated with POS-1 cells with RPMI 1640 medium supplemented with 5% FBS. A trypan blue cell counting was then performed on POS-1 cells 24 and 72 hours later.

Isolation and characterization of human MSCs from adipose tissue

Human fat sample was obtained from one female patient in the course of an aesthetic abdominal liposuction with her informed consent for the use for anonymized unlinked research. The donor had no significant medical history. Fat was removed using the Coleman's procedure and 200 µl of centrifuged fat were plated in 25 cm² flask in 5 ml of alpha-MEM supplemented with 0.5 ml of FBS and 0.05 ml of antibiotics (Penicillin 100 U/ml and Streptomycin 100 mg/l; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). To remove non adherent cells, the cells were washed after 24 hours three times and then supplemented with fresh medium. For phenotypic characterization, surface antigen markers were analyzed by flow cytometry on MSCs. Cells were washed twice with phosphate-buffered solution (PBS) containing 0.4% bovine serum albumin (BSA) before staining with the following antibodies: FITC-conjugated anti-CD90 (Biosciences, Erembodegem, Belgium), PE-conjugated anti-CD105, FITC-conjugated anti-CD34 and PE-conjugated anti-CD45 (Biolegend, San Diego, CA, USA).

Differentiation potential assessment. After expansion, the cells were seeded into chamber slides (LabTek, Nunc) and stimulated by osteogenic, adipogenic and vascular smooth muscle inducing media. Osteogenic medium consisted of alpha-MEM medium complemented by 10% FBS, 50 µg/ml freshly prepared ascorbic acid (Sigma, Saint-Quentin, Fallavier, France), 10 mM sodium-beta-glycerophosphate (Sigma) and 300 ng/ml recombinant human BMP4 (RnD systems, Lille, France). The cells were cultured three weeks and then mineralization was assessed by using alizarin red and von Kossa staining [16]. After extensive washing, cells were observed under light microscopy. Adipogenic medium consisted of 1×10⁻⁶ M dexamethasone and 0.5 mM isobutylmethylxanthin (IBMX, Sigma). The vascular smooth muscle fate was obtained by adding 20 ng/ml TGFβ1. Nile Red-Oil (Sigma) was used to stained lipid droplets. Monoclonal antibodies recognizing SM-α actin (clone 1A4, Sigma), SM-α actinin (clone 1E12, Developmental Studies Hybridoma Bank, university of Iowa), SM22α (clone 10H12, Novocastra) and SM myosin heavy chain (clone hsmv, Sigma) were used.

Histological analyses

Surgical specimens were fixed in 10% buffered formaldehyde and after embedding in paraffin, 5 µm-thick sections were stained with haematoxylin-eosin-safran solution. For presence of neutral lipids, osteosarcoma specimens were frozen and sliced into 5 µm-thick sections. Sections were fixed with 10% paraformaldehyde, then rinsed in distilled water, washed in 60% isopropanol and finally stained with Oil Red O solution (3 g/l).

In vivo experiments

Human osteosarcoma model in nude mice. Four-week-old female athymic mice (NMRI nu/nu; Elevages Janvier, Le Genest St Isle, France) were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France) following the guidelines of the French ethical committee (CEEA.PdL.06). The mice were anesthetized by inhalation of an isoflurane-air mix (2%, 1 l/min) before any surgical manipulation. Human osteosarcoma SaOS2 cells were injected in the tibial anterior muscle (8×10^6 cells in 50 μ L PBS) of athymic mice to induce a primary tumor. Then fragments (0.02 g) of this primary tumor were transplanted next to the tibia of mice of the same athymic strain to induce osteosarcoma development [11]. Eight days after fragment transplantation, tumors were detected. Then they were either injected with 100 μ l of fat harvested from one female patient following the Coleman's procedure or injured with empty cannula. The tumor volume was calculated by the measure of 2 perpendicular diameters with a vernier caliper and calculated with the formula $(l^2 \times L)/2$ where l and L represent respectively the smallest and the largest diameter.

Mouse osteosarcoma model in C3H/HeN mice. Four-week-old male C3H/HeN mice (Elevages Janvier) were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit as described above. Subcutaneous injections of POS-1 cells (2×10^6) were performed in the hind footpad of the mice. In some experiments, POS-1 cells were co-injected with C3H10T1/2 MSCs at the ratio 2/1. The tumor volume was calculated as described above.

Results

Case report

A 17 year-old girl was admitted in our institution in August 1994 with a metaphyso-epiphyseal bone tumor of the proximal humerus. An incisional biopsy made the diagnosis of telangiectasic osteosarcoma (Fig. 1A), in conformity with clinical and radiolog-

ical features. The patient received pre operative chemotherapy in respect to french protocol at this time (4 cures of Holoxan/cis platinumium). Then a limb-salvage procedure consisting of an extra articular resection of proximal humerus with gleno-humeral articulation was performed. The reconstruction consisted of an arthrodesis with a vascularised scapular crest bone graft. The histopathologic examination of the specimen concluded of clear wide margins and no viable cells have been found out (good response, Huvos grade 4). The patient received two more cures of the same chemotherapeutic protocol. She has been continuously follow-up every 6 months for 5 years then every year [Magnetic Resonance Imaging (MRI) and chest X ray] until now.

In 2005, because of the unsightly appearance of her left arm due to resection of soft tissue and mainly deltoid muscle (Fig. 1B), she was referred to a reconstructive surgeon of our institution and received three autologous fat grafts harvested from her abdominal wall and injected circularly around the bone graft in soft tissues (March 2005, June 2005 and January 2006). The patient reported a good cosmetic result with a lasting increased volume of the arm.

In August 2007, she consulted her oncologist because of pain, inflammation and swelling at the lipofilling site (Fig. 2A). The Magnetic Resonance Imaging (MRI) showed an extensive soft tissue tumor (Fig. 2B). Histological analysis of the biopsy revealed an osteosarcoma with neoplastic cells and thin osteoid formation (Fig. 2C). No lipid droplets have been observed after Oil Red O staining of the biopsy. No distant relapses have been found out. The patient received again 4 cures of chemotherapy (API-AI French protocol) and a trans scapula amputation was performed (Fig. 2D). Tumor cells still responded well to chemotherapy (Huvos grade 3) and no post operative chemotherapy was proposed because of severe renal deficiency after pre operative chemotherapy. Despite the high rate of necrosis, the pathologist was able to see wide area of haemorrhage compatible with telangiectasic subtype (Fig. 2E). One year after the surgery the patient does not present any sign of local or distant relapse.

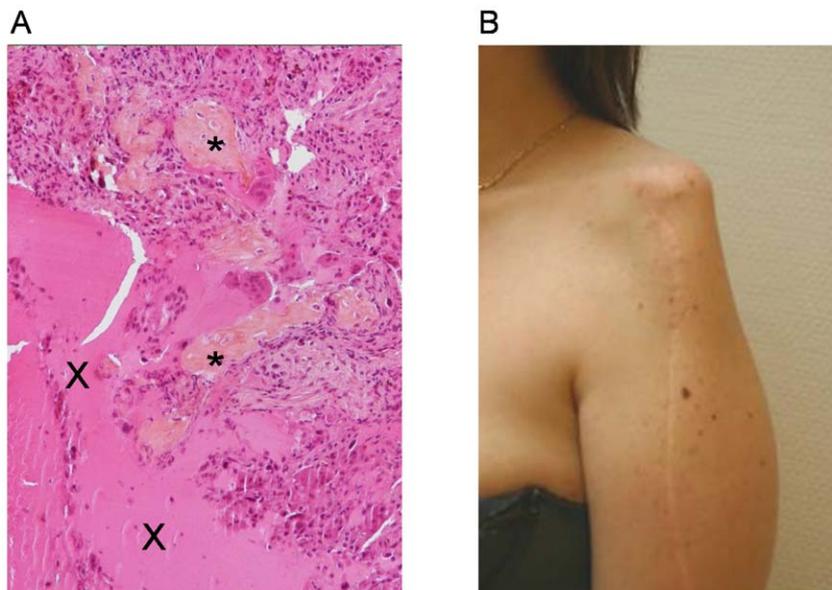


Figure 1. Telangiectasic osteosarcoma and post surgical defect. (A) Photomicrograph of the initial telangiectasic osteosarcoma showing proliferation of neoplastic cells, focal osteoid formation (*) and telangiectasic space containing blood (X) (optical microscopy, HES staining, $\times 100$). (B) Post-surgical defect of the left arm in January 2005, 2 months before the first lipofilling procedure. doi:10.1371/journal.pone.0010999.g001

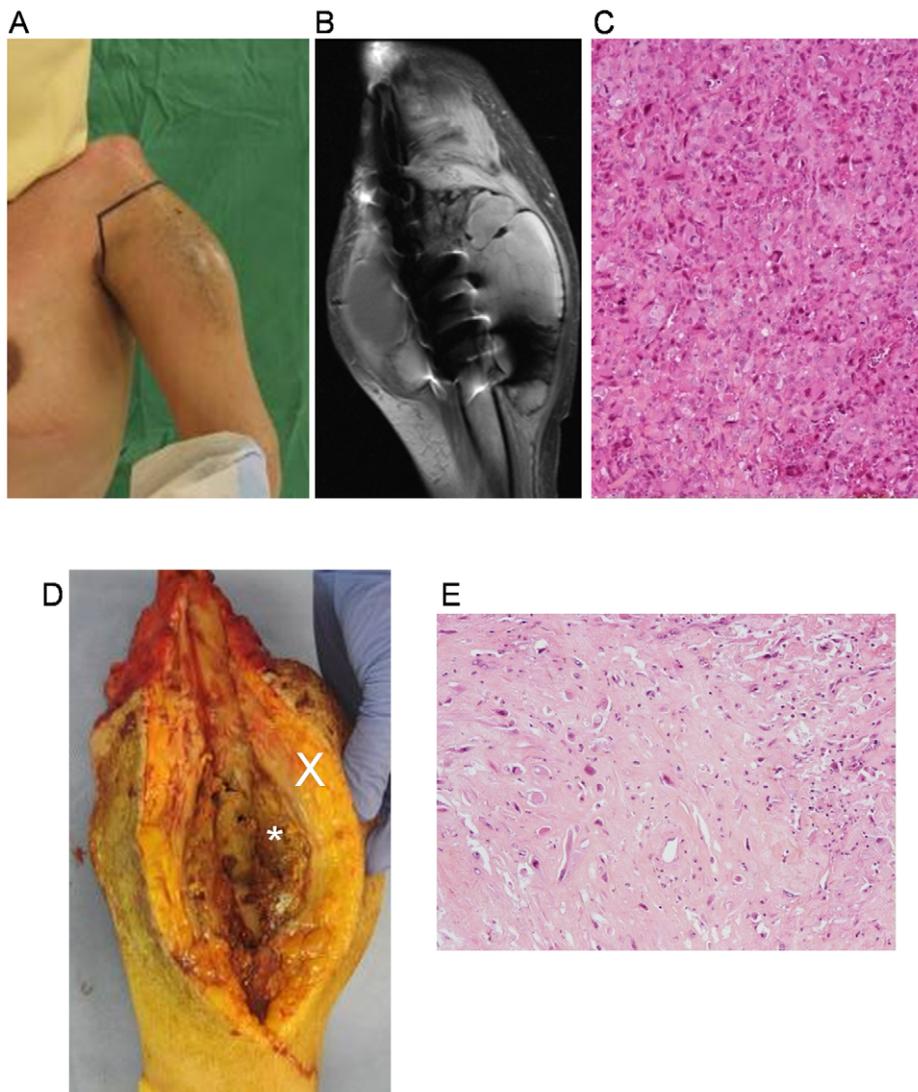


Figure 2. Osteosarcoma recurrence at the lipofilling site. (A) Inflammatory and swelling of the lipofilling site at the left arm after 4 cures of chemotherapy. (B) T2 weighted MRI shows extensive circular soft tissue tumor of the left arm, measuring 12 cm by 10 cm. (C) Photomicrograph of the biopsy specimen at the recurrent tumor site showing high grade malignant cell proliferation and thin osteoid formation (optical microscopy, HES staining, $\times 100$). (D) Photograph of the open resected tumor with tumor mass (*) around the left humerus diaphysis and peripheral fat engraftment (X) (E) Histology of resected tumor specimen (optical microscopy, HES staining, $\times 100$).
doi:10.1371/journal.pone.0010999.g002

Osteosarcoma growth is increased by fat injection

As a result of this surprising clinical case, we wondered whether fat graft was the cause of the local late osteosarcoma recurrence. In a first attempt to test this hypothesis, we tested whether a fat sample which is used for an autologous fat graft can modify the growth of human osteosarcoma induced in immunodeficient mice. First, athymic nude mice were injected with human SaOS2 osteosarcoma cells in muscle leading to tumor development in less than 50% of mice. To obtain a greater bone tumor incidence, fragments of a primary tumor induced by SaOS2 cell injection were transplanted next to the tibia of recipient mice of the same strain. Twenty one mice were transplanted with human osteosarcoma fragments of the same weight, then were divided into 3 groups: the control SaOS2 group just received tumor fragment at day 0; the SaOS2 + fat group was injected with human fat into the tumor site at day 8 after transplantation when a progressive tumor was detected (size $>100 \text{ mm}^3$); the SaOS2 + cannula group was

transplanted with tumor fragment at day 0, then at day 8 the tumors were injured with an empty cannula to reproduce potential inflammatory process; and a group of three mice was injected only with human fat in the tibial muscle. Results of tumor progression are shown in figure 3. In the control SaOS2 group, osteosarcoma developed rapidly reaching a mean volume of 1393 mm^3 23 days after tumor implantation (Fig. 3A). Tumor growth was greatly and significantly increased at day 21 after tumor induction in the group that received fat injections (Fig. 3B). As the fat injection was realized with a cannula which may have induced inflammation, a group of injured osteosarcoma was studied in the same conditions. In this case, the inflammation caused by cannula injury did not change osteosarcoma growth as compared to the control SaOS2 group with uninjured osteosarcoma (Fig. 3C). The tumor size increase observed in the SaOS2 + fat group was not due to the fat mass itself as only reduced and stable volumes (less than 200 mm^3) were observed with fat injections alone into naive control mice

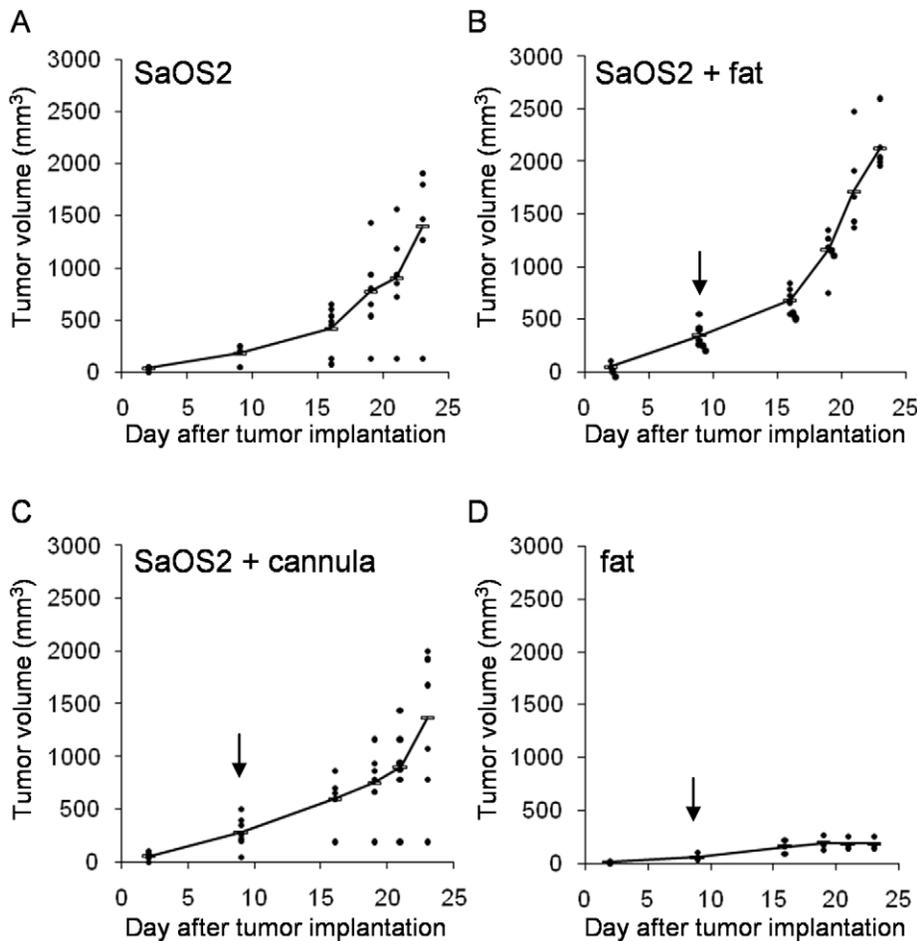


Figure 3. Fat injections into osteosarcoma induced in nude mice. (A) Six mice were considered as control tumors (SaOS2). (B) A group of 6 mice was injected at the tumor site with human fat harvested by the Coleman's technique (SaOS2 + fat). (C) A control group of 6 mice was injured with empty cannula at the tumor site. (D) Another group of 3 mice received the fat alone. Arrows indicate day 8 after transplantation when fat injections or cannula injuries were performed. Statistical analyses were calculated with the Kruskal-Wallis test (nonparametric ANOVA) using GraphPad InStat v3.02 software. The p value was less than 0.05 for SaOS2 + fat versus SaOS2 alone or versus SaOS2 + cannula at day 21, but was not significant for SaOS2 alone versus SaOS2 + cannula. doi:10.1371/journal.pone.0010999.g003

(Fig. 3D). Moreover, we could observe that animals which received fat grafts in osteosarcoma tumors were more homogeneous in their tumor progression as compared with control groups (SaOS2 and SaOS2 + cannula).

Histological analyses revealed few but large adipocytes between the neoplastic cells for tumor specimens of the SaOS2 + fat group (Fig. 4A), whereas only small adipocytes were identified within fibrotic areas and not between neoplastic cells within tumor specimens of the SaOS2 + cannula group (Fig. 4B) or control SaOS2 group (data not shown). The proportion of these large adipocytes seems too small to explain the tumor size increase which was observed in the SaOS2 + fat group. Then we may hypothesize that fat injections have stimulated osteosarcoma cell proliferation.

MSC-like cells are present in the injected fatty tissue

One hypothesis for the stimulation of osteosarcoma growth by fat injection may lie to the presence of MSCs in the injected fatty tissue. An aliquot of the fat tissue which was injected into SaOS2-bearing mice was tested in culture for the presence of adherent cells. Such cells were obtained and analyzed by flow cytometry. At passage 3,

these cells were positive for the MSC markers CD105 and CD90 (Fig. 5A) and simultaneously negative for the hematopoietic markers CD45 and CD34 (data not shown). Moreover, these cells differentiated into the osteoblastic and adipocytic cells as well as muscle cells from vascular smooth muscle lineage as shown in figure 5. Indeed, according to the type of induction the presence of mineralized nodules was identified by either von Kossa or alizarin red staining and adipocytes by their content in lipid droplets positives labelled by Nil Red-Oil. In addition, MSC-like cells were able to give rise vascular smooth muscle (VSM) cells since expression of cytoskeletal molecules specific of VSM lineage such as SM22 α , SM myosin heavy chain, SM- α actin and SM- α actinin increased dramatically after VSM induction. Therefore, adherent cells-derived from fat had characteristics similar to what it is largely described for bone marrow MSC [17].

After passage 8, these MSC-like cells were injected in three mice and the three intramuscular injections of two million cells per mouse did not induce tumor development after 60 days. These fat-derived cells maintained long-term self-renewal (>20 passages), but they have lost the CD105 expression as early as passage 6 showing rapid phenotypic change in culture.

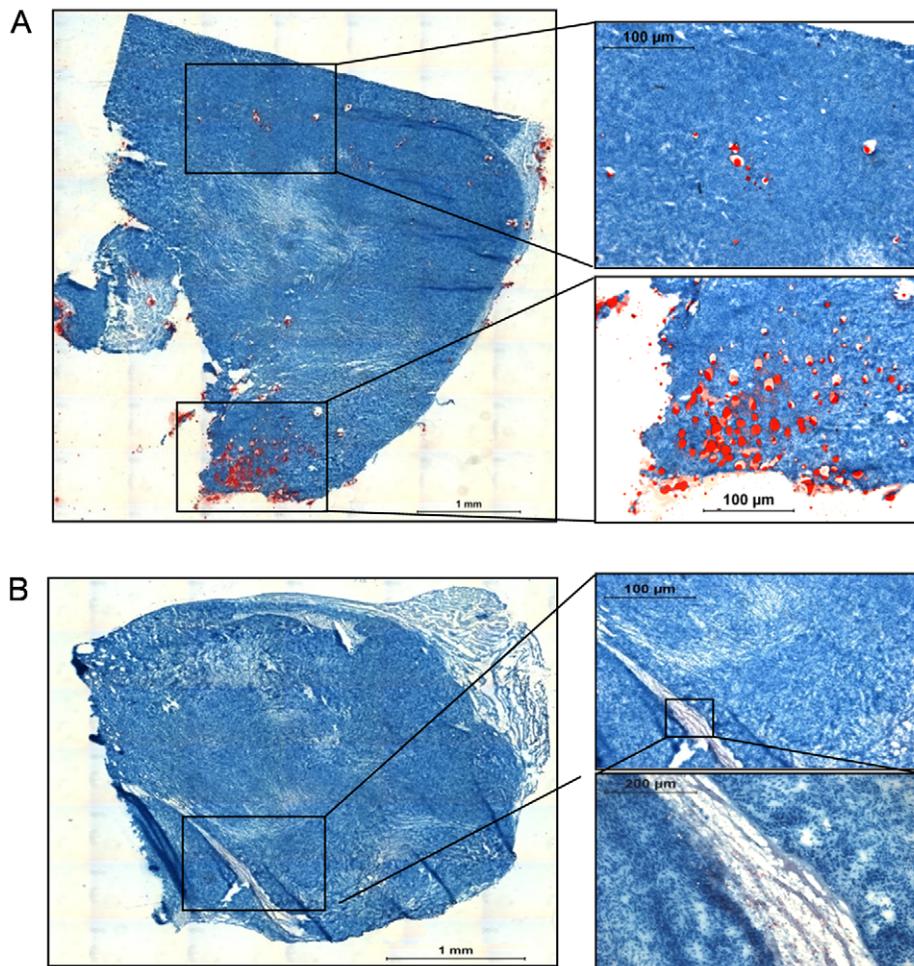


Figure 4. Identification of lipid droplets in osteosarcoma specimens. (A) Photomicrograph of a tumor specimen from the SaOS2 + fat group showing large red lipid droplets. (B) Photomicrograph of a tumor specimen from the SaOS2 + cannula group showing small red lipid droplets (optical microscopy, Oil Red O staining).

doi:10.1371/journal.pone.0010999.g004

Injections of MSCs with osteosarcoma cells increase tumor progression

To determine whether MSCs can interact with osteosarcoma cells and may modulate the early tumor development, we compared the tumor progression induced in mice by injection of osteosarcoma cells alone or with MSCs. For this experiment, we tested mouse osteosarcoma POS-1 cells rather than human SaOS2 cells because their injection in mouse footpad led to a greater tumor incidence (80% versus 50%). The POS-1 cells and C3H10T1/2 MSCs have been derived from the C3H/HeN mouse strain, allowing us to perform this experiment in a syngenic immunocompetent model. Eighteen C3H/HeN mice were divided into 3 groups: one control group was injected with 2×10^6 osteosarcoma POS-1 cells (POS-1 group); a second control group received 10^6 C3H10T1/2 cells (C3H10T1/2 MSC group); and mice in the test group were co-injected with POS-1 and C3H10T1/2 cells at the above mentioned concentrations (POS-1 + C3H10T1/2 MSC). Results of individual tumor progression showed a disparity in the time course of tumor onset in the POS-1 group (Fig. 6A): 5 animals out of 6 developing a tumor at different time (from day 15 to 32). On the contrary, all the animals in the POS-1 + C3H10T1/2 MSC group developed a tumor early after cell injection (around day 10) with the same time

of onset (Fig. 6A); while MSCs alone did not induce any tumor development (data not shown). The tumor development appeared earlier and more homogeneously in the POS-1 + C3H10T1/2 MSC group than in the POS-1 group. The median tumor volume was three times higher in the POS-1 + C3H10T1/2 MSC group than the one in the POS-1 group at day 19 (775 versus 218.5 mm^3) and the difference was very significant ($p = 0.0076$ with Mann-Whitney test using GraphPad InStat v3.02 software). Similar results were obtained using a co-injection of rat MSC-like cells and rat osteosarcoma cells in the footpad of nude mice: earlier onset and faster growth of tumors as compared to osteosarcoma cells injected alone (Figure S1A).

We wondered whether MSCs may change the proliferation rate of osteosarcoma cells. Then C3H10T1/2 MSCs and POS-1 cells were co-cultured *in vitro* at a 1:2 ratio without cell contact. The number of blue stained POS-1 cells did not change when comparing co-cultured and cultured alone POS-1 cells; whereas the number of POS-1 live cells was significantly increased when co-cultured with C3H10T1/2 MSCs as compared to POS-1 cultured alone (Fig. 6B). Similarly the proliferation of rat osteosarcoma cells (OSRGA) was increased when co-cultured with rat MSC-like cells under same experimental conditions as described above (Figure S1B). Therefore MSC-like cells secreted

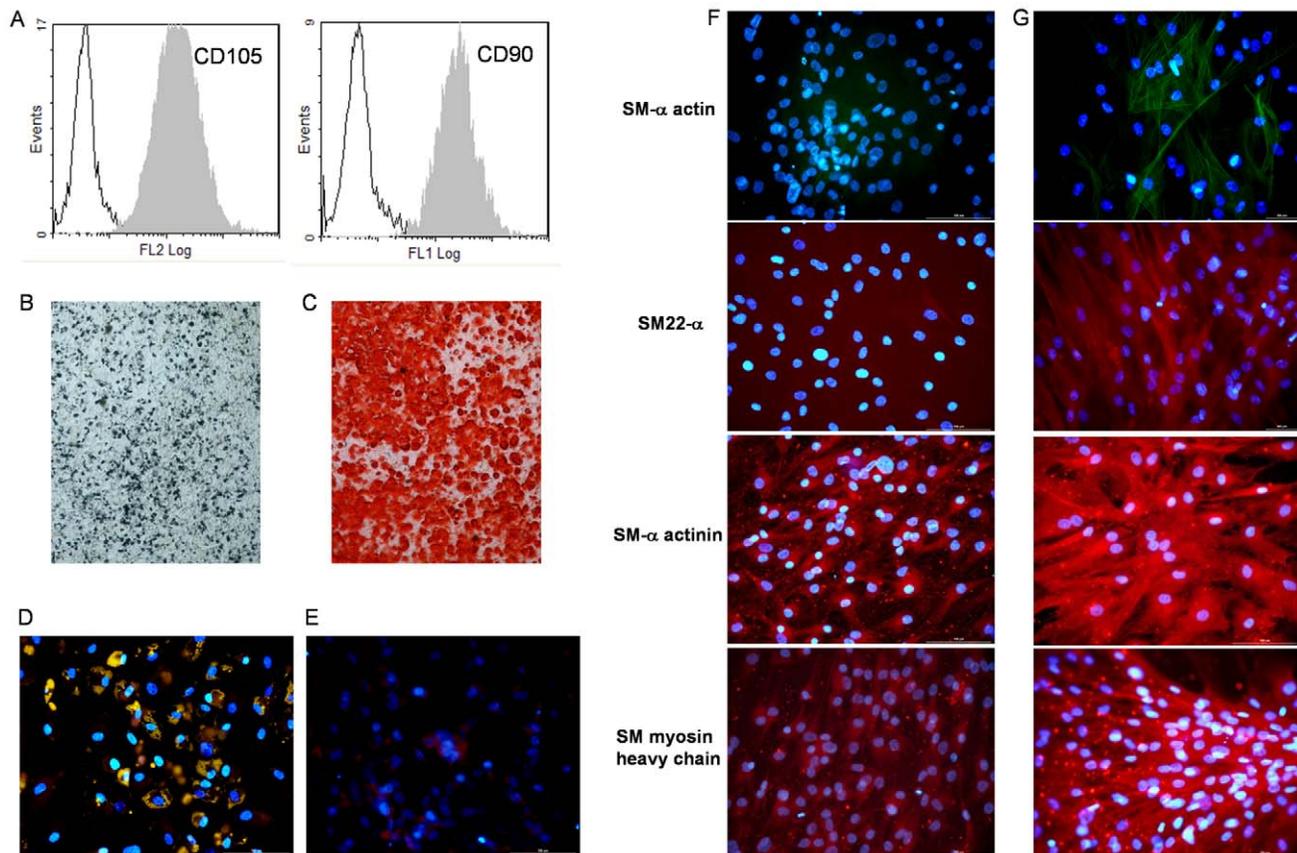


Figure 5. Characterisation of human fat derived MSC-like cells. (A) Flow cytometry analysis showed CD105 and CD90 positive cells after the third passage in culture. In addition, multipotential capacities of MSC-like cells were tested by inducing cells to differentiate into osteoblastic cells capable to mineralize, adipocytes and vascular smooth muscle (VSM) cells. (B) Mineralized nodules were identified as black spots using von Kossa silver staining or (C) as red spots using alizarin red staining after incubation of fat derived MSC-like cells in osteogenic differentiation medium. Adipocytes containing small Nil Red-positive lipid droplets were easily observed upon adipogenic conditions (D) whereas non induced cells were not labeled (E). In contrast to non induced cells (F), those cultured upon VSM conditions (G) generated elongated cells positive for several VSM markers such as SM- α actin, SM22 α , SM- α actinin and SM myosin heavy chain. doi:10.1371/journal.pone.0010999.g005

one or several soluble factors which have promoted osteosarcoma cell proliferation *in vitro*.

Discussion

A patient in complete remission of an humerus telangiectasic osteosarcoma since ten years consulted for a cosmetic correction by lipofilling. Three injections of autologous fat grafts harvested by the Coleman's technique were realized and few months after the last one, a local recurrence of osteosarcoma occurred 13 years after the initial treatment. Late local recurrence of an osteosarcoma is a very unexpected event after complete remission and 10 years of follow-up. To our knowledge this is one of the longest delay reported between remission and local recurrence, another case being reported by Bacci *et al.* [18]. The patient reported here did not present any predictive factor of local recurrence. It was a telangiectasic osteosarcoma subtype and wide margins were obtained after extra articular monobloc resection, both considered as good predictive factors of disease free survival [8,18]. Even a bad response to chemotherapy is not considered as a bad prognostic factor for late relapse (after 4 years) instead of earlier relapse [19,20]. Thus, this local recurrence of telangiectasic osteosarcoma at the exact area of autologous fat grafts performed 18 months before raised the question of their possible relationship.

Despite the widespread clinical use of Coleman's lipofilling technique, very little is known about its consequence on tissue environment after tumor resection. The only published data concerned conservative treatments in breast cancer patients in which this technique represents an advance, but in these cases the correlation between fat transfer and recurrent breast cancer is difficult to analyze [2,21,22,23,24]. Motrescu and Rio have described a vicious cycle between adipocytes and cancer cells: the last ones induce secretion by adipose tissue of Matrix Metalloproteinase 11 which in turn favors cancer cell survival and tumor progression by changing the tumor surrounding environment [25]. To investigate the possible relationship between fat graft and osteosarcoma growth, an experimental model reproducing the clinical case of human fat injection in osteosarcoma was set up using human SaOS2 osteosarcoma cells in athymic mice. The human fat tissue was harvested from a patient and injected following the Coleman's procedure. Results showed that osteosarcoma growth was significantly increased by fat injection whereas fat alone produced only small and stable volumes at injection sites in naive mice. Several hypotheses could explain these observations. On one hand, fat may promote angiogenesis thereby interfering with tumor growth. Indeed, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) which is expressed in the interstitial connective tissue of fat grafts favours graft

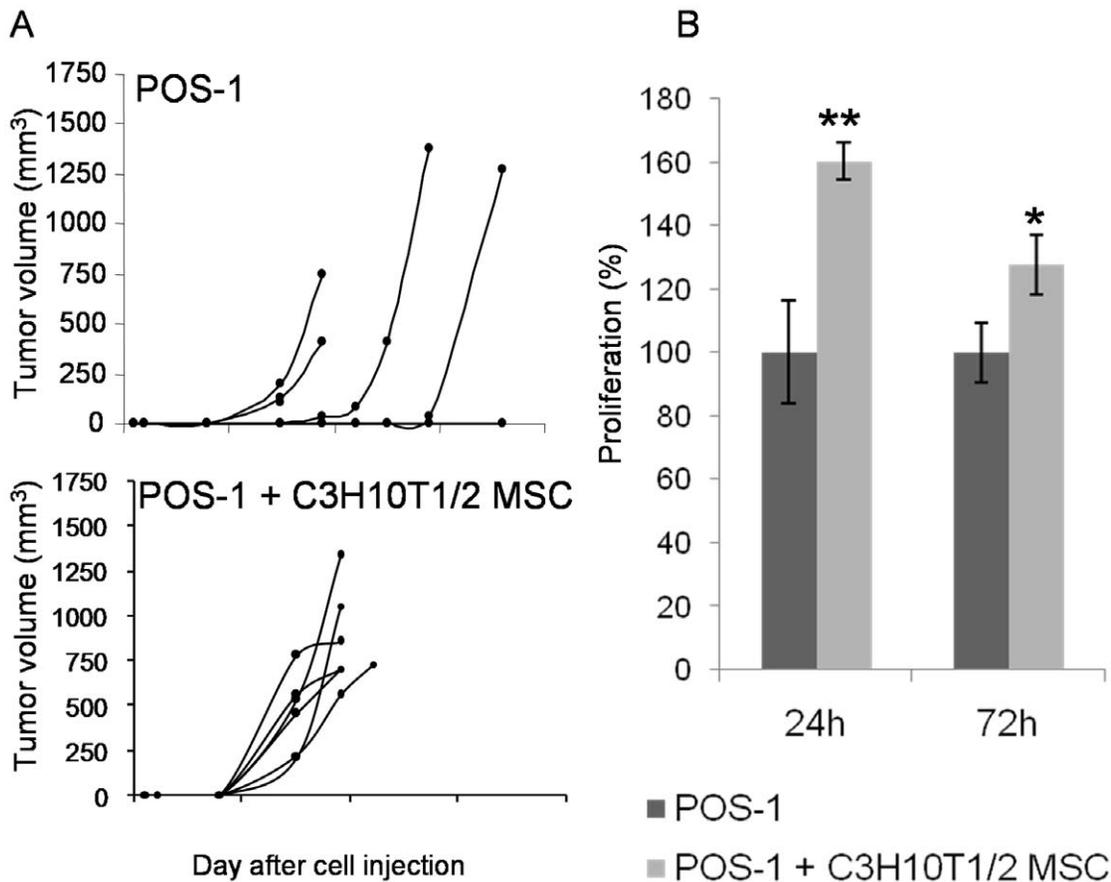


Figure 6. Mouse MSCs interact with osteosarcoma cells. (A) Evolutions of the tumor volume induced into the footpad of C3H/HeN mice. Mice of the control group (POS-1) received osteosarcoma POS-1 cells alone, while POS-1 cells were associated with C3H10T1/2 MSCs at a ratio of 2:1 in the POS-1 + C3H10T1/2 MSC group. (B) POS-1 osteosarcoma cells and C3H10T1/2 MSCs were co-cultured without cell-cell contact. The POS-1 cell proliferation was analyzed by trypan blue cell counting after 24 and 72 hours of co-culture. Results are presented as proliferation percentages relatively to the total number of POS-1 cells cultured alone. Error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant differences between means (* for $p < 0.05$ and ** for $p < 0.01$). doi:10.1371/journal.pone.0010999.g006

survival [26], but can stimulate growth, invasion and metastasis of solid tumors [27,28]. In another hand, adipocytes highly express Adiponectin (also designed as adipose most abundant gene transcript) which was shown to stimulate Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL or TNFSF11) and inhibit Osteoprotegerin expression in osteoblasts [29]. Therefore fat may regulate two bone resorption mediators which are highly implicated in the development of bone tumors [30]. Indeed blocking RANKL by soluble RANK [31,32,33] or by the decoy receptor Osteoprotegerin [11,34,35,36,37] was proven to be effective in several *in vivo* models of bone tumors and leads to the clinical development of a fully-humanized monoclonal antibody directed against RANKL (Denosumab) [38].

In addition, the role of MSC-like cells which are contained in fatty tissue must be considered [39]. Our study showed that the fat harvested following Coleman's procedure contains progenitor cells which share numerous characteristics with MSCs. They were positive for the phenotypic markers CD90 and CD105 and simultaneously negative for the hematopoietic markers CD45 and CD34. They showed ability to survive in long term culture without producing tumor *in vivo* and to differentiate *in vitro* into the osteoblast lineage. Adipose-derived stem/stromal cells (designed ADSCs or ASCs) are proposed as cellular agent to enhance angiogenesis after ischemic injury [40,41] or to promote survival of

fat graft for breast augmentation or reconstruction [42], but additionally they could promote migration and invasion of breast cancer cells [43]. The effect of bone marrow-derived MSCs has been studied on osteosarcoma development by injection in the caudal vein of nude mice bearing SaOS2 cell-induced osteosarcoma: the addition of MSCs has promoted tumor growth and pulmonary metastasis *in vivo* [44]. In our study, we used a complete syngeneic model with POS-1 osteosarcoma cells and C3H10T1/2 MSCs which have been derived from C3H/HeN mice and were injected into mice of the same strain. The osteosarcoma onset and incidence were greatly enhanced by C3H10T1/2 MSC presence. Djouad F *et al.* have shown an immunosuppressive effect of primary or C3H10T1/2 MSCs on tumor growth: B16 melanoma cells have proliferated into allogeneic C3H/HeN mice only when they have been co-injected with MSCs otherwise they have been rejected [45]. Into a syngeneic tumor model, C3H10T1/2 MSCs have induced an earlier onset of tumors but did not interfere with the tumor growth kinetic [46]. Using a co-culture method without cell contact, we observed that C3H10T1/2 MSCs promoted POS-1 cell proliferation by secreting one or several soluble factors. We noted similar observations like earlier onset of tumors in a xenogeneic model and greater proliferation *in vitro* when rat osteosarcoma cells were combined with rat MSC-like cells. Numerous soluble factors have to be considered as MSC

mediators able to modify tumor cell proliferation or the tumor environment. Among them, the insulin growth factor, the fibroblast growth factor, the interleukin Il-6, the chemokine CCL5 (RANTES) and the matrix metalloproteinases MMP-2 and MT1-MMP are few of the mediators that could have a particular role in bone tumor development [47,48,49]. Further studies have to be performed to identify the MSC mediators acting on osteosarcoma cells. To address this point, the main difficulty is that the panel of cytokines and growth factors secreted by MSCs is likely to be different *in vitro* and *in vivo* because their expression can be modulated by inflammatory mediators *in vivo* [50].

Controversial results have been reported when MSCs have been injected into mice with induced tumor, resulting either in promotion or inhibition of tumor growth depending on the studies. Antitumoral action of rat MSCs on rat gliomas has been reported by Nakamura *et al.* [51]. In that report, MSCs have been responsible for prolonged survival of glioma-bearing rats. Similarly and somewhat to their own surprise, Khakoo AY *et al.* [52] have obtained also an antitumorigenic effect of human MSCs on Kaposi's sarcomas which have been induced on nude mice. Since their first warning, Djouad F *et al.* have also reported that the immunosuppressive effect of mouse MSCs *in vivo* depends on environmental parameters and that even "a low but relevant amount of MSCs may induce tumor rejection" [46]. Therefore the effect of MSCs within tumors seems unpredictable and dependant of microenvironment signals. By exploring the interaction of MSCs with the tumor environment, new therapeutic options could be provided [53].

In an osteosarcoma experimental model, Naumov *et al.* have shown that switch from non angiogenic to angiogenic phenotype could be a biologic behavior associated to the clinical expression of a quiescent tumor [54]. Assuming that cancer stem cell-like theory in bone sarcoma is correct [55,56], their presence at the site of the primary tumor after treatment is in agreement with a "supposed" good response chemotherapy and wide monobloc surgery as in our patient. Despite the lack of biological data on the mechanism by which cancer stem cells drive the tumor growth, the modulation of microenvironment induced by the fat graft could interfere with the biological behaviour of this sub-population. The preclinical experimental designs used in the present study mimic surgical procedure for lipofilling enabling to study *in vivo* interaction between fat and osteosarcoma cells, but do not mimic the late and local recurrence of osteosarcoma after a long lasting remission as observed in the clinical case reported here. Further experimental investigations are necessary to understand the mechanism regulating the interactions between the graft, the tissue recipient and quiescent tumor cells. However surgery associating inflammatory process could be directly responsible for the reactivation of dormant tumor cells [57,58]. This last assumption attributes a

minor or non role to adipose tissue but constitutes anyway a warning concerning the fat grafting or any other surgical procedure in a post-neoplastic environment.

In conclusion, because of the unexpected late local recurrence of an osteosarcoma at the exact area of autologous fat grafts and the stimulation of osteosarcoma tumor growth by fat or MSC-like cells in experimental models, clinician must be aware of the possible long term local relapse of tumor after an autologous fat graft which is usually considered as a safe procedure.

Supporting Information

Figure S1 Rat MSCs interact with osteosarcoma cells. (A) Evolutions of the tumor volume induced into the footpad of nude mice (NMRI nu/nu; Elevages Janvier, Le Genest St Isle, France). The OSRGA cells were derived from a transplantable rat osteosarcoma model originally induced by radiation [11]. Relatively undifferentiated mesenchymal cells (MSC-like cells) were obtained from calvaria of newborn rat (2 days old Sprague-Dawley rat, Charles River, L'Arbresle, France) as previously described. Mice of the control group (OSRGA) received 10⁶ OSRGA cells alone, while OSRGA cells were associated with calvaria-derived MSC-like cells at ratio 2:1 in the OSRGA + MSC group. A third group received 0.5 × 10⁶ MSC-like cells alone and have not developed any tumor after 85 days (data not shown). The significance test is not performed as only three mice per group were included in this preliminary experiment. (B) OSRGA cells and calvaria-derived MSC-like cells were co-cultured without cell-cell contact. The OSRGA cell proliferation was analyzed by trypan blue cell counting after 24 and 72 hours. Results are presented as proliferation percentages relatively to the total number of OSRGA cells cultured alone. Error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant differences between means (p < 0.01).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010999.s001 (0.50 MB TIF)

Acknowledgments

The authors wish to thank C. Bailly and C. LeCorre from the Experimental Therapy Unit platform of the IFR26 (Nantes, France) for their technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PP DH VT. Performed the experiments: PP JR ALB. Analyzed the data: PP JR ALB VT. Contributed reagents/materials/analysis tools: PP EC F Deschaseaux MFH VT. Wrote the paper: PP FR DH F Duteille VT FG. Histological analysis: EC MFH. Plastic surgeon of the patient: F. Duteille. Orthopaedic surgeon of the patient: FG.

References

- Coleman SR (1997) Facial recontouring with lipofstructure. *Clin Plast Surg* 24: 347–367.
- Coleman SR, Saboeiro AP (2007) Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 119: 775–785; discussion 786–777.
- Spear SL (2008) Fat for breast: where are we? *Plast Reconstr Surg* 122: 983–984.
- Missana MC, Laurent I, Barreau L, Balleyguier C (2007) Autologous fat transfer in reconstructive breast surgery: indications, technique and results. *Eur J Surg Oncol* 33: 685–690.
- Salgarello M, Visconti G, Farallo E (2009) Autologous Fat Graft in Radiated Tissue Prior to Alloplastic Reconstruction of the Breast: Report of Two Cases. *Aesthetic Plast Surg*.
- Ferrari S, Bacci G, Picci P, Mercuri M, Briccoli A, et al. (1997) Long-term follow-up and post-relapse survival in patients with non-metastatic osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* 8: 765–771.
- Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, et al. (1992) Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *J Clin Oncol* 10: 5–15.
- Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, et al. (2002) Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 20: 776–790.
- Koksai Y, Akyuz C, Varan A, Atilla B, Gedikoglu G, et al. (2008) Late recurrence in primary region of parosteal osteosarcoma: a case report. *Pediatr Hematol Oncol* 25: 83–88.
- Lamoureux F, Picarda G, Garrigue-Antar L, Baud'huin M, Trichet V, et al. (2009) Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma. *Cancer Res* 69: 526–536.
- Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, et al. (2007) Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma:

- blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res* 67: 7308–7318.
12. Ory B, Heymann MF, Kamijo A, Gouin F, Heymann D, et al. (2005) Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* 104: 2522–2529.
 13. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59: 221–226.
 14. Uesugi M, Koshino T, Mitsugi N, Hiruma T (2000) Predictive value of serum immunosuppressive acidic protein for lung metastasis after amputation of murine osteosarcoma of the lower limb. *Cancer Lett* 155: 169–172.
 15. Pinney DF, Emerson CP, Jr. (1989) 10T1/2 cells: an in vitro model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation. *Environ Health Perspect* 80: 221–227.
 16. Bills CE, Eisenberg H, Pallante SL (1971) Complexes of organic acids with calcium phosphate: the von Kossa stain as a clue to the composition of bone mineral. *Johns Hopkins Med J* 128: 194–207.
 17. Dennis JE, Charbord P (2002) Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 20: 205–214.
 18. Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Ruggieri P, Picci P, et al. (2000) Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol* 18: 4016–4027.
 19. Ferrari S, Briccoli A, Mercuri M, Bertoni F, Cesari M, et al. (2006) Late relapse in osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 28: 418–422.
 20. Kim MS, Cho WH, Song WS, Lee SY, Jeon DG (2007) time dependency of prognostic factors in patients with stage II osteosarcomas. *Clin Orthop Relat Res* 463: 157–165.
 21. Chan CW, McCulley SJ, Macmillan RD (2008) Autologous fat transfer—a review of the literature with a focus on breast cancer surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 61: 1438–1448.
 22. Delay E, Gosset J, Toussoun G, Delaporte T, Delbaere M (2008) [Efficacy of lipomodelling for the management of sequelae of breast cancer conservative treatment]. *Ann Chir Plast Esthet* 53: 153–168.
 23. Gosset J, Flageul G, Toussoun G, Guerin N, Tourasse C, et al. (2008) [Lipomodelling for correction of breast conservative treatment sequelae. Medicolegal aspects. Expert opinion on five problematic clinical cases]. *Ann Chir Plast Esthet* 53: 190–198.
 24. Mojallal A, Saint-Cyr M, Garrido I (2009) Autologous fat transfer: controversies and current indications for breast surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62: 708–710.
 25. Motrescu ER, Rio MC (2008) Cancer cells, adipocytes and matrix metalloproteinase 11: a vicious tumor progression cycle. *Biol Chem*.
 26. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M (2000) Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *Laryngoscope* 110: 1333–1338.
 27. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, et al. (2000) Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 6: 572–577.
 28. Vona-Davis L, Rose DP (2009) Angiogenesis, adipokines and breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 193–201.
 29. Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, et al. (2006) Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 21: 1648–1656.
 30. Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA (2007) Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther* 6: 2609–2617.
 31. Lamoureux F, Picarda G, Rousseau J, Gourden C, Battaglia S, et al. (2008) Therapeutic efficacy of soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B-Fc delivered by nonviral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma. *Mol Cancer Ther* 7: 3389–3398.
 32. Pearce RN, Sordillo EM, Yacoby S, Wong BR, Liau DF, et al. (2001) Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11581–11586.
 33. Zhang J, Dai J, Yao Z, Lu Y, Dougall W, et al. (2003) Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB Fc diminishes prostate cancer progression in bone. *Cancer Res* 63: 7883–7890.
 34. Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, et al. (2001) Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 98: 3534–3540.
 35. Heath DJ, Vanderkerken K, Cheng X, Gallagher O, Prideaux M, et al. (2007) An osteoprotegerin-like peptidomimetic inhibits osteoclastic bone resorption and osteolytic bone disease in myeloma. *Cancer Res* 67: 202–208.
 36. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Koziarzki I, Komarova SV, et al. (2006) Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440: 692–696.
 37. Morony S, Capparelli C, Sarosi I, Lacey DL, Dunstan CR, et al. (2001) Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngenic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res* 61: 4432–4436.
 38. Schwarz EM, Ritchlin CT (2007) Clinical development of anti-RANKL therapy. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 1: S7.
 39. Gimble JM, Nuttall ME (2004) Bone and fat: old questions, new insights. *Endocrine* 23: 183–188.
 40. Carriere A, Ebrahimian TG, Dehez S, Auge N, Joffre C, et al. (2009) Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1093–1099.
 41. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, et al. (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: 1292–1298.
 42. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, et al. (2008) Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* 32: 48–55; discussion 56–47.
 43. Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby PJ, Li R (2009) Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*.
 44. Xu WT, Bian ZY, Fan QM, Li G, Tang TT (2009) Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett* 281: 32–41.
 45. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, et al. (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102: 3837–3844.
 46. Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, Jorgensen C, et al. (2006) Earlier onset of syngenic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 82: 1060–1066.
 47. Damien C, Grimaud E, Rousselle AV, Charrier C, Fortun Y, et al. (2000) Cysteine protease production by human osteosarcoma cells (MG63, SAOS2) and its modulation by soluble factors. *Cytokine* 12: 539–542.
 48. Georges S, Ruiz Velasco C, Trichet V, Fortun Y, Heymann D, et al. (2009) Proteases and bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 29–41.
 49. Lazenec G, Jorgensen C (2008) Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 26: 1387–1394.
 50. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, et al. (2007) The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25: 1737–1745.
 51. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, et al. (2004) Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 11: 1155–1164.
 52. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, et al. (2006) Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 203: 1235–1247.
 53. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D (2009) Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res* 69: 1255–1258.
 54. Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, et al. (2006) A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst* 98: 316–325.
 55. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, et al. (2005) Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7: 967–976.
 56. Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, Young KM, Friedrichs K, et al. (2008) Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet J* 175: 69–75.
 57. Demicheli R, Retsky MW, Hrushesky WJ, Baum M (2007) Tumor dormancy and surgery-driven interruption of dormancy in breast cancer: learning from failures. *Nat Clin Pract Oncol* 4: 699–710.
 58. Varani J, Lovett EJ, 3rd, Lundy J (1981) A model of tumor cell dormancy: effects of anesthesia and surgery. *J Surg Oncol* 17: 9–14.

Annexe 2

Figures 2, 3 et 4 du manuscrit « Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemo-therapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models », Rousseau et al, 2010

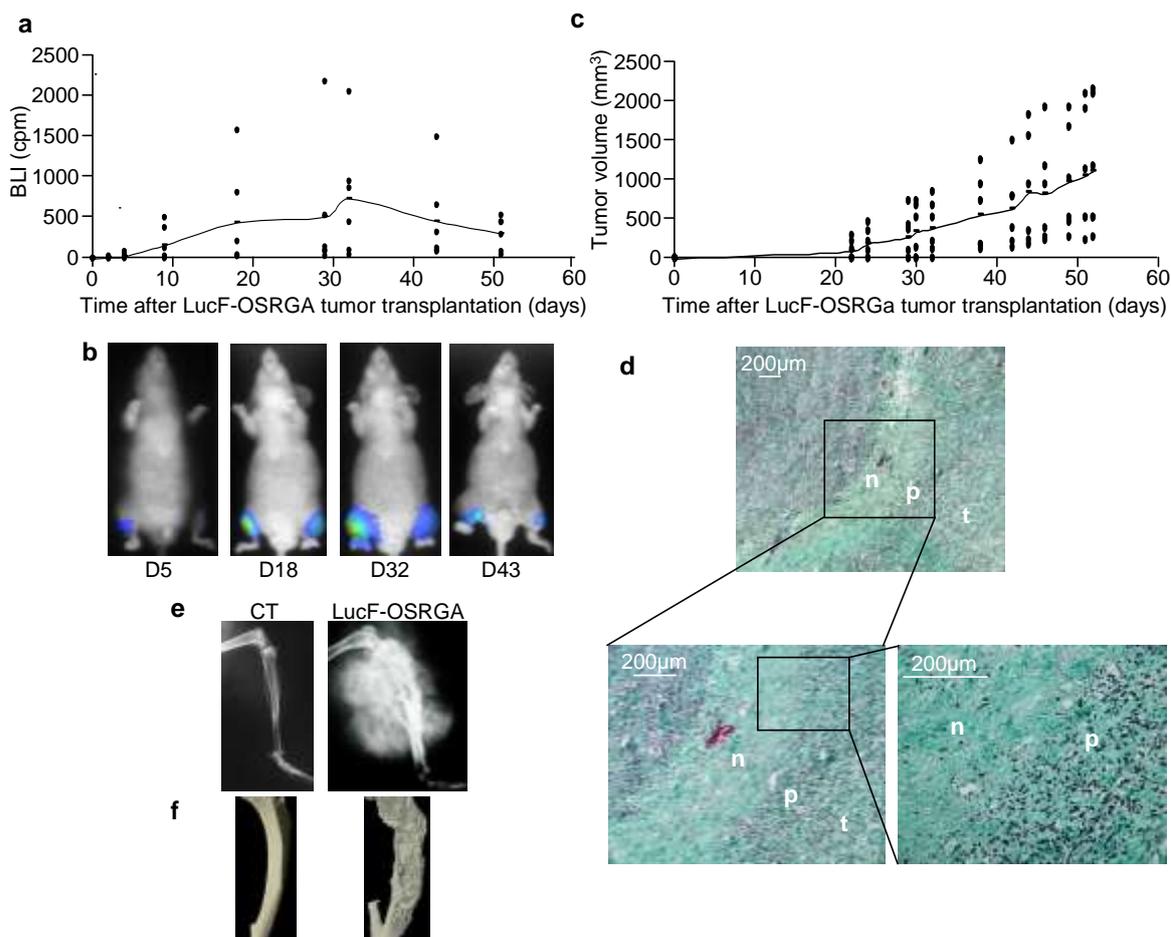


Figure 2: Characterisation of LucF-OSRGA osteosarcoma transplanted in immunodeficient mice. (a, b) Bioluminescence activity evolution after LucF-OSRGA tumor fragment implantation (3 mice on both legs) by individual measures (points) and mean curves (a) associated with bioluminescence images showing luciferase detection as an example at day 5, 18, 32 and 43 of tumor development (b). (c) As for the bioluminescence activity, evolution of tumor volume is shown after tumor induction. (d) Representative images of LucF-OSRGA tumor sections after Masson Trichrom staining. Original magnifications are indicated. Necrotic, fibrotic tissue is identified as a green cell-poor region (n) surrounded by a region containing numerous pyknotic nuclei (p). Viable tumor cells are present in surrounding areas (t). E and F. Radiographic (e) and Microscanner images (f) are shown for a representative transplanted LucF-OSRGA tumor.

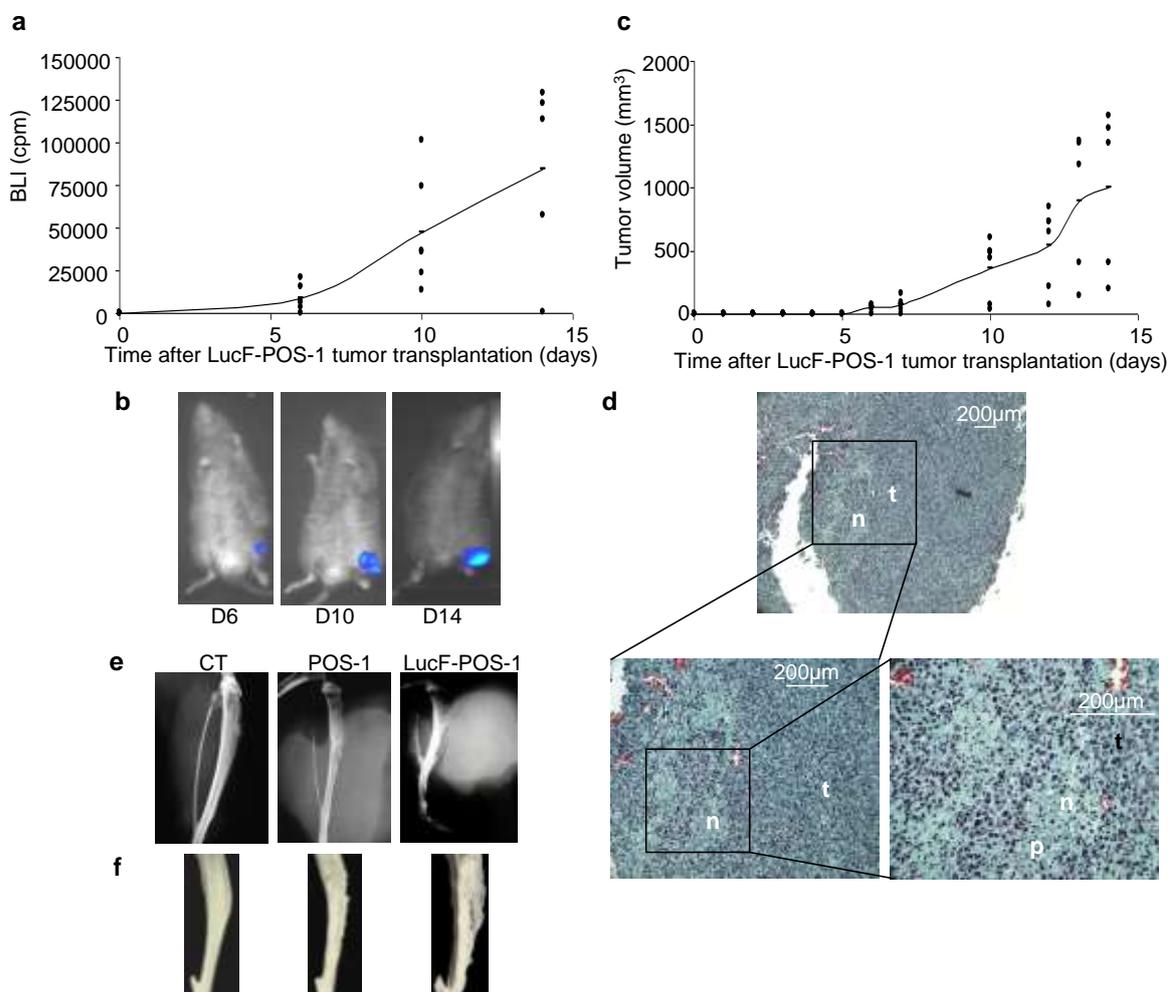


Figure 3: Characterization of LucF-POS-1 osteosarcoma transplanted into syngeneic mice. (a, b) Bioluminescence activity evolution after LucF-POS-1 tumor fragment implantation (n=5) by individual measures (points) and mean curves (a) associated with bioluminescence images showing luciferase detection as an example at day 6, 10 and 14 of tumor development (b). C. As for the bioluminescence activity, evolution of tumor volume is shown after tumor induction. (d) Representative images of LucF-POS-1 tumor sections after Masson Trichrom staining. Original magnifications are indicated. Small necrotic, fibrotic areas are identified as cell-poor region containing numerous pyknotic nuclei (n). Viable tumor cells are present within surrounding areas (t). (e, f) Radiographic (e) and Microscanner images (f) are shown for a representative transplanted LucF-POS-1 tumor.

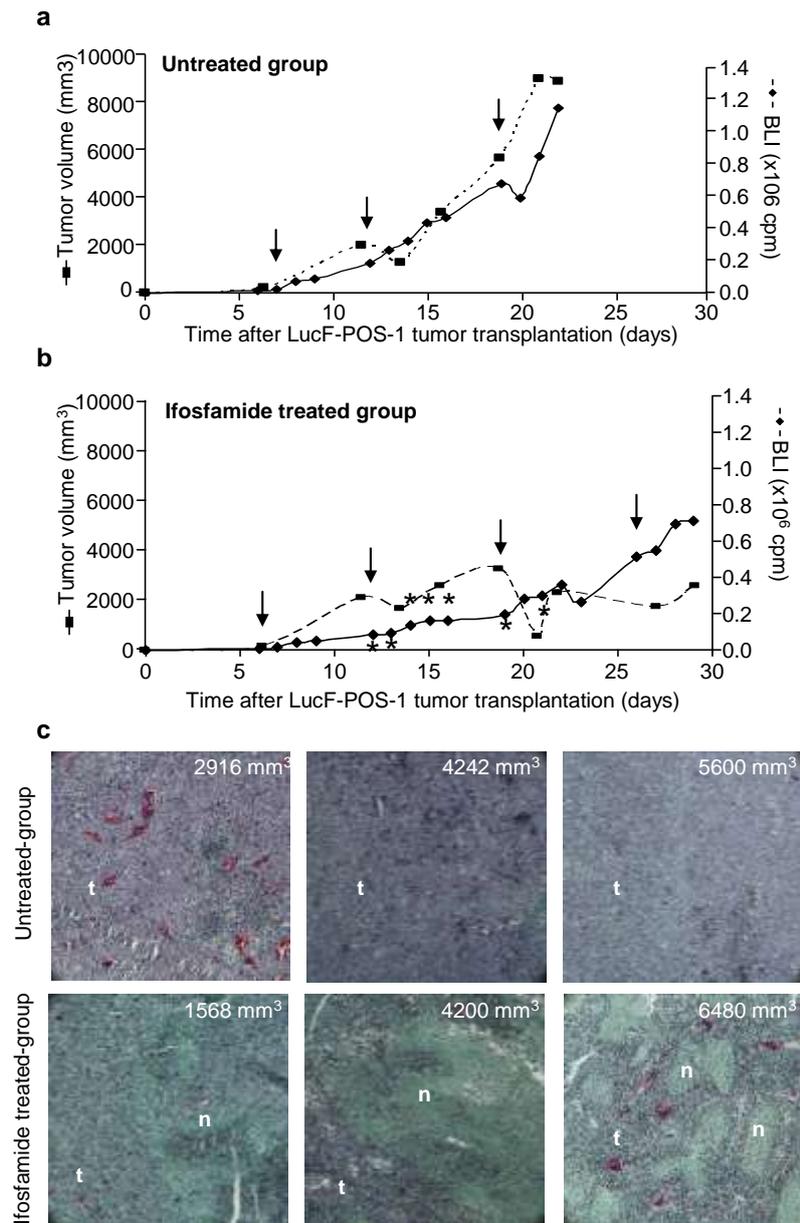


Figure 4: Response of LucF-POS-1 osteosarcoma to ifosfamide treatment. (a, b) Progression of mean tumor volume (solid lines with diamonds) and mean bioluminescence (dashed lines with squares) are shown for untreated (a) or ifosfamide-treated (b) mice (n=5) bearing LucF-POS-1 tumors. Ifosfamide treatments are indicated by arrows. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) between the treated and the untreated group. (c) Comparison between the untreated and ifosfamide-treated groups by histological analyses of tumor sections after Masson Trichrom staining revealed the presence of extensive necrotic, fibrotic tissue (a) surrounded by areas containing numerous pycnotic nuclei (b) in tumors from ifosfamide-treated mice, while tumors from untreated mice contained predominantly areas of proliferating tumor cells (c).

BIBLIOGRAPHIE

1. Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279-289 (1990).
2. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811 (1998).
3. Elbashir, S.M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498 (2001).
4. Sijen, T. & Plasterk, R.H.A. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* **426**, 310-314 (2003).
5. Lecellier, C. & Voinnet, O. RNA silencing: no mercy for viruses? *Immunol. Rev* **198**, 285-303 (2004).
6. Lee, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-419 (2003).
7. Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **4**, 457-467 (2003).
8. Ahlquist, P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* **296**, 1270-1273 (2002).
9. Ketting, R.F., Haverkamp, T.H., van Luenen, H.G. & Plasterk, R.H. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* **99**, 133-141 (1999).
10. Domeier, M.E. et al. A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **289**, 1928-1931 (2000).
11. Chen, P.Y. & Meister, G. microRNA-guided posttranscriptional gene regulation. *Biol. Chem* **386**, 1205-1218 (2005).
12. Deiters, A. Small molecule modifiers of the microRNA and RNA interference pathway. *AAPS J* **12**, 51-60 (2010).
13. Almeida, R. & Allshire, R.C. RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol* **15**, 251-258 (2005).
14. Kim, D.H., Villeneuve, L.M., Morris, K.V. & Rossi, J.J. Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol* **13**, 793-797 (2006).
15. Mochizuki, K., Fine, N.A., Fujisawa, T. & Gorovsky, M.A. Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell* **110**, 689-699 (2002).
16. Janowski, B.A., Hu, J. & Corey, D.R. Silencing gene expression by targeting chromosomal DNA with antigene peptide nucleic acids and duplex RNAs. *Nat Protoc* **1**, 436-443 (2006).
17. Hall, L.L. & Lawrence, J.B. The cell biology of a novel chromosomal RNA: chromosome painting by XIST/Xist RNA initiates a remodeling cascade. *Semin. Cell Dev. Biol* **14**, 369-378 (2003).
18. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366 (2001).
19. Masiero, M., Nardo, G., Indraccolo, S. & Favaro, E. RNA interference: implications for cancer treatment. *Mol. Aspects Med* **28**, 143-166 (2007).
20. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B. & Zamore, P.D. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* **10**, 537-548 (2002).
21. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. & Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95-98 (2004).
22. Doench, J.G. & Sharp, P.A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* **18**, 504-511 (2004).
23. Allen, E. & Howell, M.D. miRNAs in the biogenesis of trans-acting siRNAs in higher plants. *Semin Cell Dev Biol* (2010).doi:10.1016/j.semcdb.2010.03.008

24. Masiero, M., Nardo, G., Indraccolo, S. & Favaro, E. RNA interference: implications for cancer treatment. *Mol. Aspects Med* **28**, 143-166 (2007).
25. Proud, C.G. PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem. Sci* **20**, 241-246 (1995).
26. Kato, H. et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-105 (2006).
27. Marques, J.T. & Williams, B.R.G. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat. Biotechnol* **23**, 1399-1405 (2005).
28. Perrimon, N., Ni, J. & Perkins, L. In vivo RNAi: Today and Tomorrow. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2010).doi:10.1101/cshperspect.a003640
29. Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. & Bartel, D.P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33 (2000).
30. Lee, S. & Kumar, P. Conditional RNAi: towards a silent gene therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev* **61**, 650-664 (2009).
31. Du, G., Yonekubo, J., Zeng, Y., Osisami, M. & Frohman, M.A. Design of expression vectors for RNA interference based on miRNAs and RNA splicing. *FEBS J* **273**, 5421-5427 (2006).
32. Tiscornia, G., Singer, O., Ikawa, M. & Verma, I.M. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**, 1844-1848 (2003).
33. Li, Y.L., Quarles, L.D., Zhou, H.H. & Xiao, Z.S. RNA interference and its application in bone-related diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **361**, 817-821 (2007).
34. Wurdak, H. et al. An RNAi screen identifies TRRAP as a regulator of brain tumor-initiating cell differentiation. *Cell Stem Cell* **6**, 37-47 (2010).
35. Bumcrot, D., Manoharan, M., Koteliansky, V. & Sah, D.W.Y. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat. Chem. Biol* **2**, 711-719 (2006).
36. Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. & Barik, S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat. Med* **11**, 50-55 (2005).
37. Huang, D.D. The potential of RNA interference-based therapies for viral infections. *Curr HIV/AIDS Rep* **5**, 33-39 (2008).
38. Shen, J. et al. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* **13**, 225-234 (2006).
39. Thakker, D.R. et al. siRNA-mediated knockdown of the serotonin transporter in the adult mouse brain. *Mol. Psychiatry* **10**, 782-789, 714 (2005).
40. Zhang, Y., Engelman, J. & Friedlander, R.M. Allele-specific silencing of mutant Huntington's disease gene. *J. Neurochem* **108**, 82-90 (2009).
41. Zhu, L. et al. Suppression of tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF)-2 attenuates the proinflammatory and proliferative effect of aggregated IgG on rat renal mesangial cells. *Cytokine* **49**, 201-208 (2010).
42. Zhang, Y. et al. Engineering mucosal RNA interference in vivo. *Mol. Ther* **14**, 336-342 (2006).
43. Khoury, M. et al. Efficient new cationic liposome formulation for systemic delivery of small interfering RNA silencing tumor necrosis factor alpha in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* **54**, 1867-1877 (2006).
44. Marieb, E. Essentials of human anatomy and physiology. Livre d'histologie, 9ème édition parue en 2004.
45. Dewynter, G. & Montero, J. Aspects chimiques fondamentaux de la structure et de la biosynthèse du collagène Collection « Biologie de l'appareil locomoteur ». 9-17 (1989).
46. Harada, S. & Rodan, G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* **423**, 349-355 (2003).
47. Knothe Tate, M.L., Adamson, J.R., Tami, A.E. & Bauer, T.W. The osteocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **36**, 1-8 (2004).

48. Owen, M. Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci. Suppl* **10**, 63-76 (1988).
49. Young, M.F., Ibaraki, K., Kerr, J.M., Lyu, M.S. & Kozak, C.A. Murine bone sialoprotein (BSP): cDNA cloning, mRNA expression, and genetic mapping. *Mamm. Genome* **5**, 108-111 (1994).
50. Nakashima, K. et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**, 17-29 (2002).
51. Marie, P.J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch. Biochem. Biophys* **473**, 98-105 (2008).
52. Li, Z. et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 13906-13911 (2008).
53. Oskowitz, A.Z. et al. Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 18372-18377 (2008).
54. Mizuno, Y. et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **368**, 267-272 (2008).
55. Li, H. et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J. Clin. Invest* **119**, 3666-3677 (2009).
56. Ehrlich, P.J. & Lanyon, L.E. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int* **13**, 688-700 (2002).
57. Mullender, M.G. & Huiskes, R. Osteocytes and bone lining cells: which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone? *Bone* **20**, 527-532 (1997).
58. Poole, K.E.S. et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J* **19**, 1842-1844 (2005).
59. Dobnig, H. & Turner, R.T. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* **136**, 3632-3638 (1995).
60. Boyle, W.J., Simonet, W.S. & Lacey, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337-342 (2003).
61. Chambers, T.J. The birth of the osteoclast. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **1192**, 19-26 (2010).
62. Hsu, H. et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 3540-3545 (1999).
63. Suda, T., Udagawa, N., Nakamura, I., Miyaura, C. & Takahashi, N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* **17**, 87S-91S (1995).
64. Taipaleenmäki, H. et al. MIR-138 is a novel regulator of in vivo bone formation. (2010).
65. Rodan, G.A. & Martin, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* **289**, 1508-1514 (2000).
66. Roodman, G.D. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr. Rev* **17**, 308-332 (1996).
67. Lerner, U.H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J. Dent. Res* **85**, 584-595 (2006).
68. Parfitt, A.M. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* **30**, 5-7 (2002).
69. Hofbauer, L.C. & Heufelder, A.E. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **85**, 2355-2363 (2000).
70. Kim, N., Odgren, P.R., Kim, D.K., Marks, S.C. & 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* **97**, 10905-10910 (2000).
71. Guerrini, M.M. et al. Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations. *Am. J. Hum. Genet* **83**, 64-76 (2008).
 72. Stolina, M. et al. Continuous RANKL inhibition in osteoprotegerin transgenic mice and rats suppresses bone resorption without impairing lymphorganogenesis or functional immune responses. *J. Immunol* **179**, 7497-7505 (2007).
 73. Sobacchi, C. et al. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nat. Genet* **39**, 960-962 (2007).
 74. Fata, J.E. et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* **103**, 41-50 (2000).
 75. Romas, E., Gillespie, M.T. & Martin, T.J. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* **30**, 340-346 (2002).
 76. Horwood, N.J., Elliott, J., Martin, T.J. & Gillespie, M.T. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* **139**, 4743-4746 (1998).
 77. Bucay, N. et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* **12**, 1260-1268 (1998).
 78. Min, H. et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J. Exp. Med* **192**, 463-474 (2000).
 79. Lee, S. & Lorenzo, J.A. Regulation of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin mRNA expression by parathyroid hormone is predominantly mediated by the protein kinase a pathway in murine bone marrow cultures. *Bone* **31**, 252-259 (2002).
 80. Khosla, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* **142**, 5050-5055 (2001).
 81. Grimaud, E. et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am. J. Pathol* **163**, 2021-2031 (2003).
 82. Guise, T.A. et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin. Cancer Res* **12**, 6213s-6216s (2006).
 83. Chirgwin, J.M. & Guise, T.A. Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr* **10**, 159-178 (2000).
 84. Schajowicz, F. Histological typing of bone tumor. *Springer-Verlag* 10-13 (1993).
 85. Linet, M.S., Ries, L.A., Smith, M.A., Tarone, R.E. & Devesa, S.S. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J. Natl. Cancer Inst* **91**, 1051-1058 (1999).
 86. Desandes, E. et al. Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr Blood Cancer* **43**, 749-757 (2004).
 87. Kim, H.J., Chalmers, P.N. & Morris, C.D. Pediatric osteogenic sarcoma. *Curr. Opin. Pediatr* **22**, 61-66 (2010).
 88. Guinebretière, J. et al. Ostéosarcome de forme commune. *Encycl Méd Chir* **13**, 14-704 (2001).
 89. Leonard, A., Craft, A.W., Moss, C. & Malcolm, A.J. Osteogenic sarcoma in the Rothmund-Thomson syndrome. *Med. Pediatr. Oncol* **26**, 249-253 (1996).
 90. Schimke, R.N., Lowman, J.T. & Cowan, A.B. Retinoblastoma and osteogenic sarcoma in sibs. *Cancer* **34**, 2077-2079 (1974).
 91. Chauveinc, L. et al. Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet* **22**, 77-88 (2001).
 92. Varley, J.M., Evans, D.G. & Birch, J.M. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *Br. J. Cancer* **76**, 1-14 (1997).

93. Lynch, H.T. et al. Familial sarcoma: challenging pedigrees. *Cancer* **98**, 1947-1957 (2003).
94. Sandberg, A.A. & Bridge, J.A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet. Cytogenet* **145**, 1-30 (2003).
95. Fuchs, B. & Pritchard, D.J. Etiology of osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res* 40-52 (2002).
96. Wadayama, B. et al. Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res* **54**, 3042-3048 (1994).
97. López-Guerrero, J.A., López-Ginés, C., Pellín, A., Carda, C. & Llombart-Bosch, A. Deregulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagn. Mol. Pathol* **13**, 81-91 (2004).
98. Papachristou, D.J., Batistatou, A., Sykiotis, G.P., Varakis, I. & Papavassiliou, A.G. Activation of the JNK-AP-1 signal transduction pathway is associated with pathogenesis and progression of human osteosarcomas. *Bone* **32**, 364-371 (2003).
99. Entz-Werlé, N. et al. Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas. *Int. J. Cancer* **117**, 349-355 (2005).
100. van Trommel, M.F., Kroon, H.M., Bloem, J.L., Hogendoorn, P.C. & Taminiau, A.H. MR imaging based strategies in limb salvage surgery for osteosarcoma of the distal femur. *Skeletal Radiol* **26**, 636-641 (1997).
101. Gorlick, R. et al. Lack of correlation of functional scintigraphy with (99m)technetium-methoxyisobutylisonitrile with histological necrosis following induction chemotherapy or measures of P-glycoprotein expression in high-grade osteosarcoma. *Clin. Cancer Res* **7**, 3065-3070 (2001).
102. Costelloe, C.M. et al. 18F-FDG PET/CT as an indicator of progression-free and overall survival in osteosarcoma. *J. Nucl. Med* **50**, 340-347 (2009).
103. Hemdan Abdalla, A.M. & White, D. A 29-year-old woman with a remote history of osteosarcoma and positron emission tomography-positive pleurally based masses. Talcomas secondary to prior talc pleurodesis. *Chest* **134**, 640-643 (2008).
104. Philip, T. et al. [Standards, options and recommendations (SOR) for diagnosis, treatment and follow-up of osteosarcoma. Groupe de travail SOR]. *Bull Cancer* **86**, 159-176 (1999).
105. Caluser, C.I. et al. The value of thallium and three-phase bone scans in the evaluation of bone and soft tissue sarcomas. *Eur J Nucl Med* **21**, 1198-1205 (1994).
106. Brenner, W., Bohuslavizki, K.H. & Eary, J.F. PET imaging of osteosarcoma. *J. Nucl. Med* **44**, 930-942 (2003).
107. Bestic, J.M., Peterson, J.J. & Bancroft, L.W. Pediatric FDG PET/CT: Physiologic uptake, normal variants, and benign conditions [corrected]. *Radiographics* **29**, 1487-1500 (2009).
108. Schajowicz, F., Sissons, H.A. & Sobin, L.H. The World Health Organization's histologic classification of bone tumors. A commentary on the second edition. *Cancer* **75**, 1208-1214 (1995).
109. Eilber, F.R. & Rosen, G. Adjuvant chemotherapy for osteosarcoma. *Semin. Oncol* **16**, 312-322 (1989).
110. Rosen, G. & Nirenberg, A. Neoadjuvant chemotherapy for osteogenic sarcoma: a five year follow-up (T-10) and preliminary report of new studies (T-12). *Prog. Clin. Biol. Res* **201**, 39-51 (1985).
111. Ferguson, W.S. & Goorin, A.M. Current treatment of osteosarcoma. *Cancer Invest* **19**, 292-315 (2001).
112. Tan, M.L., Choong, P.F.M. & Dass, C.R. Osteosarcoma: Conventional treatment vs. gene therapy. *Cancer Biol. Ther* **8**, 106-117 (2009).
113. Huvos, A.G., Rosen, G. & Marcove, R.C. Primary osteogenic sarcoma:

- pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. *Arch. Pathol. Lab. Med* **101**, 14-18 (1977).
114. Federman, N., Bernthal, N., Eilber, F.C. & Tap, W.D. The multidisciplinary management of osteosarcoma. *Curr Treat Options Oncol* **10**, 82-93 (2009).
 115. Wittrant, Y. et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1704**, 49-57 (2004).
 116. Chikatsu, N. 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* **267**, 632-637 (2000).
 117. Zhang, J. et al. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J. Clin. Invest* **107**, 1235-1244 (2001).
 118. Croucher, P.I. et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* **98**, 3534-3540 (2001).
 119. 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* **61**, 1637-1644 (2001).
 120. Nagai, M., Kyakumoto, S. & Sato, N. Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **269**, 532-536 (2000).
 121. Lamoureux, F. 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* **7**, 3389-3398 (2008).
 122. Lamoureux, F. et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res* **67**, 7308-7318 (2007).
 123. O'Brien, C.A. Control of RANKL gene expression. *Bone* **46**, 911-919 (2010).
 124. Guise, T.A. & Chirgwin, J.M. Transforming growth factor-beta in osteolytic breast cancer bone metastases. *Clin. Orthop. Relat. Res* S32-38 (2003).
 125. Blum, B., Moseley, J., Miller, L., Richelsoph, K. & Haggard, W. Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix. *Orthopedics* **27**, s161-165 (2004).
 126. Stroup, G.B. et al. Potent and selective inhibition of human cathepsin K leads to inhibition of bone resorption in vivo in a nonhuman primate. *J. Bone Miner. Res* **16**, 1739-1746 (2001).
 127. Missbach, M. et al. A novel inhibitor of the tyrosine kinase Src suppresses phosphorylation of its major cellular substrates and reduces bone resorption in vitro and in rodent models in vivo. *Bone* **24**, 437-449 (1999).
 128. Badger, A.M. et al. Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **279**, 1453-1461 (1996).
 129. Qin, J. et al. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* **65**, 6282-6293 (2005).
 130. Rodan, G.A. & Reszka, A.A. Osteoporosis and bisphosphonates. *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 3**, 8-12 (2003).
 131. Coleman, R.E. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat. Rev* **27**, 165-176 (2001).
 132. Roelofs, A.J., Thompson, K., Gordon, S. & Rogers, M.J. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin. Cancer Res* **12**, 6222s-6230s (2006).

133. Lane, K.T. & Beese, L.S. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J. Lipid Res* **47**, 681-699 (2006).
134. Mönkkönen, H. et al. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br. J. Pharmacol* **147**, 437-445 (2006).
135. Ory, B. et al. Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* **104**, 2522-2529 (2005).
136. Heymann, D. et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* **37**, 74-86 (2005).
137. Heath, D.J. et al. An osteoprotegerin-like peptidomimetic inhibits osteoclastic bone resorption and osteolytic bone disease in myeloma. *Cancer Res* **67**, 202-208 (2007).
138. Vanderkerken, K. et al. Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma. *Cancer Res* **63**, 287-289 (2003).
139. Morony, S. et al. Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res* **61**, 4432-4436 (2001).
140. Body, J. et al. A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer. *Clin. Cancer Res* **12**, 1221-1228 (2006).
141. Lipton, A. et al. Extended efficacy and safety of denosumab in breast cancer patients with bone metastases not receiving prior bisphosphonate therapy. *Clin. Cancer Res* **14**, 6690-6696 (2008).
142. Zhao, Y. et al. Enhanced chemosensitivity of drug-resistant osteosarcoma cells by lentivirus-mediated Bcl-2 silencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **390**, 642-647 (2009).
143. Bisanz, K. et al. Targeting ECM-integrin interaction with liposome-encapsulated small interfering RNAs inhibits the growth of human prostate cancer in a bone xenograft imaging model. *Mol. Ther* **12**, 634-643 (2005).
144. Hu-Lieskovan, S., Heidel, J.D., Bartlett, D.W., Davis, M.E. & Triche, T.J. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* **65**, 8984-8992 (2005).
145. Wang, R. et al. Inhibiting proliferation and enhancing chemosensitivity to taxanes in osteosarcoma cells by RNA interference-mediated downregulation of stathmin expression. *Mol. Med* **13**, 567-575 (2007).
146. Major, C.C., Borggren, C.L. & Devries, R.M. Traumatic hand fracture in a patient with osteogenesis imperfecta. *J Chiropr Med* **7**, 155-160 (2008).
147. Kindelan, J., Tobin, M., Roberts-Harry, D. & Loukota, R.A. Orthodontic and orthognathic management of a patient with osteogenesis imperfecta and dentinogenesis imperfecta: a case report. *J Orthod* **30**, 291-296 (2003).
148. Manu Varshney, D., Preeti Goyal Varshney, M., Lalit Gupta, D. & Poonam Bhaduria, M. A successfully managed case of Brittle Bone disease and associated abnormalities. (2009).
149. Azrak, S., Ksyar, R. & Ben Raïs, N. Les complications orthopédiques de l'ostéogenèse imparfaite. *Médecine nucléaire* **33**, 749-753 (2009).
150. Martin, E. & Shapiro, J.R. Osteogenesis imperfecta: epidemiology and pathophysiology. *Curr Osteoporos Rep* **5**, 91-97 (2007).
151. Sillence, D.O., Senn, A. & Danks, D.M. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J. Med. Genet* **16**, 101-116 (1979).

152. Paterson, C.R. Heterogeneity of osteogenesis imperfecta congenita. *Lancet* **1**, 821 (1980).
153. Verstreken, M., Claes, J. & Van de Heyning, P.H. Osteogenesis imperfecta and hearing loss. *Acta Otorhinolaryngol Belg* **50**, 91-98 (1996).
154. Byers, P.H., Tsipouras, P., Bonadio, J.F., Starman, B.J. & Schwartz, R.C. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta (OI type II): a biochemically heterogeneous disorder usually due to new mutations in the genes for type I collagen. *Am. J. Hum. Genet* **42**, 237-248 (1988).
155. Goldman, A.B., Davidson, D., Pavlov, H. & Bullough, P.G. "Popcorn" calcifications: a prognostic sign in osteogenesis imperfecta. *Radiology* **136**, 351-358 (1980).
156. Marini, J.C., Bordenick, S., Heavner, G., Rose, S. & Chrousos, G.P. Evaluation of growth hormone axis and responsiveness to growth stimulation of short children with osteogenesis imperfecta. *Am. J. Med. Genet* **45**, 261-264 (1993).
157. Willing, M.C., Pruchno, C.J., Atkinson, M. & Byers, P.H. Osteogenesis imperfecta type I is commonly due to a COL1A1 null allele of type I collagen. *Am. J. Hum. Genet* **51**, 508-515 (1992).
158. Van Dijk, F.S., Pals, G., Van Rijn, R.R., Nikkels, P.G.J. & Cobben, J.M. Classification of Osteogenesis Imperfecta revisited. *Eur J Med Genet* **53**, 1-5 (2010).
159. Glorieux, F.H. et al. Type V osteogenesis imperfecta: a new form of brittle bone disease. *J. Bone Miner. Res* **15**, 1650-1658 (2000).
160. Glorieux, F.H. et al. Osteogenesis imperfecta type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. *J. Bone Miner. Res* **17**, 30-38 (2002).
161. Marini, J.C., Cabral, W.A. & Barnes, A.M. Null mutations in LEPRE1 and CRTAP cause severe recessive osteogenesis imperfecta. *Cell Tissue Res* **339**, 59-70 (2010).
162. Cabral, W.A. et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat. Genet* **39**, 359-365 (2007).
163. Barnes, A.M. et al. Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta. *N. Engl. J. Med* **355**, 2757-2764 (2006).
164. Morello, R. et al. CRTAP is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell* **127**, 291-304 (2006).
165. Kuivaniemi, H., Tromp, G. & Prockop, D.J. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum. Mutat* **9**, 300-315 (1997).
166. Wheeler, P., Young, B. & Heath, J. *Histologie fonctionnelle*. Livre d'histologie aux éditions De Boeck: 2004.
167. Willing, M.C. et al. Osteogenesis imperfecta type I: molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles of type I collagen. *Am. J. Hum. Genet* **55**, 638-647 (1994).
168. Millington-Ward, S., McMahon, H.P. & Farrar, G.J. Emerging therapeutic approaches for osteogenesis imperfecta. *Trends Mol Med* **11**, 299-305 (2005).
169. Sykes, B. The molecular genetics of collagen. *Bioessays* **3**, 112-117 (1985).
170. Byers, P.H., Wallis, G.A. & Willing, M.C. Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. *J. Med. Genet* **28**, 433-442 (1991).
171. Wilkinson, J.M., Scott, B.W., Clarke, A.M. & Bell, M.J. Surgical stabilisation of the lower limb in osteogenesis imperfecta using the Sheffield Telescopic Intramedullary Rod System. *J Bone Joint Surg Br* **80**, 999-1004 (1998).
172. Chevrel, G. & Meunier, P.J. Osteogenesis imperfecta: lifelong management is imperative and feasible. *Joint Bone Spine* **68**, 125-129 (2001).
173. Camacho, N.P. et al. A controlled study of the effects of alendronate in a growing mouse model of osteogenesis imperfecta. *Calcif. Tissue Int* **69**, 94-101 (2001).

174. Glorieux, F.H. et al. Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. *N. Engl. J. Med* **339**, 947-952 (1998).
175. Plotkin, H. et al. Pamidronate treatment of severe osteogenesis imperfecta in children under 3 years of age. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **85**, 1846-1850 (2000).
176. Glorieux, F.H. Experience with bisphosphonates in osteogenesis imperfecta. *Pediatrics* **119 Suppl 2**, S163-165 (2007).
177. Akcay, T., Turan, S., Guran, T. & Bereket, A. Alendronate treatment in children with osteogenesis imperfecta. *Indian Pediatr* **45**, 105-109 (2008).
178. Rauch, F. & Glorieux, F.H. Bisphosphonate treatment in osteogenesis imperfecta: which drug, for whom, for how long? *Ann. Med* **37**, 295-302 (2005).
179. Bachrach, L.K. & Ward, L.M. Clinical review 1: Bisphosphonate use in childhood osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **94**, 400-409 (2009).
180. Baksh, D., Song, L. & Tuan, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med* **8**, 301-316 (2004).
181. Barry, F.P. & Murphy, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **36**, 568-584 (2004).
182. Liechty, K.W. et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat. Med* **6**, 1282-1286 (2000).
183. Allers, C. et al. Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation* **78**, 503-508 (2004).
184. Rombouts, W.J.C. & Ploemacher, R.E. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* **17**, 160-170 (2003).
185. Horwitz, E.M. et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat. Med* **5**, 309-313 (1999).
186. Horwitz, E.M. et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 8932-8937 (2002).
187. Le Blanc, K. et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation* **79**, 1607-1614 (2005).
188. Ghosh, A.K. Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **227**, 301-314 (2002).
189. Sandberg, M.M. Matrix in cartilage and bone development: current views on the function and regulation of major organic components. *Ann. Med* **23**, 207-217 (1991).
190. Grassi, G. & Marini, J.C. Ribozymes: structure, function, and potential therapy for dominant genetic disorders. *Ann. Med* **28**, 499-510 (1996).
191. Wang, Q. & Marini, J.C. Antisense oligodeoxynucleotides selectively suppress expression of the mutant alpha 2(I) collagen allele in type IV osteogenesis imperfecta fibroblasts. A molecular approach to therapeutics of dominant negative disorders. *J. Clin. Invest* **97**, 448-454 (1996).
192. Cech, T.R. Ribozymes, the first 20 years. *Biochem. Soc. Trans* **30**, 1162-1166 (2002).
193. Toudjarska, I., Kilpatrick, M.W., Niu, J., Wenstrup, R.J. & Tsipouras, P. Delivery of a hammerhead ribozyme specifically downregulates mutant type I collagen mRNA in a murine model of osteogenesis imperfecta. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **11**, 341-346 (2001).
194. Bertrand, J. et al. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **296**, 1000-1004 (2002).

195. Klein, B. et al. Studies of bone and soft-tissue tumours induced in rats with radioactive cerium chloride. *Int. J. Cancer* **20**, 112-119 (1977).
196. Fisher, J.L., Mackie, P.S., Howard, M.L., Zhou, H. & Choong, P.F. The expression of the urokinase plasminogen activator system in metastatic murine osteosarcoma: an in vivo mouse model. *Clin. Cancer Res* **7**, 1654-1660 (2001).
197. Singh, I., Hatheway, J.M., Tsang, K.Y., Blakemore, W.S. & McAllister, R.M. An animal model for human osteosarcoma. *Surgery* **81**, 168-175 (1977).
198. Brounais, B. et al. Oncostatin M induces bone loss and sensitizes rat osteosarcoma to the antitumor effect of Midostaurin in vivo. *Clin. Cancer Res* **14**, 5400-5409 (2008).
199. Nakano, T. et al. Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma. *Clin. Exp. Metastasis* **20**, 665-674 (2003).
200. Thiéry, J., Perdereau, B., Gongora, G. & Mazabraud, A. Un modèle expérimental d'ostéosarcome chez le rat. Article spécialisé (Sem Hôp Paris), 1686-9 (1982).
201. Cherrier, B. et al. A new experimental rat model of osteosarcoma established by intrafemoral tumor cell inoculation, useful for biology and therapy investigations. *Tumour Biol* **26**, 121-130 (2005).
202. Uesugi, M., Koshino, T., Mitsugi, N. & Hiruma, T. Predictive value of serum immunosuppressive acidic protein for lung metastasis after amputation of murine osteosarcoma of the lower limb. *Cancer Lett* **155**, 169-172 (2000).
203. Aagaard, L. & Rossi, J.J. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev* **59**, 75-86 (2007).
204. Detzer, A., Overhoff, M., Mescalchin, A., Rompf, M. & Sczakiel, G. Phosphorothioate-stimulated cellular uptake of siRNA: a cell culture model for mechanistic studies. *Curr. Pharm. Des* **14**, 3666-3673 (2008).
205. Oliveira, S., van Rooy, I., Kranenburg, O., Storm, G. & Schiffelers, R.M. Fusogenic peptides enhance endosomal escape improving siRNA-induced silencing of oncogenes. *Int J Pharm* **331**, 211-214 (2007).
206. Oh, Y. & Park, T.G. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev* **61**, 850-862 (2009).
207. Kim, S., Garg, H., Joshi, A. & Manjunath, N. Strategies for targeted nonviral delivery of siRNAs in vivo. *Trends Mol Med* **15**, 491-500 (2009).
208. Dykxhoorn, D.M., Palliser, D. & Lieberman, J. The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther* **13**, 541-552 (2006).
209. Zámecník, J., Vargová, L., Homola, A., Kodeř, R. & Syková, E. Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. *Neuropathol. Appl. Neurobiol* **30**, 338-350 (2004).
210. Voinea, M. & Simionescu, M. Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs. *J. Cell. Mol. Med* **6**, 465-474 (2002).
211. Tranchant, I., Thompson, B., Nicolazzi, C., Mignet, N. & Scherman, D. Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, S24-35 (2004).
212. Bergstrand, N. & Edwards, K. Effects of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers on structure and stability of liposomal dioleoylphosphatidylethanolamine. *J Colloid Interface Sci* **276**, 400-407 (2004).
213. Pichon, C., Billiet, L. & Midoux, P. Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Curr Opin Biotechnol* (2010).
214. Masotti, A. et al. Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids Surf B Biointerfaces* **68**, 136-144 (2009).
215. Parker, A.L., Newman, C., Briggs, S., Seymour, L. & Sheridan, P.J. Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol*

- Med* **5**, 1-15 (2003).
216. Tagami, T., Barichello, J.M., Kikuchi, H., Ishida, T. & Kiwada, H. The gene-silencing effect of siRNA in cationic lipoplexes is enhanced by incorporating pDNA in the complex. *Int J Pharm* **333**, 62-69 (2007).
217. Rhinn, H. et al. How to make siRNA lipoplexes efficient? Add a DNA cargo. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 219-230 (2009).
218. Dutour, A. et al. Is troponin I gene therapy effective for osteosarcoma treatment? Study on a human-like orthotopic rat model. *Anticancer Res* **24**, 3977-3982 (2004).
219. Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. & Barik, S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat. Med* **11**, 50-55 (2005).
220. Wu, S.Y. & McMillan, N.A.J. Lipidic systems for in vivo siRNA delivery. *AAPS J* **11**, 639-652 (2009).
221. Roman-Blas, J.A. & Jimenez, S.A. NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthr. Cartil* **14**, 839-848 (2006).
222. Tomita, T. et al. Suppressed severity of collagen-induced arthritis by in vivo transfection of nuclear factor kappaB decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. *Arthritis Rheum* **42**, 2532-2542 (1999).
223. Schiffelers, R.M., Xu, J., Storm, G., Woodle, M.C. & Scaria, P.V. Effects of treatment with small interfering RNA on joint inflammation in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **52**, 1314-1318 (2005).
224. Nogawa, M. et al. Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J. Clin. Invest* **115**, 978-985 (2005).
225. Kim, S.H., Jeong, J.H., Lee, S.H., Kim, S.W. & Park, T.G. Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. *J Control Release* **129**, 107-116 (2008).
226. Jackson, A.L. et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol* **21**, 635-637 (2003).
227. Semizarov, D. et al. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**, 6347-6352 (2003).
228. Ballou, B., Ernst, L.A. & Waggoner, A.S. Fluorescence imaging of tumors in vivo. *Curr. Med. Chem* **12**, 795-805 (2005).
229. Tao, W. et al. Noninvasive Imaging of Lipid Nanoparticle-Mediated Systemic Delivery of Small-Interfering RNA to the Liver. *Mol Ther* (2010).doi:10.1038/mt.2010.147
230. Rehemtulla, A. et al. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia* **2**, 491-495 (2000).
231. Zhang, W. et al. Rapid in vivo functional analysis of transgenes in mice using whole body imaging of luciferase expression. *Transgenic Res* **10**, 423-434 (2001).
232. Bogdanov, A.A. Merging molecular imaging and RNA interference: early experience in live animals. *J. Cell. Biochem* **104**, 1113-1123 (2008).
233. Wang, Q. et al. Delivery and inhibition of reporter genes by small interfering RNAs in a mouse skin model. *J. Invest. Dermatol* **127**, 2577-2584 (2007).
234. Takeshita, F. et al. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102**, 12177-12182 (2005).
235. Heymann, D. et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* **37**, 74-86 (2005).
236. Studeny, M. et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J. Natl. Cancer Inst* **96**, 1593-1603 (2004).
237. Vilquin, J. & Rosset, P. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair:

- current status. *Regen Med* **1**, 589-604 (2006).
238. O'Neill, K., Lyons, S.K., Gallagher, W.M., Curran, K.M. & Byrne, A.T. Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research. *J. Pathol* **220**, 317-327 (2010).
239. Lacey, D.L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165-176 (1998).
240. Yasuda, H. et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* **139**, 1329-1337 (1998).
241. Collin-Osdoby, P. et al. 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* **276**, 20659-20672 (2001).
242. Fuller, K., Wong, B., Fox, S., Choi, Y. & Chambers, T.J. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J. Exp. Med* **188**, 997-1001 (1998).
243. Wong, B.R. et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol. Cell* **4**, 1041-1049 (1999).
244. Yasuda, H. et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 3597-3602 (1998).
245. O'Brien, C.A., Gubrij, I., Lin, S.C., Saylor, R.L. & Manolagas, S.C. STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J. Biol. Chem* **274**, 19301-19308 (1999).
246. Wei, S., Kitaura, H., Zhou, P., Ross, F.P. & Teitelbaum, S.L. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest* **115**, 282-290 (2005).
247. Kim, S., Yamazaki, M., Zella, L.A., Shevde, N.K. & Pike, J.W. Activation of receptor activator of NF-kappaB ligand gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is mediated through multiple long-range enhancers. *Mol. Cell. Biol* **26**, 6469-6486 (2006).
248. Silvestrini, G. et al. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in femur and tibia of the rat. *J. Mol. Histol* **36**, 59-67 (2005).
249. Ikeda, T., Utsuyama, M. & Hirokawa, K. Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor kappaB, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J. Bone Miner. Res* **16**, 1416-1425 (2001).
250. Kartsogiannis, V. et al. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskelatal tissues. *Bone* **25**, 525-534 (1999).
251. Corral, D.A. et al. Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 13835-13840 (1998).
252. Kishimoto, K., Kitazawa, R., Kurosaka, M., Maeda, S. & Kitazawa, S. Expression profile of genes related to osteoclastogenesis in mouse growth plate and articular cartilage. *Histochem. Cell Biol* **125**, 593-602 (2006).
253. Sakakura, Y. et al. Immunolocalization of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in Meckel's cartilage compared with developing endochondral bones in mice. *J. Anat* **207**, 325-337 (2005).
254. Masuyama, R. et al. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J. Clin. Invest* **116**, 3150-3159 (2006).
255. Fukui, N., Zhu, Y., Maloney, W.J., Clohisy, J. & Sandell, L.J. Stimulation of BMP-2

- expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 3**, 59-66 (2003).
256. Usui, M. et al. Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP2. *J. Bone Miner. Res* **23**, 314-325 (2008).
257. Kong, Y.Y. et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315-323 (1999).
258. 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* **64**, 2334-2350 (2007).
259. Fionda, C. et al. 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 negatively regulates rankl gene expression in activated T lymphocytes: role of NF-kappaB and early growth response transcription factors. *J. Immunol* **178**, 4039-4050 (2007).
260. Kim, H. et al. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *FASEB J* **17**, 2163-2165 (2003).
261. Kim, Y. 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* **277**, 6799-6805 (2002).
262. Jones, D.H. et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* **440**, 692-696 (2006).
263. Armstrong, A.P. et al. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate* **68**, 92-104 (2008).
264. Mikami, S. et al. Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. *J. Pathol* **218**, 530-539 (2009).
265. 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* **24**, 235-242 (2009).
266. Huang, L., Cheng, Y.Y., Chow, L.T.C., Zheng, M.H. & Kumta, S.M. Tumour cells produce receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in skeletal metastases. *J. Clin. Pathol* **55**, 877-878 (2002).
267. Dossing, D.A. & Stern, P.H. Receptor activator of NF-kappaB ligand protein expression in UMR-106 cells is differentially regulated by parathyroid hormone and calcitriol. *J. Cell. Biochem* **95**, 1029-1041 (2005).
268. Lamoureux, F. Ciblage thérapeutique des tumeurs osseuses primitives par transfert de gène. Thèse de doctorat réalisée au sein du laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse et soutenue publiquement en 2008.
269. 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* **142**, 1419-1426 (2001).
270. Lum, L. 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* **274**, 13613-13618 (1999).
271. Schlöndorff, J., Lum, L. & Blobel, C.P. Biochemical and pharmacological criteria define two shedding activities for TRANCE/OPGL that are distinct from the tumor necrosis factor alpha convertase. *J. Biol. Chem* **276**, 14665-14674 (2001).
272. Lynch, C.C. et al. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell* **7**, 485-496 (2005).
273. Hikita, A. et al. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J. Biol. Chem* **281**, 36846-36855 (2006).
274. Reynolds, A. et al. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol*

- 22**, 326-330 (2004).
275. Kwan-Tat, S. Les isoformes de RANKL : Rôle dans la biodisponibilité de l'OPG et clivage protéolytique de la forme membranaire. Thèse de doctorat réalisée au sein du laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse et soutenue publiquement en 2006.
276. Judge, A.D. et al. Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *J. Clin. Invest* **119**, 661-673 (2009).
277. Kutscher, S. et al. MVA-nef induces HIV-1-specific polyfunctional and proliferative T-cell responses revealed by the combination of short- and long-term immune assays. *Gene Ther* (2010).doi:10.1038/gt.2010.90
278. Thomas, M. & Klibanov, A.M. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **62**, 27-34 (2003).
279. Meyer, O. et al. Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides. *J. Biol. Chem* **273**, 15621-15627 (1998).
280. Wheeler, J.J. et al. Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. *Gene Ther* **6**, 271-281 (1999).
281. Laakkonen, P. & Vuorinen, K. Homing peptides as targeted delivery vehicles. *Integr Biol (Camb)* **2**, 326-337 (2010).
282. Ogris, M. & Wagner, E. Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes. *Somat. Cell Mol. Genet* **27**, 85-95 (2002).
283. Knowles, H.J., Schaefer, K., Dirksen, U. & Athanasou, N.A. Hypoxia and hypoglycaemia in Ewing's sarcoma and osteosarcoma: regulation and phenotypic effects of Hypoxia-Inducible Factor. *BMC Cancer* **10**, 372 (2010).
284. Duan, X. et al. Association of alphavbeta3 integrin expression with the metastatic potential and migratory and chemotactic ability of human osteosarcoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* **21**, 747-753 (2004).
285. Wadas, T.J. et al. Targeting the alphavbeta3 integrin for small-animal PET/CT of osteolytic bone metastases. *J. Nucl. Med* **50**, 1873-1880 (2009).
286. Chen, X. et al. MicroPET imaging of breast cancer alphav-integrin expression with ⁶⁴Cu-labeled dimeric RGD peptides. *Mol Imaging Biol* **6**, 350-359 (2004).
287. Chen, X. et al. ¹⁸F-labeled RGD peptide: initial evaluation for imaging brain tumor angiogenesis. *Nucl. Med. Biol* **31**, 179-189 (2004).
288. Dutour, A. Utilisation de peptides RGD couplés à un fluorochrome pour la définition des marges de résection de l'exérèse tumorale de l'ostéosarcome. Conférence invitée au laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse en 2009.
289. Boerman, O.C., Laverman, P., Oyen, W.J., Corstens, F.H. & Storm, G. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. *Prog. Lipid Res* **39**, 461-475 (2000).
290. Delépine, P. et al. Biodistribution study of phosphonolipids: a class of non-viral vectors efficient in mice lung-directed gene transfer. *J Gene Med* **5**, 600-608 (2003).
291. Chopra A 1-[¹⁸F]Fluoro-3,6-dioxatetracosane [Molecular Imaging and Contrast Agent Database. 2004] - PubMed result. (2009).à <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed>>
292. Avnet, S. et al. Increased osteoclast activity is associated with aggressiveness of osteosarcoma. *Int. J. Oncol* **33**, 1231-1238 (2008).
293. Brounais, B. et al. Novel anti-cancer strategy in bone tumors by targeting molecular and cellular modulators of bone resorption. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **3**, 178-186 (2008).
294. Green, J.R. Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist* **9 Suppl 4**, 3-13 (2004).
295. Neville-Webbe, H.L. & Coleman, R.E. Bisphosphonates and RANK ligand inhibitors for the treatment and prevention of metastatic bone disease. *Eur. J. Cancer* **46**,

- 1211-1222 (2010).
296. Demers, L.M. et al. Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease. *Clin. Chem* **41**, 1489-1494 (1995).
297. Lipton, A. et al. The new bisphosphonate, Zometa (zoledronic acid), decreases skeletal complications in both osteolytic and osteoblastic lesions: a comparison to pamidronate. *Cancer Invest* **20 Suppl 2**, 45-54 (2002).
298. Saad, F. et al. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst* **94**, 1458-1468 (2002).
299. Bekker, P.J. et al. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res* **16**, 348-360 (2001).
300. Body, J. et al. A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer* **97**, 887-892 (2003).
301. Lipton, A. New therapeutic agents for the treatment of bone diseases. *Expert Opin Biol Ther* **5**, 817-832 (2005).
302. von Knoch, F. et al. Suppression of polyethylene particle-induced osteolysis by exogenous osteoprotegerin. *J Biomed Mater Res A* **75**, 288-294 (2005).
303. Emery, J.G. et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem* **273**, 14363-14367 (1998).
304. Lamoureux, F. et al. Regulation of osteoprotegerin pro- or anti-tumoral activity by bone tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta* **1805**, 17-24 (2010).
305. Bekker, P.J. et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res* **19**, 1059-1066 (2004).
306. Kostenuik, P.J. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Curr Opin Pharmacol* **5**, 618-625 (2005).
307. Schwarz, E.M. & Ritchlin, C.T. Clinical development of anti-RANKL therapy. *Arthritis Res. Ther* **9 Suppl 1**, S7 (2007).
308. Launay-Vacher, V. et al. Drug management of prostate cancer: prevalence and consequences of renal insufficiency. *Clin Genitourin Cancer* **7**, E83-89 (2009).
309. Yamashita, J., McCauley, L.K. & Van Poznak, C. Updates on osteonecrosis of the jaw. *Curr Opin Support Palliat Care* (2010).doi:10.1097/SPC.0b013e32833d303b
310. Manara, M.C. et al. Reversal of malignant phenotype in human osteosarcoma cells transduced with the alkaline phosphatase gene. *Bone* **26**, 215-220 (2000).
311. Nakano, T. et al. Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma. *Clin. Exp. Metastasis* **20**, 665-674 (2003).
312. Canon, J. et al. Inhibition of RANKL increases the anti-tumor effect of the EGFR inhibitor panitumumab in a murine model of bone metastasis. *Bone* **46**, 1613-1619 (2010).
313. Miller, R.E. et al. RANK ligand inhibition plus docetaxel improves survival and reduces tumor burden in a murine model of prostate cancer bone metastasis. *Mol. Cancer Ther* **7**, 2160-2169 (2008).
314. Khoury, M. et al. Efficient suppression of murine arthritis by combined anticytokine small interfering RNA lipoplexes. *Arthritis Rheum* **58**, 2356-2367 (2008).
315. Bargman, R., Huang, A., Boskey, A.L., Raggio, C. & Pleshko, N. RANKL inhibition improves bone properties in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Connect. Tissue Res* **51**, 123-131 (2010).
316. Kubota, H. & Nagata, K. Roles of collagen fibers and its specific molecular chaperone: analysis using HSP47-knockout mice. *Biol. Sci. Space* **18**, 118-119 (2004).

317. Hormuzdi, S.G., Penttinen, R., Jaenisch, R. & Bornstein, P. A gene-targeting approach identifies a function for the first intron in expression of the alpha1(I) collagen gene. *Mol. Cell. Biol* **18**, 3368-3375 (1998).
318. Sengupta, P.K. & Smith, B.D. Methylation in the initiation region of the first exon suppresses collagen pro-alpha2(I) gene transcription. *Biochim. Biophys. Acta* **1443**, 75-89 (1998).
319. Rossert, J., Terraz, C. & Dupont, S. Regulation of type I collagen genes expression. *Nephrol. Dial. Transplant* **15 Suppl 6**, 66-68 (2000).
320. Verrecchia, F. & Mauviel, A. TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cell. Signal* **16**, 873-880 (2004).
321. Sakai, L.Y., Byers, P.H. & Ramirez, F. A report on the 3rd Workshop on Heritable Disorders of Connective Tissue. *Matrix Biol* **21**, 7-13 (2002).
322. Uitto, J. & Kouba, D. Cytokine modulation of extracellular matrix gene expression: relevance to fibrotic skin diseases. *J. Dermatol. Sci* **24 Suppl 1**, S60-69 (2000).
323. Trojanowska, M., LeRoy, E.C., Eckes, B. & Krieg, T. Pathogenesis of fibrosis: type I collagen and the skin. *J. Mol. Med* **76**, 266-274 (1998).
324. Forlino, A., Porter, F.D., Lee, E.J., Westphal, H. & Marini, J.C. Use of the Cre/lox recombination system to develop a non-lethal knock-in murine model for osteogenesis imperfecta with an alpha1(I) G349C substitution. Variability in phenotype in BrtlIV mice. *J. Biol. Chem* **274**, 37923-37931 (1999).
325. Kuznetsova, N.V., Forlino, A., Cabral, W.A., Marini, J.C. & Leikin, S. Structure, stability and interactions of type I collagen with GLY349-CYS substitution in alpha 1(I) chain in a murine Osteogenesis Imperfecta model. *Matrix Biol* **23**, 101-112 (2004).
326. Forlino, A. et al. Differential expression of both extracellular and intracellular proteins is involved in the lethal or nonlethal phenotypic variation of BrtlIV, a murine model for osteogenesis imperfecta. *Proteomics* **7**, 1877-1891 (2007).
327. Kamoun-Goldrat, A.S. & Le Merrer, M.F. Animal models of osteogenesis imperfecta and related syndromes. *J. Bone Miner. Metab* **25**, 211-218 (2007).
328. Kozloff, K.M. et al. Brittle IV mouse model for osteogenesis imperfecta IV demonstrates postpubertal adaptations to improve whole bone strength. *J. Bone Miner. Res* **19**, 614-622 (2004).
329. Schnieke, A. et al. Introduction of the human pro alpha 1(I) collagen gene into pro alpha 1(I)-deficient Mov-13 mouse cells leads to formation of functional mouse-human hybrid type I collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **84**, 764-768 (1987).
330. Niyibizi, C., Smith, P., Mi, Z., Phillips, C.L. & Robbins, P. Transfer of proalpha2(I) cDNA into cells of a murine model of human Osteogenesis Imperfecta restores synthesis of type I collagen comprised of alpha1(I) and alpha2(I) heterotrimers in vitro and in vivo. *J. Cell. Biochem* **83**, 84-91 (2001).
331. Gajko-Galicka, A. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Acta Biochim. Pol* **49**, 433-441 (2002).
332. Chamberlain, J.R. et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science* **303**, 1198-1201 (2004).
333. Chamberlain, J.R. et al. Gene targeting of mutant COL1A2 alleles in mesenchymal stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Mol. Ther* **16**, 187-193 (2008).
334. Rossert, J., Brideau, G., Terraz, C. & Lejard, V. Régulation de l'expression des gènes codant pour le collagène de type I. Article spécialisé aux éditions Flammarion Médecine Sciences, Actualités néphrologiques 47-62 (2003).
335. Millington-Ward, S. et al. RNAi of COL1A1 in mesenchymal progenitor cells. *Eur. J. Hum. Genet* **12**, 864-866 (2004).
336. Alves, S. et al. Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates

- neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. *PLoS ONE* **3**, e3341 (2008).
337. Klootwijk, R.D. et al. Allele-specific silencing of the dominant disease allele in sialuria by RNA interference. *FASEB J* **22**, 3846-3852 (2008).
338. Xia, X., Zhou, H., Huang, Y. & Xu, Z. Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit in vivo. *Neurobiol. Dis* **23**, 578-586 (2006).
339. Rodriguez-Lebron, E. & Paulson, H.L. Allele-specific RNA interference for neurological disease. *Gene Ther* **13**, 576-581 (2006).
340. Gonzalez-Alegre, P., Miller, V.M., Davidson, B.L. & Paulson, H.L. Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant TorsinA. *Ann. Neurol* **53**, 781-787 (2003).
341. Del Fattore, A., Capannolo, M., Rucci, N. & Teti, A. New experimental therapeutic approach by siRNA for autosomal dominant osteopetrosis (ADO). Conférence publique au congrès de l'IBMS en 2010.
342. Ding, H. et al. Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis. *Aging Cell* **2**, 209-217 (2003).
343. Schwarz, D.S. et al. Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS Genet* **2**, e140 (2006).
344. Demaison, C. et al. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum. Gene Ther* **13**, 803-813 (2002).
345. Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J. & Baltimore, D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295**, 868-872 (2002).
346. Desigaux, L. et al. Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung. *Hum. Gene Ther* **16**, 821-829 (2005).
347. Boussif, O. et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **92**, 7297-7301 (1995).
348. Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-553 (2002).
349. Chang, J.T. An economic and efficient method of RNAi vector constructions. *Anal. Biochem* **334**, 199-200 (2004).
350. Vandesompele, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034 (2002).
351. Deschaseaux, F., Sensébé, L. & Heymann, D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med* **15**, 417-429 (2009).
352. Mosna, F., Sensebé, L. & Krampera, M. Human Bone-Marrow And Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells: A User's Guide. *Stem Cells Dev* (2010).doi:10.1089/scd.2010.0140
353. Li, F., Wang, X. & Niyibizi, C. Distribution of single-cell expanded marrow derived progenitors in a developing mouse model of osteogenesis imperfecta following systemic transplantation. *Stem Cells* **25**, 3183-3193 (2007).
354. Panaroni, C. et al. In utero transplantation of adult bone marrow decreases perinatal lethality and rescues the bone phenotype in the knockin murine model for classical, dominant osteogenesis imperfecta. *Blood* **114**, 459-468 (2009).
355. Guillot, P.V. et al. Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first-trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. *Blood* **111**, 1717-1725 (2008).
356. Roybal, J.L., Santore, M.T. & Flake, A.W. Stem cell and genetic therapies for the fetus. *Semin Fetal Neonatal Med* **15**, 46-51 (2010).

357. Peranteau, W.H. et al. Haploidentical in utero hematopoietic cell transplantation improves phenotype and can induce tolerance for postnatal same-donor transplants in the canine leukocyte adhesion deficiency model. *Biol. Blood Marrow Transplant* **15**, 293-305 (2009).
358. Cavazzana-Calvo, M. et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669-672 (2000).
359. Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S. & Cavazzana-Calvo, M. 20 years of gene therapy for SCID. *Nat. Immunol* **11**, 457-460 (2010).
360. Cavazzana-Calvo, M. & Fischer, A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J. Clin. Invest* **117**, 1456-1465 (2007).
361. Trono, D. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther* **7**, 20-23 (2000).
362. Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J.K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90**, 8033-8037 (1993).
363. Cronin, J., Zhang, X. & Reiser, J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* **5**, 387-398 (2005).
364. Park, F. & Kay, M.A. Modified HIV-1 based lentiviral vectors have an effect on viral transduction efficiency and gene expression in vitro and in vivo. *Mol. Ther* **4**, 164-173 (2001).
365. Cartier, N. et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* **326**, 818-823 (2009).
366. Phinney, D.G. & Prockop, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* **25**, 2896-2902 (2007).
367. Grimm, D. et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**, 537-541 (2006).
368. An, D.S. et al. Optimization and functional effects of stable short hairpin RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors. *Mol. Ther* **14**, 494-504 (2006).
369. McBride, J.L. et al. Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 5868-5873 (2008).
370. Castanotto, D. et al. Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. *Nucleic Acids Res* **35**, 5154-5164 (2007).
371. Lindahl, K., Rubin, C., Kindmark, A. & Ljunggren, O. Allele dependent silencing of COL1A2 using small interfering RNAs. *Int J Med Sci* **5**, 361-365 (2008).

Safety Concern between Autologous Fat Graft, Mesenchymal Stem Cell and Osteosarcoma Recurrence

Pierre Perrot^{1,2,3}, Julie Rousseau^{1,2}, Anne-Laure Bouffaut^{1,2,3}, Françoise Rédini^{1,2}, Elisabeth Cassagnau⁴, Frédéric Deschaseaux⁵, Marie-Françoise Heymann^{1,2,4}, Dominique Heymann^{1,2}, Franck Duteille^{1,2,3}, Valérie Trichet^{1,2}, François Gouin^{1,2,6*}

1 INSERM, U957, Nantes, France, **2** Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, France, **3** Centre Hospitalier Universitaire, Service de Chirurgie Plastique et des Brûlés, Nantes, France, **4** Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Anatomie Pathologique, Nantes, France, **5** Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, EA3855, Tours, France, **6** Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Orthopédie-Traumatologie, Pôle Ostéo-articulaire, Nantes, France

Abstract

Background: Osteosarcoma is the most common malignant primary bone tumour in young adult treated by neo adjuvant chemotherapy, surgical tumor removal and adjuvant multidrug chemotherapy. For correction of soft tissue defect consecutive to surgery and/or tumor treatment, autologous fat graft has been proposed in plastic and reconstructive surgery.

Principal Findings: We report here a case of a late local recurrence of osteosarcoma which occurred 13 years after the initial pathology and 18 months after a lipofilling procedure. Because such recurrence was highly unexpected, we investigated the possible relationship of tumor growth with fat injections and with mesenchymal stem/stromal cell like cells which are largely found in fatty tissue. Results obtained in osteosarcoma pre-clinical models show that fat grafts or progenitor cells promoted tumor growth.

Significance: These observations and results raise the question of whether autologous fat grafting is a safe reconstructive procedure in a known post neoplastic context.

Citation: Perrot P, Rousseau J, Bouffaut A-L, Rédini F, Cassagnau E, et al. (2010) Safety Concern between Autologous Fat Graft, Mesenchymal Stem Cell and Osteosarcoma Recurrence. PLoS ONE 5(6): e10999. doi:10.1371/journal.pone.0010999

Editor: Peter McCulloch, University of Oxford, United Kingdom

Received: October 9, 2009; **Accepted:** May 14, 2010; **Published:** June 8, 2010

Copyright: © 2010 Perrot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fondation pour l'Avenir de la Recherche Médicale Appliquée (study ET 8-486, Paris, France), Ligue contre le cancer/ Canceropole Grand Ouest/Regions Bretagne, Centre, Pays de la Loire, Poitou-Charentes (convention DAFCG/7506, Nantes, France). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: francois.gouin@chu-nantes.fr

Introduction

In plastic and reconstructive surgery, autologous fat grafting enables soft tissue augmentation and is increasingly used for cosmetic indications but also for correction of defect following tumor treatment. This procedure proposed by Coleman was applied first for facial remodelling and more recently for breast augmentation [1,2]. This lipofilling procedure is usually considered as a safe procedure and does not require a permit application. Indeed it consists of autologous tissue injection in a site of defect, directly after harvesting without *ex vivo* expansion.

The only safety concern which was predicted in 1987 by the American Society of Plastic and Reconstructive Surgeons was that fat grafting may compromise breast cancer detection by inducing microcalcifications. In fact a recent clinical study has demonstrated that previous breast augmentation leads to difficulties for breast cancer detection and for tumor management and reconstruction procedure [3]. Concerning breast reconstruction after mastectomy, fat injection seems to be accepted, but it remains controversial to treat cosmetic sequelae after conservative breast surgical treatment [4,5]. Indeed one safety question

concerns the potential risk of recurrence caused by fat injection side effect, but this question remains unanswered for breast cancer as relapse incidence is already high for certain groups of patients.

In contrast, late local recurrence is an unexpected event after complete remission of an osteosarcoma. Only 5% of patients with recurrent disease have local recurrence and such event occurs at a median time ranging from 6 to 28 months as reported by Ferrari *et al.* [6]. Additionally these authors have observed a disease free survival of 46% stable from the 8th to 12th year. In another study, Meyers *et al.* have found the latest recurrence at the 9th year [7]. Bielack *et al.* have only reported 2 cases of late relapse over the 204 patients followed during 10 years; both were distant relapses with no local recurrence [8]. In fact, late local recurrence (after 15 to 20 years) has only been reported for low grade parosteal osteosarcoma subtype [9].

Here we report an unexpected local osteosarcoma relapse which occurred at the exact site of autologous fat grafts in a female patient who did not present any predictive factor of local recurrence. Previous experimental osteosarcoma models have been widely used to set up new therapeutic protocols and to

understand the interactions between osteosarcomas and their environment [10,11,12]. In this study, pre-clinical experiments were set up using a human osteosarcoma model induced in athymic nude mice to determine whether tumor growth may be modified by fat grafts. Because we observed that tumor growth was promoted by fat injection, we investigated the role of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs), as fat tissue is a well-known source of MSC-like cells whose implication in cancer is controversial.

Materials and Methods

Ethics statement

- A surplus of human adipose tissue was used to isolate human mesenchymal stem cells and for injection in mice. This fat surplus was obtained from a female patient in the course of an aesthetic abdominal liposuction. The oral consent of the patient was obtained for the use of fat sample for research. A written consent was not necessary because it was anonymized unlinked research in accordance with French law (Art. L. 1245-2 du code de la santé publique, Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 Journal Officiel du 7 août 2004).

- All research involving animals were conducted following the guidelines (named "Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale") of the French ethical committee (named "Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale") and have been approved by the committee named CEEA.PdL.06.

Coleman's procedure

Coleman's procedure was performed over one female patient under general anesthesia [1]. The fat donor site was the abdominal subcutaneous tissues. The fat was taken using a cannula connected to a 10 ml Luer-Lock syringe. A steel stopper device helped to maintain the vacuum in the syringe during the aspiration phase. The sampling syringes were sealed and centrifuged at 3000 rpm for 3 min. After centrifugation the sample was separated into 3 layers: the upper yellow layer composed of oil from destruction of fat fragment, the middle layer composed of the adipose tissue graft and the bottom one composed of blood. The top and bottom layers were discarded and fatty tissue is injected through 1-mm incisions in subcutaneous and muscle tissue to obtain a filling effect.

Cell culture

SaOS2 cell line. The human osteosarcoma cell line SaOS2 was initially derived from an 11-year old Caucasian girl [13]. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Biowhittaker, Verviers, Belgium) with 1% antibiotic mixture (Penicillin 100 U/ml and Streptomycin 100 mg/l; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Dominique Dutscher, Brumath, France), at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂/95% air). The cells were harvested at confluence with trypsin (0.5 g/l)/EDTA (0.2 g/l) (Cambrex Bio Sciences, Verviers, Belgium).

POS-1 cells. The murine osteosarcoma cell line POS-1, derived from osteosarcoma which spontaneously developed in C3H/HeN mice was kindly provided from Kanagawa Cancer Center (Kanagawa, Japan [14]). The cells were cultured in RPMI 1640 medium (Biowhittaker, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FBS, at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂/95% air). The cells were harvested at confluence with trypsin (0.5 g/l)/EDTA (0.2 g/l).

C3H10T1/2 MSCs. These cells were originally derived from C3H/HeN mouse embryos and were purchased from the American Type Culture Collection (CCL-226, Manassas, VA, USA). They represent a model of murine MSCs, able to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteoblasts [15]. They were cultured in alpha-MEM (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) with 10% FBS.

Co-culture. Thirty thousands osteosarcoma POS-1 cells were seeded in 24 well-plates with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS. Murine C3H10T1/2 MSCs (15 000) were seeded in BD Falcon Cell Culture Insert (pore size 3 microns, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) with alpha-MEM supplemented with 10% FBS. One day after cell seeding, the murine MSCs were incubated with POS-1 cells with RPMI 1640 medium supplemented with 5% FBS. A trypan blue cell counting was then performed on POS-1 cells 24 and 72 hours later.

Isolation and characterization of human MSCs from adipose tissue

Human fat sample was obtained from one female patient in the course of an aesthetic abdominal liposuction with her informed consent for the use for anonymized unlinked research. The donor had no significant medical history. Fat was removed using the Coleman's procedure and 200 µl of centrifuged fat were plated in 25 cm² flask in 5 ml of alpha-MEM supplemented with 0.5 ml of FBS and 0.05 ml of antibiotics (Penicillin 100 U/ml and Streptomycin 100 mg/l; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). To remove non adherent cells, the cells were washed after 24 hours three times and then supplemented with fresh medium. For phenotypic characterization, surface antigen markers were analyzed by flow cytometry on MSCs. Cells were washed twice with phosphate-buffered solution (PBS) containing 0.4% bovine serum albumin (BSA) before staining with the following antibodies: FITC-conjugated anti-CD90 (Biosciences, Erembodegem, Belgium), PE-conjugated anti-CD105, FITC-conjugated anti-CD34 and PE-conjugated anti-CD45 (Biolegend, San Diego, CA, USA).

Differentiation potential assessment. After expansion, the cells were seeded into chamber slides (LabTek, Nunc) and stimulated by osteogenic, adipogenic and vascular smooth muscle inducing media. Osteogenic medium consisted of alpha-MEM medium complemented by 10% FBS, 50 µg/ml freshly prepared ascorbic acid (Sigma, Saint-Quentin, Fallavier, France), 10 mM sodium-beta-glycerophosphate (Sigma) and 300 ng/ml recombinant human BMP4 (RnD systems, Lille, France). The cells were cultured three weeks and then mineralization was assessed by using alizarin red and von Kossa staining [16]. After extensive washing, cells were observed under light microscopy. Adipogenic medium consisted of 1×10⁻⁶ M dexamethasone and 0.5 mM isobutylmethylxanthin (IBMX, Sigma). The vascular smooth muscle fate was obtained by adding 20 ng/ml TGFβ1. Nile Red-Oil (Sigma) was used to stained lipid droplets. Monoclonal antibodies recognizing SM-α actin (clone 1A4, Sigma), SM-α actinin (clone 1E12, Developmental Studies Hybridoma Bank, university of Iowa), SM22α (clone 10H12, Novocastra) and SM myosin heavy chain (clone hsmv, Sigma) were used.

Histological analyses

Surgical specimens were fixed in 10% buffered formaldehyde and after embedding in paraffin, 5 µm-thick sections were stained with haematoxylin-eosin-safran solution. For presence of neutral lipids, osteosarcoma specimens were frozen and sliced into 5 µm-thick sections. Sections were fixed with 10% paraformaldehyde, then rinsed in distilled water, washed in 60% isopropanol and finally stained with Oil Red O solution (3 g/l).

In vivo experiments

Human osteosarcoma model in nude mice. Four-week-old female athymic mice (NMRI nu/nu; Elevages Janvier, Le Genest St Isle, France) were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France) following the guidelines of the French ethical committee (CEEA.PdL.06). The mice were anesthetized by inhalation of an isoflurane-air mix (2%, 1 l/min) before any surgical manipulation. Human osteosarcoma SaOS2 cells were injected in the tibial anterior muscle (8×10^6 cells in 50 μ L PBS) of athymic mice to induce a primary tumor. Then fragments (0.02 g) of this primary tumor were transplanted next to the tibia of mice of the same athymic strain to induce osteosarcoma development [11]. Eight days after fragment transplantation, tumors were detected. Then they were either injected with 100 μ l of fat harvested from one female patient following the Coleman's procedure or injured with empty cannula. The tumor volume was calculated by the measure of 2 perpendicular diameters with a vernier caliper and calculated with the formula $(l^2 \times L)/2$ where l and L represent respectively the smallest and the largest diameter.

Mouse osteosarcoma model in C3H/HeN mice. Four-week-old male C3H/HeN mice (Elevages Janvier) were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit as described above. Subcutaneous injections of POS-1 cells (2×10^6) were performed in the hind footpad of the mice. In some experiments, POS-1 cells were co-injected with C3H10T1/2 MSCs at the ratio 2/1. The tumor volume was calculated as described above.

Results

Case report

A 17 year-old girl was admitted in our institution in August 1994 with a metaphyseo-epiphyseal bone tumor of the proximal humerus. An incisional biopsy made the diagnosis of telangiectasic osteosarcoma (Fig. 1A), in conformity with clinical and radiolog-

ical features. The patient received pre operative chemotherapy in respect to french protocol at this time (4 cures of Holoxan/cis platinumium). Then a limb-salvage procedure consisting of an extra articular resection of proximal humerus with gleno-humeral articulation was performed. The reconstruction consisted of an arthrodesis with a vascularised scapular crest bone graft. The histopathologic examination of the specimen concluded of clear wide margins and no viable cells have been found out (good response, Huvos grade 4). The patient received two more cures of the same chemotherapeutic protocol. She has been continuously follow-up every 6 months for 5 years then every year [Magnetic Resonance Imaging (MRI) and chest X ray] until now.

In 2005, because of the unsightly appearance of her left arm due to resection of soft tissue and mainly deltoid muscle (Fig. 1B), she was referred to a reconstructive surgeon of our institution and received three autologous fat grafts harvested from her abdominal wall and injected circularly around the bone graft in soft tissues (March 2005, June 2005 and January 2006). The patient reported a good cosmetic result with a lasting increased volume of the arm.

In August 2007, she consulted her oncologist because of pain, inflammation and swelling at the lipofilling site (Fig. 2A). The Magnetic Resonance Imaging (MRI) showed an extensive soft tissue tumor (Fig. 2B). Histological analysis of the biopsy revealed an osteosarcoma with neoplastic cells and thin osteoid formation (Fig. 2C). No lipid droplets have been observed after Oil Red O staining of the biopsy. No distant relapses have been found out. The patient received again 4 cures of chemotherapy (API-AI French protocol) and a trans scapula amputation was performed (Fig. 2D). Tumor cells still responded well to chemotherapy (Huvos grade 3) and no post operative chemotherapy was proposed because of severe renal deficiency after pre operative chemotherapy. Despite the high rate of necrosis, the pathologist was able to see wide area of haemorrhage compatible with telangiectasic subtype (Fig. 2E). One year after the surgery the patient does not present any sign of local or distant relapse.

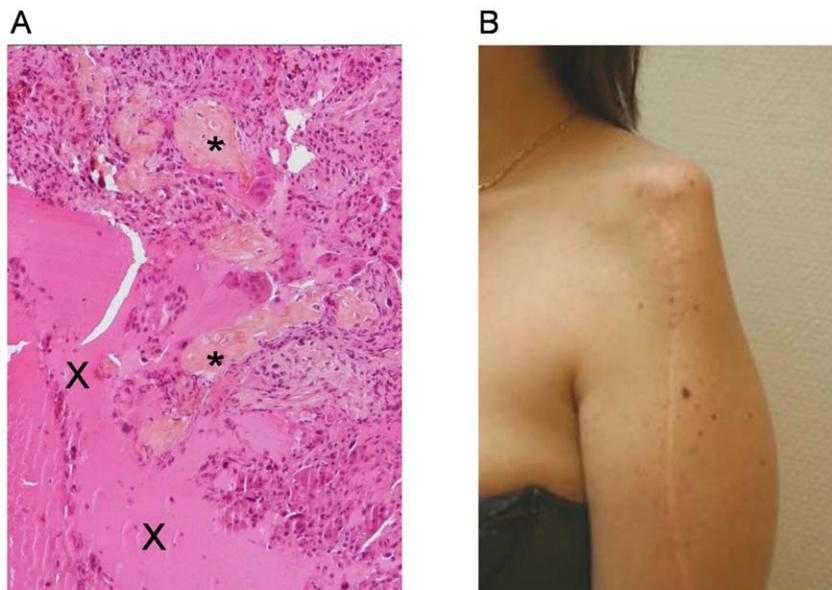


Figure 1. Telangiectasic osteosarcoma and post surgical defect. (A) Photomicrograph of the initial telangiectasic osteosarcoma showing proliferation of neoplastic cells, focal osteoid formation (*) and telangiectasic space containing blood (X) (optical microscopy, HES staining, $\times 100$). (B) Post-surgical defect of the left arm in January 2005, 2 months before the first lipofilling procedure. doi:10.1371/journal.pone.0010999.g001

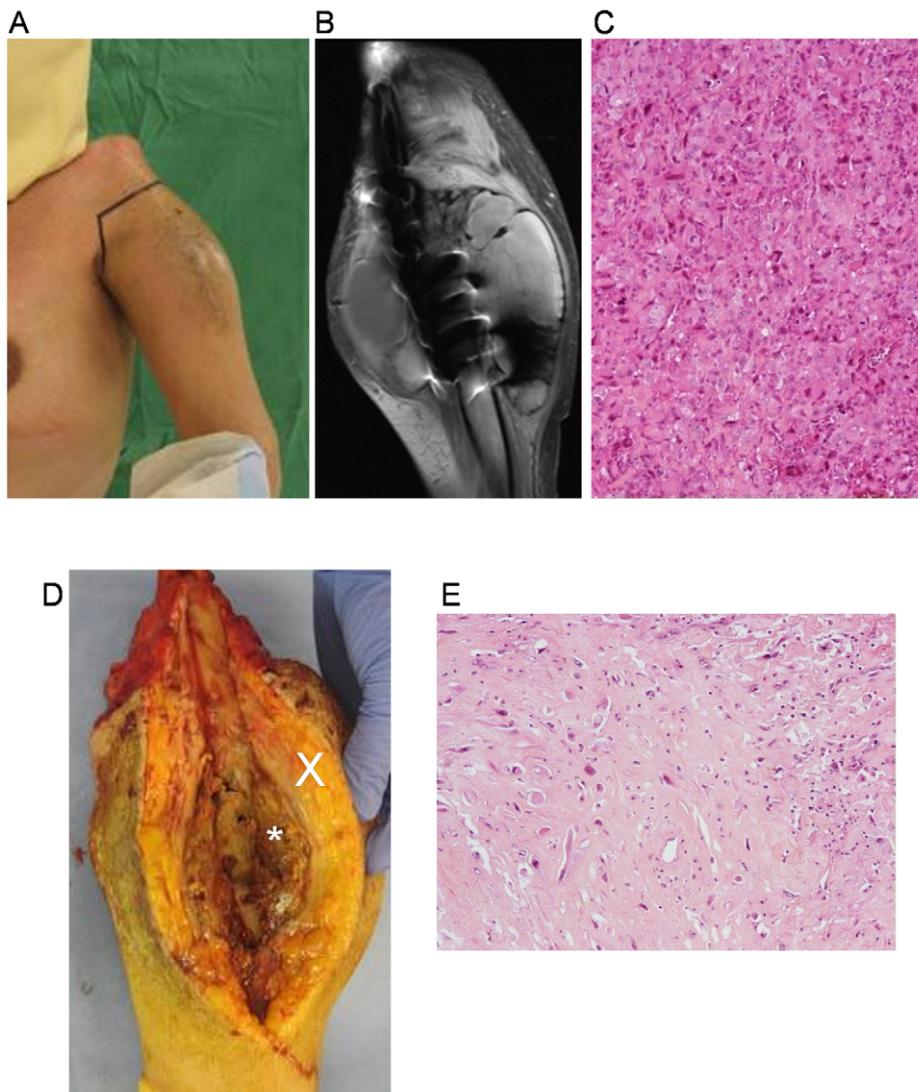


Figure 2. Osteosarcoma recurrence at the lipofilling site. (A) Inflammatory and swelling of the lipofilling site at the left arm after 4 cures of chemotherapy. (B) T2 weighted MRI shows extensive circular soft tissue tumor of the left arm, measuring 12 cm by 10 cm. (C) Photomicrograph of the biopsy specimen at the recurrent tumor site showing high grade malignant cell proliferation and thin osteoid formation (optical microscopy, HES staining, $\times 100$). (D) Photograph of the open resected tumor with tumor mass (*) around the left humerus diaphysis and peripheral fat engraftment (X) (E) Histology of resected tumor specimen (optical microscopy, HES staining, $\times 100$).
doi:10.1371/journal.pone.0010999.g002

Osteosarcoma growth is increased by fat injection

As a result of this surprising clinical case, we wondered whether fat graft was the cause of the local late osteosarcoma recurrence. In a first attempt to test this hypothesis, we tested whether a fat sample which is used for an autologous fat graft can modify the growth of human osteosarcoma induced in immunodeficient mice. First, athymic nude mice were injected with human SaOS2 osteosarcoma cells in muscle leading to tumor development in less than 50% of mice. To obtain a greater bone tumor incidence, fragments of a primary tumor induced by SaOS2 cell injection were transplanted next to the tibia of recipient mice of the same strain. Twenty one mice were transplanted with human osteosarcoma fragments of the same weight, then were divided into 3 groups: the control SaOS2 group just received tumor fragment at day 0; the SaOS2 + fat group was injected with human fat into the tumor site at day 8 after transplantation when a progressive tumor was detected (size $>100 \text{ mm}^3$); the SaOS2 + cannula group was

transplanted with tumor fragment at day 0, then at day 8 the tumors were injured with an empty cannula to reproduce potential inflammatory process; and a group of three mice was injected only with human fat in the tibial muscle. Results of tumor progression are shown in figure 3. In the control SaOS2 group, osteosarcoma developed rapidly reaching a mean volume of 1393 mm^3 23 days after tumor implantation (Fig. 3A). Tumor growth was greatly and significantly increased at day 21 after tumor induction in the group that received fat injections (Fig. 3B). As the fat injection was realized with a cannula which may have induced inflammation, a group of injured osteosarcoma was studied in the same conditions. In this case, the inflammation caused by cannula injury did not change osteosarcoma growth as compared to the control SaOS2 group with uninjured osteosarcoma (Fig. 3C). The tumor size increase observed in the SaOS2 + fat group was not due to the fat mass itself as only reduced and stable volumes (less than 200 mm^3) were observed with fat injections alone into naive control mice

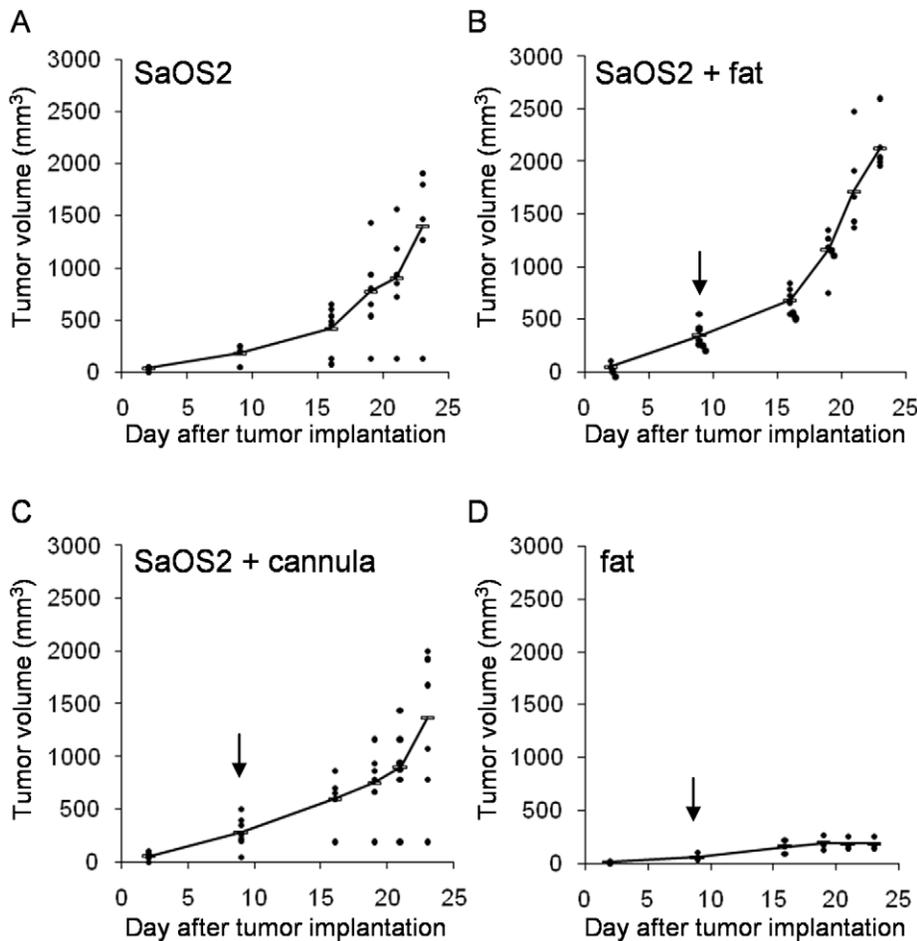


Figure 3. Fat injections into osteosarcoma induced in nude mice. (A) Six mice were considered as control tumors (SaOS2). (B) A group of 6 mice was injected at the tumor site with human fat harvested by the Coleman's technique (SaOS2 + fat). (C) A control group of 6 mice was injured with empty cannula at the tumor site. (D) Another group of 3 mice received the fat alone. Arrows indicate day 8 after transplantation when fat injections or cannula injuries were performed. Statistical analyses were calculated with the Kruskal-Wallis test (nonparametric ANOVA) using GraphPad InStat v3.02 software. The p value was less than 0.05 for SaOS2 + fat versus SaOS2 alone or versus SaOS2 + cannula at day 21, but was not significant for SaOS2 alone versus SaOS2 + cannula. doi:10.1371/journal.pone.0010999.g003

(Fig. 3D). Moreover, we could observe that animals which received fat grafts in osteosarcoma tumors were more homogeneous in their tumor progression as compared with control groups (SaOS2 and SaOS2 + cannula).

Histological analyses revealed few but large adipocytes between the neoplastic cells for tumor specimens of the SaOS2 + fat group (Fig. 4A), whereas only small adipocytes were identified within fibrotic areas and not between neoplastic cells within tumor specimens of the SaOS2 + cannula group (Fig. 4B) or control SaOS2 group (data not shown). The proportion of these large adipocytes seems too small to explain the tumor size increase which was observed in the SaOS2 + fat group. Then we may hypothesize that fat injections have stimulated osteosarcoma cell proliferation.

MSC-like cells are present in the injected fatty tissue

One hypothesis for the stimulation of osteosarcoma growth by fat injection may lie to the presence of MSCs in the injected fatty tissue. An aliquot of the fat tissue which was injected into SaOS2-bearing mice was tested in culture for the presence of adherent cells. Such cells were obtained and analyzed by flow cytometry. At passage 3,

these cells were positive for the MSC markers CD105 and CD90 (Fig. 5A) and simultaneously negative for the hematopoietic markers CD45 and CD34 (data not shown). Moreover, these cells differentiated into the osteoblastic and adipocytic cells as well as muscle cells from vascular smooth muscle lineage as shown in figure 5. Indeed, according to the type of induction the presence of mineralized nodules was identified by either von Kossa or alizarin red staining and adipocytes by their content in lipid droplets positives labelled by Nil Red-Oil. In addition, MSC-like cells were able to give rise vascular smooth muscle (VSM) cells since expression of cytoskeletal molecules specific of VSM lineage such as SM22 α , SM myosin heavy chain, SM- α actin and SM- α actinin increased dramatically after VSM induction. Therefore, adherent cells-derived from fat had characteristics similar to what it is largely described for bone marrow MSC [17].

After passage 8, these MSC-like cells were injected in three mice and the three intramuscular injections of two million cells per mouse did not induce tumor development after 60 days. These fat-derived cells maintained long-term self-renewal (>20 passages), but they have lost the CD105 expression as early as passage 6 showing rapid phenotypic change in culture.

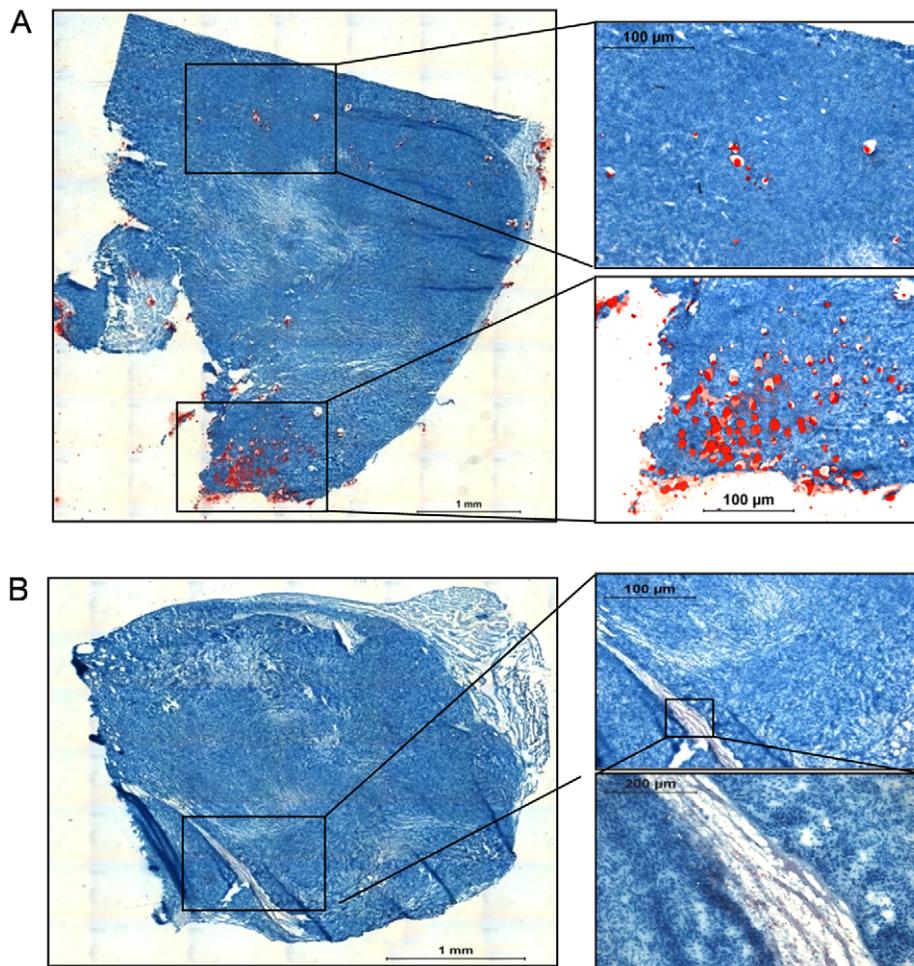


Figure 4. Identification of lipid droplets in osteosarcoma specimens. (A) Photomicrograph of a tumor specimen from the SaOS2 + fat group showing large red lipid droplets. (B) Photomicrograph of a tumor specimen from the SaOS2 + cannula group showing small red lipid droplets (optical microscopy, Oil Red O staining).

doi:10.1371/journal.pone.0010999.g004

Injections of MSCs with osteosarcoma cells increase tumor progression

To determine whether MSCs can interact with osteosarcoma cells and may modulate the early tumor development, we compared the tumor progression induced in mice by injection of osteosarcoma cells alone or with MSCs. For this experiment, we tested mouse osteosarcoma POS-1 cells rather than human SaOS2 cells because their injection in mouse footpad led to a greater tumor incidence (80% versus 50%). The POS-1 cells and C3H10T1/2 MSCs have been derived from the C3H/HeN mouse strain, allowing us to perform this experiment in a syngenic immunocompetent model. Eighteen C3H/HeN mice were divided into 3 groups: one control group was injected with 2×10^6 osteosarcoma POS-1 cells (POS-1 group); a second control group received 10^6 C3H10T1/2 cells (C3H10T1/2 MSC group); and mice in the test group were co-injected with POS-1 and C3H10T1/2 cells at the above mentioned concentrations (POS-1 + C3H10T1/2 MSC). Results of individual tumor progression showed a disparity in the time course of tumor onset in the POS-1 group (Fig. 6A): 5 animals out of 6 developing a tumor at different time (from day 15 to 32). On the contrary, all the animals in the POS-1 + C3H10T1/2 MSC group developed a tumor early after cell injection (around day 10) with the same time

of onset (Fig. 6A); while MSCs alone did not induce any tumor development (data not shown). The tumor development appeared earlier and more homogeneously in the POS-1 + C3H10T1/2 MSC group than in the POS-1 group. The median tumor volume was three times higher in the POS-1 + C3H10T1/2 MSC group than the one in the POS-1 group at day 19 (775 versus 218.5 mm^3) and the difference was very significant ($p = 0.0076$ with Mann-Whitney test using GraphPad InStat v3.02 software). Similar results were obtained using a co-injection of rat MSC-like cells and rat osteosarcoma cells in the footpad of nude mice: earlier onset and faster growth of tumors as compared to osteosarcoma cells injected alone (Figure S1A).

We wondered whether MSCs may change the proliferation rate of osteosarcoma cells. Then C3H10T1/2 MSCs and POS-1 cells were co-cultured *in vitro* at a 1:2 ratio without cell contact. The number of blue stained POS-1 cells did not change when comparing co-cultured and cultured alone POS-1 cells; whereas the number of POS-1 live cells was significantly increased when co-cultured with C3H10T1/2 MSCs as compared to POS-1 cultured alone (Fig. 6B). Similarly the proliferation of rat osteosarcoma cells (OSRGA) was increased when co-cultured with rat MSC-like cells under same experimental conditions as described above (Figure S1B). Therefore MSC-like cells secreted

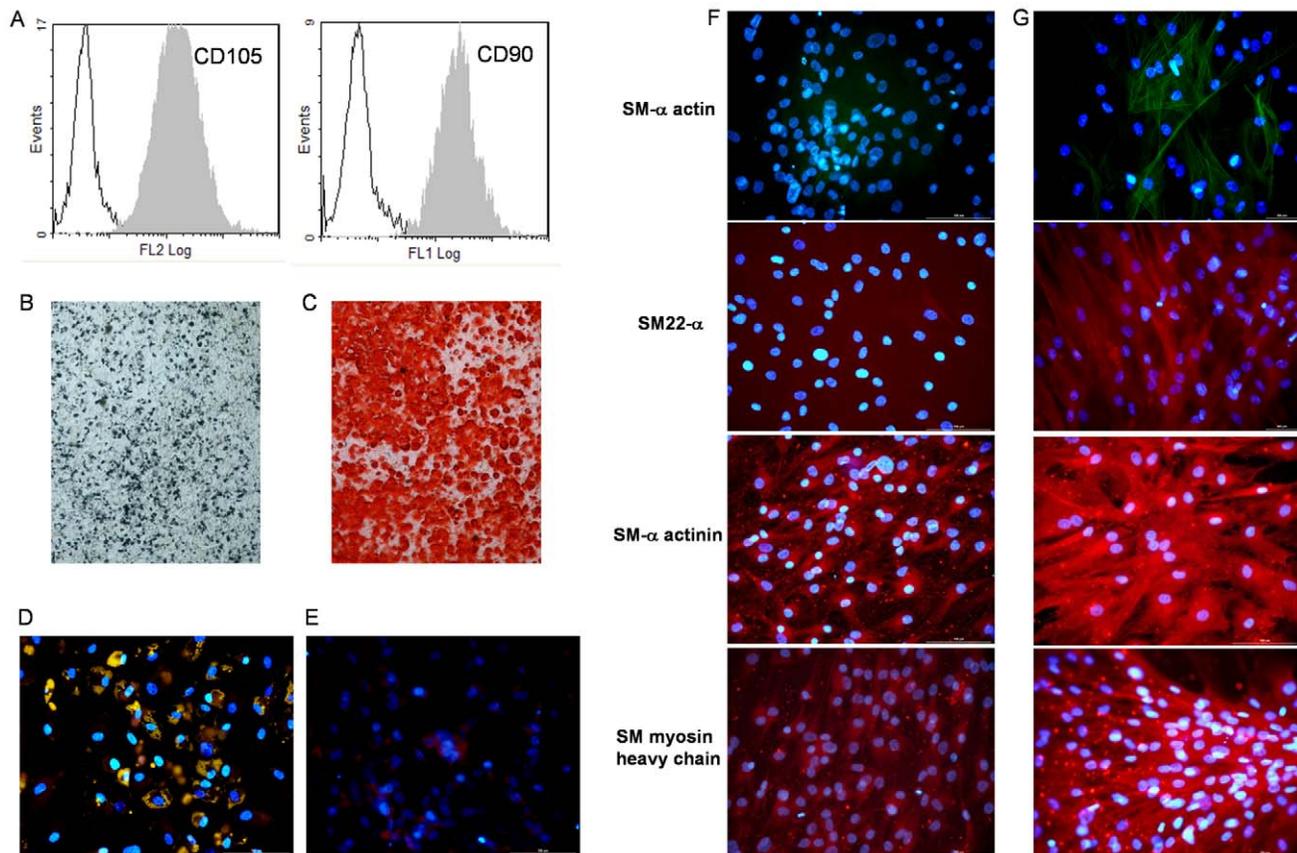


Figure 5. Characterisation of human fat derived MSC-like cells. (A) Flow cytometry analysis showed CD105 and CD90 positive cells after the third passage in culture. In addition, multipotential capacities of MSC-like cells were tested by inducing cells to differentiate into osteoblastic cells capable to mineralize, adipocytes and vascular smooth muscle (VSM) cells. (B) Mineralized nodules were identified as black spots using von Kossa silver staining or (C) as red spots using alizarin red staining after incubation of fat derived MSC-like cells in osteogenic differentiation medium. Adipocytes containing small Nil Red-positive lipid droplets were easily observed upon adipogenic conditions (D) whereas non induced cells were not labeled (E). In contrast to non induced cells (F), those cultured upon VSM conditions (G) generated elongated cells positive for several VSM markers such as SM- α actin, SM22 α , SM- α actinin and SM myosin heavy chain.
doi:10.1371/journal.pone.0010999.g005

one or several soluble factors which have promoted osteosarcoma cell proliferation *in vitro*.

Discussion

A patient in complete remission of an humerus telangiectasic osteosarcoma since ten years consulted for a cosmetic correction by lipofilling. Three injections of autologous fat grafts harvested by the Coleman's technique were realized and few months after the last one, a local recurrence of osteosarcoma occurred 13 years after the initial treatment. Late local recurrence of an osteosarcoma is a very unexpected event after complete remission and 10 years of follow-up. To our knowledge this is one of the longest delay reported between remission and local recurrence, another case being reported by Bacci *et al.* [18]. The patient reported here did not present any predictive factor of local recurrence. It was a telangiectasic osteosarcoma subtype and wide margins were obtained after extra articular monobloc resection, both considered as good predictive factors of disease free survival [8,18]. Even a bad response to chemotherapy is not considered as a bad prognostic factor for late relapse (after 4 years) instead of earlier relapse [19,20]. Thus, this local recurrence of telangiectasic osteosarcoma at the exact area of autologous fat grafts performed 18 months before raised the question of their possible relationship.

Despite the widespread clinical use of Coleman's lipofilling technique, very little is known about its consequence on tissue environment after tumor resection. The only published data concerned conservative treatments in breast cancer patients in which this technique represents an advance, but in these cases the correlation between fat transfer and recurrent breast cancer is difficult to analyze [2,21,22,23,24]. Motrescu and Rio have described a vicious cycle between adipocytes and cancer cells: the last ones induce secretion by adipose tissue of Matrix Metalloproteinase 11 which in turn favors cancer cell survival and tumor progression by changing the tumor surrounding environment [25]. To investigate the possible relationship between fat graft and osteosarcoma growth, an experimental model reproducing the clinical case of human fat injection in osteosarcoma was set up using human SaOS2 osteosarcoma cells in athymic mice. The human fat tissue was harvested from a patient and injected following the Coleman's procedure. Results showed that osteosarcoma growth was significantly increased by fat injection whereas fat alone produced only small and stable volumes at injection sites in naive mice. Several hypotheses could explain these observations. On one hand, fat may promote angiogenesis thereby interfering with tumor growth. Indeed, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) which is expressed in the interstitial connective tissue of fat grafts favours graft

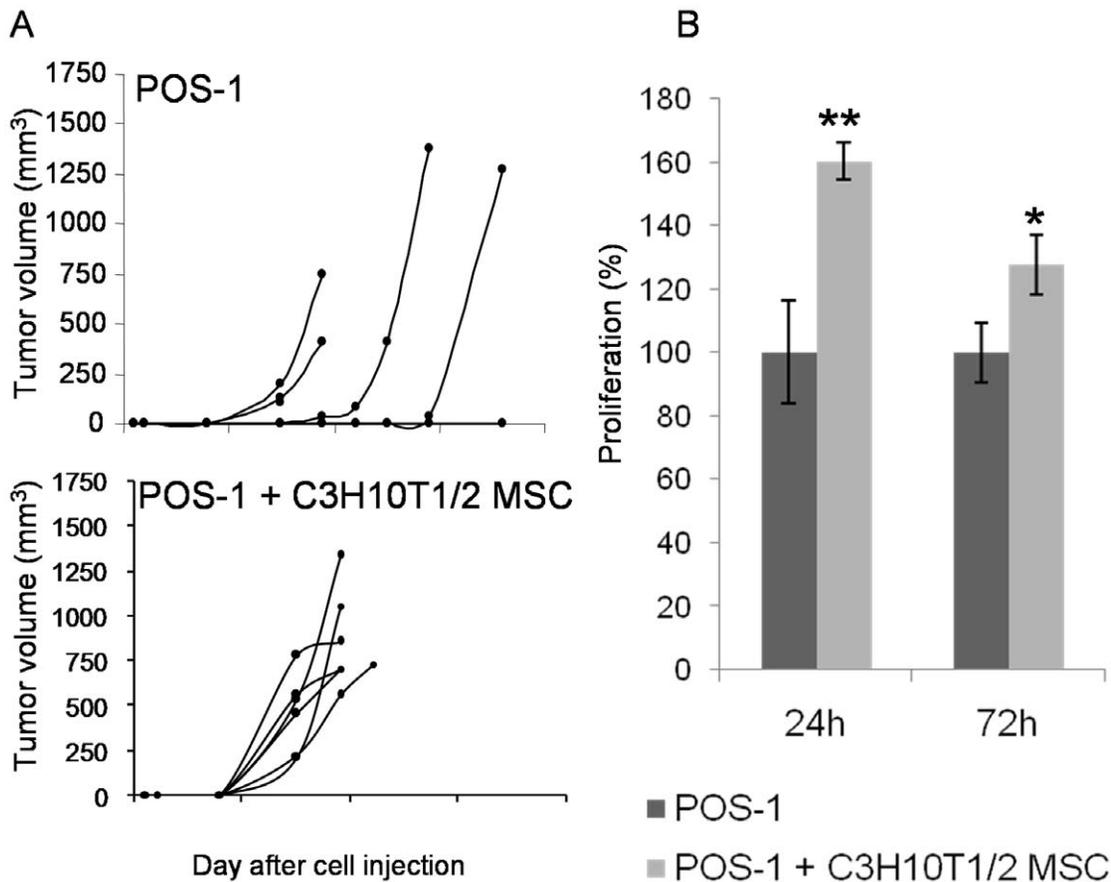


Figure 6. Mouse MSCs interact with osteosarcoma cells. (A) Evolutions of the tumor volume induced into the footpad of C3H/HeN mice. Mice of the control group (POS-1) received osteosarcoma POS-1 cells alone, while POS-1 cells were associated with C3H10T1/2 MSCs at a ratio of 2:1 in the POS-1 + C3H10T1/2 MSC group. (B) POS-1 osteosarcoma cells and C3H10T1/2 MSCs were co-cultured without cell-cell contact. The POS-1 cell proliferation was analyzed by trypan blue cell counting after 24 and 72 hours of co-culture. Results are presented as proliferation percentages relatively to the total number of POS-1 cells cultured alone. Error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant differences between means (* for $p < 0.05$ and ** for $p < 0.01$). doi:10.1371/journal.pone.0010999.g006

survival [26], but can stimulate growth, invasion and metastasis of solid tumors [27,28]. In another hand, adipocytes highly express Adiponectin (also designed as adipose most abundant gene transcript) which was shown to stimulate Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL or TNFSF11) and inhibit Osteoprotegerin expression in osteoblasts [29]. Therefore fat may regulate two bone resorption mediators which are highly implicated in the development of bone tumors [30]. Indeed blocking RANKL by soluble RANK [31,32,33] or by the decoy receptor Osteoprotegerin [11,34,35,36,37] was proven to be effective in several *in vivo* models of bone tumors and leads to the clinical development of a fully-humanized monoclonal antibody directed against RANKL (Denosumab) [38].

In addition, the role of MSC-like cells which are contained in fatty tissue must be considered [39]. Our study showed that the fat harvested following Coleman's procedure contains progenitor cells which share numerous characteristics with MSCs. They were positive for the phenotypic markers CD90 and CD105 and simultaneously negative for the hematopoietic markers CD45 and CD34. They showed ability to survive in long term culture without producing tumor *in vivo* and to differentiate *in vitro* into the osteoblast lineage. Adipose-derived stem/stromal cells (designed ADSCs or ASCs) are proposed as cellular agent to enhance angiogenesis after ischemic injury [40,41] or to promote survival of

fat graft for breast augmentation or reconstruction [42], but additionally they could promote migration and invasion of breast cancer cells [43]. The effect of bone marrow-derived MSCs has been studied on osteosarcoma development by injection in the caudal vein of nude mice bearing SaOS2 cell-induced osteosarcoma: the addition of MSCs has promoted tumor growth and pulmonary metastasis *in vivo* [44]. In our study, we used a complete syngeneic model with POS-1 osteosarcoma cells and C3H10T1/2 MSCs which have been derived from C3H/HeN mice and were injected into mice of the same strain. The osteosarcoma onset and incidence were greatly enhanced by C3H10T1/2 MSC presence. Djouad F *et al.* have shown an immunosuppressive effect of primary or C3H10T1/2 MSCs on tumor growth: B16 melanoma cells have proliferated into allogeneic C3H/HeN mice only when they have been co-injected with MSCs otherwise they have been rejected [45]. Into a syngeneic tumor model, C3H10T1/2 MSCs have induced an earlier onset of tumors but did not interfere with the tumor growth kinetic [46]. Using a co-culture method without cell contact, we observed that C3H10T1/2 MSCs promoted POS-1 cell proliferation by secreting one or several soluble factors. We noted similar observations like earlier onset of tumors in a xenogeneic model and greater proliferation *in vitro* when rat osteosarcoma cells were combined with rat MSC-like cells. Numerous soluble factors have to be considered as MSC

mediators able to modify tumor cell proliferation or the tumor environment. Among them, the insulin growth factor, the fibroblast growth factor, the interleukin Il-6, the chemokine CCL5 (RANTES) and the matrix metalloproteinases MMP-2 and MT1-MMP are few of the mediators that could have a particular role in bone tumor development [47,48,49]. Further studies have to be performed to identify the MSC mediators acting on osteosarcoma cells. To address this point, the main difficulty is that the panel of cytokines and growth factors secreted by MSCs is likely to be different *in vitro* and *in vivo* because their expression can be modulated by inflammatory mediators *in vivo* [50].

Controversial results have been reported when MSCs have been injected into mice with induced tumor, resulting either in promotion or inhibition of tumor growth depending on the studies. Antitumoral action of rat MSCs on rat gliomas has been reported by Nakamura *et al.* [51]. In that report, MSCs have been responsible for prolonged survival of glioma-bearing rats. Similarly and somewhat to their own surprise, Khakoo AY *et al.* [52] have obtained also an antitumorigenic effect of human MSCs on Kaposi's sarcomas which have been induced on nude mice. Since their first warning, Djouad F *et al.* have also reported that the immunosuppressive effect of mouse MSCs *in vivo* depends on environmental parameters and that even "a low but relevant amount of MSCs may induce tumor rejection" [46]. Therefore the effect of MSCs within tumors seems unpredictable and dependant of microenvironment signals. By exploring the interaction of MSCs with the tumor environment, new therapeutic options could be provided [53].

In an osteosarcoma experimental model, Naumov *et al.* have shown that switch from non angiogenic to angiogenic phenotype could be a biologic behavior associated to the clinical expression of a quiescent tumor [54]. Assuming that cancer stem cell-like theory in bone sarcoma is correct [55,56], their presence at the site of the primary tumor after treatment is in agreement with a "supposed" good response chemotherapy and wide monobloc surgery as in our patient. Despite the lack of biological data on the mechanism by which cancer stem cells drive the tumor growth, the modulation of microenvironment induced by the fat graft could interfere with the biological behaviour of this sub-population. The preclinical experimental designs used in the present study mimic surgical procedure for lipofilling enabling to study *in vivo* interaction between fat and osteosarcoma cells, but do not mimic the late and local recurrence of osteosarcoma after a long lasting remission as observed in the clinical case reported here. Further experimental investigations are necessary to understand the mechanism regulating the interactions between the graft, the tissue recipient and quiescent tumor cells. However surgery associating inflammatory process could be directly responsible for the reactivation of dormant tumor cells [57,58]. This last assumption attributes a

minor or non role to adipose tissue but constitutes anyway a warning concerning the fat grafting or any other surgical procedure in a post-neoplastic environment.

In conclusion, because of the unexpected late local recurrence of an osteosarcoma at the exact area of autologous fat grafts and the stimulation of osteosarcoma tumor growth by fat or MSC-like cells in experimental models, clinician must be aware of the possible long term local relapse of tumor after an autologous fat graft which is usually considered as a safe procedure.

Supporting Information

Figure S1 Rat MSCs interact with osteosarcoma cells. (A) Evolutions of the tumor volume induced into the footpad of nude mice (NMRI nu/nu; Elevages Janvier, Le Genest St Isle, France). The OSRGA cells were derived from a transplantable rat osteosarcoma model originally induced by radiation [11]. Relatively undifferentiated mesenchymal cells (MSC-like cells) were obtained from calvaria of newborn rat (2 days old Sprague-Dawley rat, Charles River, L'Arbresle, France) as previously described. Mice of the control group (OSRGA) received 106 OSRGA cells alone, while OSRGA cells were associated with calvaria-derived MSC-like cells at ratio 2:1 in the OSRGA + MSC group. A third group received 0.5×106 MSC-like cells alone and have not developed any tumor after 85 days (data not shown). The significance test is not performed as only three mice per group were included in this preliminary experiment. (B) OSRGA cells and calvaria-derived MSC-like cells were co-cultured without cell-cell contact. The OSRGA cell proliferation was analyzed by trypan blue cell counting after 24 and 72 hours. Results are presented as proliferation percentages relatively to the total number of OSRGA cells cultured alone. Error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant differences between means ($p < 0.01$).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010999.s001 (0.50 MB TIF)

Acknowledgments

The authors wish to thank C. Bailly and C. LeCorre from the Experimental Therapy Unit platform of the IFR26 (Nantes, France) for their technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PP DH VT. Performed the experiments: PP JR ALB. Analyzed the data: PP JR ALB VT. Contributed reagents/materials/analysis tools: PP EC F Deschaseaux MFH VT. Wrote the paper: PP FR DH F Duteille VT FG. Histological analysis: EC MFH. Plastic surgeon of the patient: F. Duteille. Orthopaedic surgeon of the patient: FG.

References

- Coleman SR (1997) Facial recontouring with lipofstructure. *Clin Plast Surg* 24: 347–367.
- Coleman SR, Saboeiro AP (2007) Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 119: 775–785; discussion 786–777.
- Spear SL (2008) Fat for breast: where are we? *Plast Reconstr Surg* 122: 983–984.
- Missana MC, Laurent I, Barreau L, Balleyguier C (2007) Autologous fat transfer in reconstructive breast surgery: indications, technique and results. *Eur J Surg Oncol* 33: 685–690.
- Salgarello M, Visconti G, Farallo E (2009) Autologous Fat Graft in Radiated Tissue Prior to Alloplastic Reconstruction of the Breast: Report of Two Cases. *Aesthetic Plast Surg*.
- Ferrari S, Bacci G, Picci P, Mercuri M, Briccoli A, et al. (1997) Long-term follow-up and post-relapse survival in patients with non-metastatic osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* 8: 765–771.
- Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, et al. (1992) Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *J Clin Oncol* 10: 5–15.
- Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, et al. (2002) Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 20: 776–790.
- Koksai Y, Akyuz C, Varan A, Atilla B, Gedikoglu G, et al. (2008) Late recurrence in primary region of parosteal osteosarcoma: a case report. *Pediatr Hematol Oncol* 25: 83–88.
- Lamoureux F, Picarda G, Garrigue-Antar L, Baud'huin M, Trichet V, et al. (2009) Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma. *Cancer Res* 69: 526–536.
- Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, et al. (2007) Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma:

- blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res* 67: 7308–7318.
12. Ory B, Heymann MF, Kamijo A, Gouin F, Heymann D, et al. (2005) Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* 104: 2522–2529.
 13. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59: 221–226.
 14. Uesugi M, Koshino T, Mitsugi N, Hiruma T (2000) Predictive value of serum immunosuppressive acidic protein for lung metastasis after amputation of murine osteosarcoma of the lower limb. *Cancer Lett* 155: 169–172.
 15. Pinney DF, Emerson CP, Jr. (1989) 10T1/2 cells: an in vitro model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation. *Environ Health Perspect* 80: 221–227.
 16. Bills CE, Eisenberg H, Pallante SL (1971) Complexes of organic acids with calcium phosphate: the von Kossa stain as a clue to the composition of bone mineral. *Johns Hopkins Med J* 128: 194–207.
 17. Dennis JE, Charbord P (2002) Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 20: 205–214.
 18. Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Ruggieri P, Picci P, et al. (2000) Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol* 18: 4016–4027.
 19. Ferrari S, Briccoli A, Mercuri M, Bertoni F, Cesari M, et al. (2006) Late relapse in osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 28: 418–422.
 20. Kim MS, Cho WH, Song WS, Lee SY, Jeon DG (2007) time dependency of prognostic factors in patients with stage II osteosarcomas. *Clin Orthop Relat Res* 463: 157–165.
 21. Chan CW, McCulley SJ, Macmillan RD (2008) Autologous fat transfer—a review of the literature with a focus on breast cancer surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 61: 1438–1448.
 22. Delay E, Gosset J, Toussoun G, Delaporte T, Delbaere M (2008) [Efficacy of lipomodelling for the management of sequelae of breast cancer conservative treatment]. *Ann Chir Plast Esthet* 53: 153–168.
 23. Gosset J, Flageul G, Toussoun G, Guerin N, Tourasse C, et al. (2008) [Lipomodelling for correction of breast conservative treatment sequelae. Medicolegal aspects. Expert opinion on five problematic clinical cases]. *Ann Chir Plast Esthet* 53: 190–198.
 24. Mojallal A, Saint-Cyr M, Garrido I (2009) Autologous fat transfer: controversies and current indications for breast surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62: 708–710.
 25. Motrescu ER, Rio MC (2008) Cancer cells, adipocytes and matrix metalloproteinase 11: a vicious tumor progression cycle. *Biol Chem*.
 26. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M (2000) Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *Laryngoscope* 110: 1333–1338.
 27. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, et al. (2000) Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 6: 572–577.
 28. Vona-Davis L, Rose DP (2009) Angiogenesis, adipokines and breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 193–201.
 29. Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, et al. (2006) Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 21: 1648–1656.
 30. Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA (2007) Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther* 6: 2609–2617.
 31. Lamoureux F, Picarda G, Rousseau J, Gourden C, Battaglia S, et al. (2008) Therapeutic efficacy of soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B-Fc delivered by nonviral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma. *Mol Cancer Ther* 7: 3389–3398.
 32. Pearce RN, Sordillo EM, Yacoby S, Wong BR, Liau DF, et al. (2001) Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11581–11586.
 33. Zhang J, Dai J, Yao Z, Lu Y, Dougall W, et al. (2003) Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB Fc diminishes prostate cancer progression in bone. *Cancer Res* 63: 7883–7890.
 34. Croucher PJ, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, et al. (2001) Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 98: 3534–3540.
 35. Heath DJ, Vanderkerken K, Cheng X, Gallagher O, Prideaux M, et al. (2007) An osteoprotegerin-like peptidomimetic inhibits osteoclastic bone resorption and osteolytic bone disease in myeloma. *Cancer Res* 67: 202–208.
 36. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Koziarzki I, Komarova SV, et al. (2006) Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440: 692–696.
 37. Morony S, Capparelli C, Sarosi I, Lacey DL, Dunstan CR, et al. (2001) Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngenic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res* 61: 4432–4436.
 38. Schwarz EM, Ritchlin CT (2007) Clinical development of anti-RANKL therapy. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 1: S7.
 39. Gimble JM, Nuttall ME (2004) Bone and fat: old questions, new insights. *Endocrine* 23: 183–188.
 40. Carriere A, Ebrahimian TG, Dehez S, Auge N, Joffre C, et al. (2009) Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1093–1099.
 41. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, et al. (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: 1292–1298.
 42. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, et al. (2008) Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* 32: 48–55; discussion 56–47.
 43. Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby PJ, Li R (2009) Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*.
 44. Xu WT, Bian ZY, Fan QM, Li G, Tang TT (2009) Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett* 281: 32–41.
 45. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, et al. (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102: 3837–3844.
 46. Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, Jorgensen C, et al. (2006) Earlier onset of syngenic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 82: 1060–1066.
 47. Damien C, Grimaud E, Rousselle AV, Charrier C, Fortun Y, et al. (2000) Cysteine protease production by human osteosarcoma cells (MG63, SAOS2) and its modulation by soluble factors. *Cytokine* 12: 539–542.
 48. Georges S, Ruiz Velasco C, Trichet V, Fortun Y, Heymann D, et al. (2009) Proteases and bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 29–41.
 49. Lazenec G, Jorgensen C (2008) Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 26: 1387–1394.
 50. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, et al. (2007) The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25: 1737–1745.
 51. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, et al. (2004) Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 11: 1155–1164.
 52. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, et al. (2006) Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 203: 1235–1247.
 53. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D (2009) Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res* 69: 1255–1258.
 54. Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, et al. (2006) A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst* 98: 316–325.
 55. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, et al. (2005) Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7: 967–976.
 56. Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, Young KM, Friedrichs K, et al. (2008) Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet J* 175: 69–75.
 57. Demicheli R, Retsky MW, Hrushesky WJ, Baum M (2007) Tumor dormancy and surgery-driven interruption of dormancy in breast cancer: learning from failures. *Nat Clin Pract Oncol* 4: 699–710.
 58. Varani J, Lovett EJ, 3rd, Lundy J (1981) A model of tumor cell dormancy: effects of anesthesia and surgery. *J Surg Oncol* 17: 9–14.

INTERETS THERAPEUTIQUES DES MOLECULES D'ARN INTERFERENCE DANS DEUX PATHOLOGIES OSSEUSES RARES

Mots clés : ARN interférence, ostéosarcome, ostéogenèse imparfaite

L'ARN interférence est un mécanisme physiologique d'inhibition post-transcriptionnelle de l'expression des gènes basé sur une complémentarité de séquence entre de petits ARN double brins, les siRNAs et l'ARN messager cible. Depuis la découverte de ce mécanisme dans les cellules de mammifères en 2001, de nombreuses études visent à tester le potentiel thérapeutique de ces molécules. Ainsi, l'injection de siRNAs transitoires inhibant l'expression de la cytokine pro-résorptive Rankl, impliquée dans le cercle vicieux caractéristique du développement tumoral en site osseux, prévient les lésions ostéolytiques. De plus, ces injections retardent la rechute dans un protocole de bi-thérapie associant siRNAs et chimiothérapie conventionnelle dans deux modèles murins d'ostéosarcome. Dans un contexte d'ostéogenèse imparfaite, maladie génétique à caractère dominant, les siRNAs permettent également de cibler efficacement l'expression du transcrite muté tout en conservant celle de l'ARNm sauvage ne différant que de deux nucléotides. Le clonage de ces séquences sous forme de cassette ADN de type shRNA a permis de modifier stablement des cellules issues d'un modèle murin d'ostéogenèse imparfaite. Le nombre croissant d'études précliniques et cliniques ainsi que les présents résultats obtenus ne font que renforcer la puissance de ce nouvel outil thérapeutique, laissant entrevoir un développement clinique à grande échelle des molécules de siRNAs et shRNAs thérapeutiques.

THERAPEUTIC INTEREST OF RNA INTERFERENCE MOLECULES IN TWO RARE BONE DISEASES

Key words: RNA interference, osteosarcoma, osteogenesis imperfecta

RNA interference is a physiological pathway that allows post-transcriptional inhibition of gene expression through the recognition of a specific sequence of mRNA by complementary sequences of small interfering RNAs (siRNAs). Since its discovery in mammalian cells in 2001, RNAi is being explored as a potential treatment for various diseases. Intra-tumoral injections of siRNAs directed against the proresorptive cytokine Rankl, implicated in the vicious cycle established between tumor development and osteolysis at bone site, reduce the Rankl production in serum and protect bone from para-tumor osteolysis. These Rankl-directed siRNAs significantly prevents tumor relapse when combined with ifosfamide as compared to chemotherapy alone in two osteosarcoma model. SiRNAs also permit to target specifically a mutated transcript that differs from the wild-type mRNA by only two nucleotides in a model of osteogenesis imperfecta. The cloning of shRNA sequences that correspond to the validated siRNAs was then perform to establish lentiviral particules for a stably correction of cells from the murin model of osteogenesis imperfecta. The increasing number of preclinical and clinical studies and our results highlight the power of this new therapeutic tool, suggesting a large-scale clinical development of siRNAs and shRNAs molecule in therapy.

Julie Rousseau
INSERM U957
NANTES