

UNIVERSITE DE NANTES

UFR DE MEDECINE

ACIDE ZOLEDRONIQUE, NOUVEL AGENT THERAPEUTIQUE DANS LE SARCOME D'EWING

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale Biologie Santé Nantes
Biologie – Médecine – Santé
Cancérologie

*présentée
et soutenue publiquement par*

Guillaume-Anthony ODRI

le 27 novembre 2014, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

**Mme FROMIGUE Olivia
Mr ITALIANO Antoine**

**Chargée de Recherche INSERM, Villejuif
Praticien Hospitalier, Bordeaux**

Examinateurs

**Mme REDINI Françoise
Mme MAREC-BERARD Perrine**

**Directrice de Recherche INSERM, Nantes
Praticien Hospitalier, Lyon**

Directeur de thèse

Mr GOUIN François

Professeur des Universités, Nantes

Table des matières

Liste des abréviations	4
Introduction	5
I - Le tissu osseux	5
1. Anatomie osseuse	5
2. Histologie	8
a. Les structures histologiques	8
b. La microarchitecture osseuse	14
3. Physiologie osseuse	15
a. L'ostéogenèse	15
b. La croissance osseuse	17
c. Le modelage osseux	17
d. Le remodelage osseux	18
4. Physiopathologie tumorale osseuse	24
II - Le sarcome d'Ewing	26
1. Epidémiologie	26
2. Clinique	26
3. Histologie	28
4. Biologie tumorale	30
5. Traitement	31
6. Les nouvelles cibles thérapeutiques	35
a. Thérapie anti EWS-ETS :	35
b. Thérapie Anti IGF1R	36
c. Autres voies	37
III - L'acide Zolédronique	39
1. Effets cellulaires des bisphosphonates	39
2. Effets des bisphosphonates sur la résorption osseuse	42
3. Effets des bisphosphonates dans les pathologies tumorales.	43

a. Effet direct des bisphosphonates sur les cellules tumorales	43
b. Effets précliniques et cliniques des bisphosphonates dans les pathologies tumorales	44
c. Effets des bisphosphonates dans les tumeurs osseuses primitives	46
d. Autres effets anti-tumoraux indirects des bisphosphonates	47
IV - Objectifs de l'étude	49
Partie 1 : Effets de l'acide Zolédonique sur le développement du sarcome d'Ewing	51
I- Introduction	52
II- Article 1	54
III- Conclusion de l'article 1	65
IV- Analyse de la sensibilité des lignées cellulaires au ZOL	66
V- Effet du ZOL in vivo : direct ou indirect ?	69
VI- Etude des phases précoces	73
VII- Discussion et conclusion de la partie I	85
Partie 2 : Effets de l'acide Zolédonique sur le développement de métastases pulmonaires	91
I- Introduction	92
II- Article 2	95
III- Complément de discussion de l'article 2	106
Conclusions et perspectives	109
Annexes	118
Bibliographie	134

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

FPPS : farnesyl pyrophosphate synthase

HAP : Hydroxyapatite

IGF: insulin like growth factor

IPP: isopentenyl pyrophosphate

IV: intraveineux

RANK: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa

RANKL: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand

SE : Sarcome d'Ewing

SC : sous cutané

TGF β : transforming growth factor beta

TNF α : tumor necrosis factor alpha

VEGF: vascular endothelial growth factor

ZOL: Acide zolédronique

Introduction

I - Le tissu osseux

1. Anatomie osseuse

Chez les vertébrés, le squelette est l'organe rigide de soutien de l'organisme. D'un point de vue mécanique, il participe à la locomotion et protège les organes « nobles » de la cage thoracique et de la boîte crânienne contre les agressions physiques extérieures. Il présente également un rôle métabolique important car il est le siège de plusieurs processus physiologiques essentiels.

Le corps humain comporte 213 os en excluant les os sésamoïdes, dont 126 os pour le squelette appendiculaire, 74 pour le squelette axial et 6 ossicules auriculaires¹. Anatomiquement, on différencie 2 formes d'os : les os tubulaires (os longs des extrémités, clavicule, os courts des mains et des pieds) et les os plats (os du crâne et de la face, scapula, sternum, pelvis). Les os tubulaires ont tous la même organisation : ils comportent une partie centrale appelée diaphyse, entourée de 2 zones renflées appelées épiphyses, qui entrent dans la constitution des articulations et qui sont recouvertes du cartilage articulaire (figure 1). La diaphyse et les épiphyses sont reliées par 2 parties intermédiaires coniques appelées métaphyses. Les os plats par contre ont une forme spécifique à chaque os et ne comportent pas de diaphyse.

A l'intérieur de chaque os, on observe 2 zones distinctes : une zone dense périphérique appelée os compact (ou os cortical, ou os haversien), et une zone centrale appelée os spongieux (ou os trabéculaire). La diaphyse est organisée avec une zone corticale périphérique épaisse et dense et d'un canal médullaire central dans lequel on trouve de l'os spongieux et de la moelle hématopoïétique, alors que les épiphyses sont constituées d'une corticale périphérique fine et d'une

importante zone médullaire d'os spongieux. La métaphyse est la zone de transition où la corticale s'amincie entre la diaphyse et l'épiphyse. Les os plats sont constitués de 2 plaques d'os cortical et d'une fine zone d'os spongieux entre ces 2 plaques. Le squelette humain adulte est composé de 80% d'os cortical et de 20% d'os spongieux de manière générale², mais ces proportions varient selon la localisation dans le squelette. Ainsi les vertèbres ont un ratio os cortical/ os spongieux de 25%/75%, alors que pour la diaphyse radiale, ce ratio est de 95%/5%¹. L'os cortical a une porosité de 5 à 10% et une forte résistance mécanique en torsion, flexion et compression. L'os spongieux a une porosité de 50 à 90%, il représente un lieu d'activités métaboliques intenses, permet une réponse rapide aux stimuli mécaniques car il autorise une certaine déformation pour l'absorption des charges.

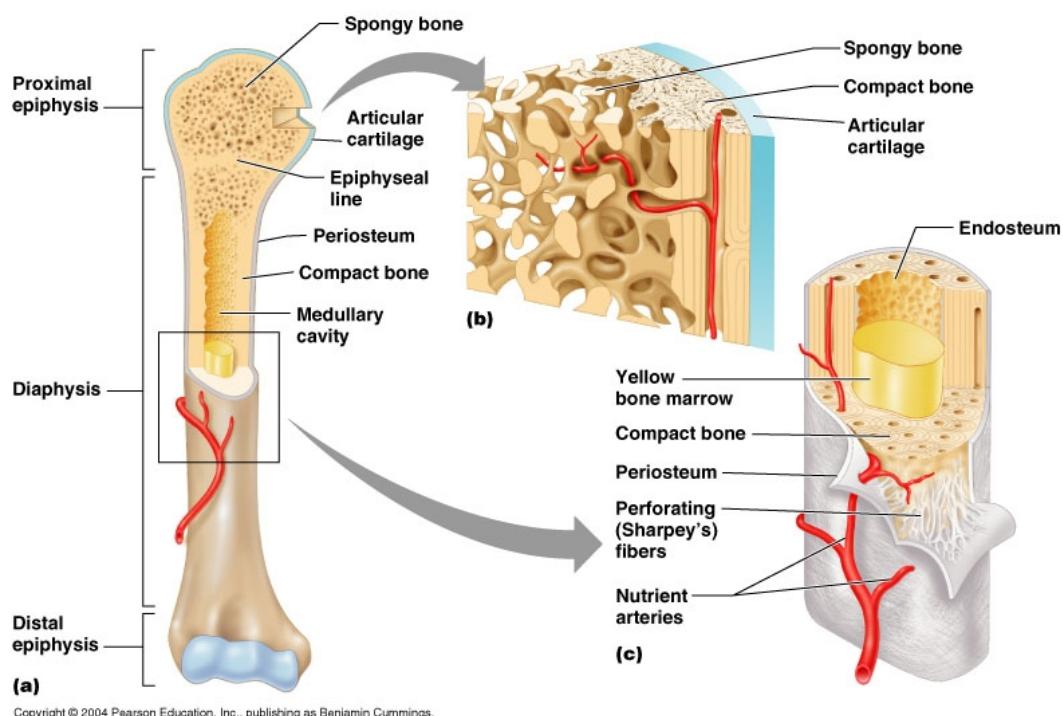


Figure 1. Anatomie osseuse d'un os long : humérus humain dont la moitié proximale a été ouverte (a). On observe les 2 épiphyses et la diaphyse, ainsi que l'organisation en os spongieux central et cortical périphérique. Grossissements de l'épiphyse (b) et de la diaphyse (c) permettant d'observer la vascularisation.

La surface externe de l'os cortical est entourée par une couche de tissu fibro-cellulaire appelée le périoste, sauf au niveau des articulations où l'os est recouvert du cartilage articulaire (figures 1 et 2).

Le périoste est attaché à la partie externe de l'os par les fibres de Sharpey. Il permet une fixation des tendons et des ligaments à l'os. Sur la surface interne de l'os cortical et sur les trabécules d'os spongieux, on trouve une couche de cellules quiescentes appelées cellules bordantes ou endoste.

Ces cellules sont en contact avec la moelle osseuse, l'os trabéculaire et les vaisseaux.

La vascularisation de l'os provient pour l'essentiel de vaisseaux pénétrant l'os cortical au niveau du tiers moyen de la diaphyse. Ces vaisseaux rejoignent la médullaire et se divisent en une branche ascendante et une branche descendante. Elles se ramifient ensuite dans les canaux de Havers pour vasculariser la médullaire et les deux tiers internes de la corticale (figure 2). Le tiers externe de la corticale est vascularisé par les vaisseaux périostés qui pénètrent dans l'os par les canaux de Volkman et s'anastomose avec le système vasculaire d'origine médullaire (figure 2).

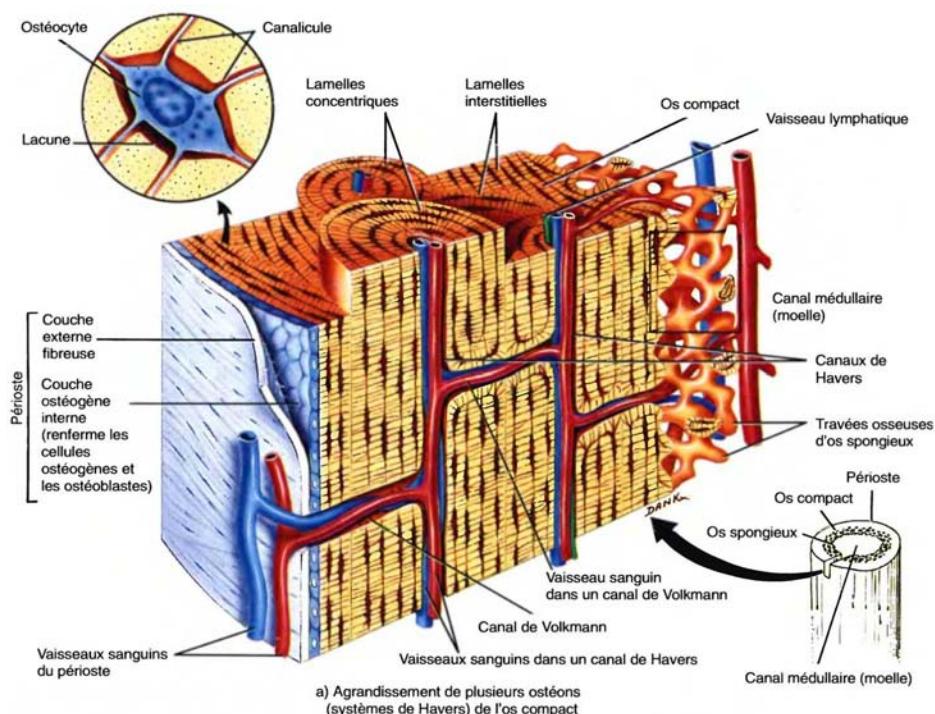


Figure 2. Microarchitecture osseuse de l'os compact. On observe les ostéons et les canaux de Havers longitudinaux centraux. Les canaux de Volkman apportent la vascularisation dans les lamelles d'os compact à partir de la vascularisation médullaire et périostée.

2. Histologie

a. *Les structures histologiques*

Le tissu osseux est constitué de cellules spécialisées, d'une matrice extracellulaire minéralisée et d'une matrice organique.

Les cellules

Elles représentent 10% du volume total de l'os :

- Les ostéoclastes³ : ce sont des cellules géantes multinucléées, mesurant 10 à 100µm de diamètre, comprenant 2 à 30 noyaux, et responsables de la résorption osseuse (figure 3). Les ostéoclastes sont originaires de cellules souches hématopoïétiques et dérivent de précurseurs mononucléés de la lignée monocytes-macrophages. Ces précurseurs se différencient sous l'influence de facteurs solubles tels que le RANKL et le M-CSF, sécrétés par les cellules stromales, les ostéoblastes et les ostéocytes, ou par contact direct avec ces cellules⁴ (figure 4). La cellule mature peut ensuite être activée, principalement sous l'effet du RANKL, et devient polarisée avec apparition d'une zone d'ancre au contact de la surface osseuse permettant leur fixation à la matrice par les intégrines⁵ ($\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$), avec création d'un espace étroit et hermétique qui correspond à la zone de résorption. Dans cette zone de résorption, la membrane se dote de nombreux replis (bordure en brosse) au niveau desquels s'effectueront les échanges lors de la résorption osseuse (figure 3 A et B)).



Figure 3. A : Ostéoclast activé et polarisé résorbant une pastille de dentine (en noir), observé au microscope électronique à transmission (x5000). B : Ostéoclaste et la lacune de résorption, microscope électronique à balayage (x5000).

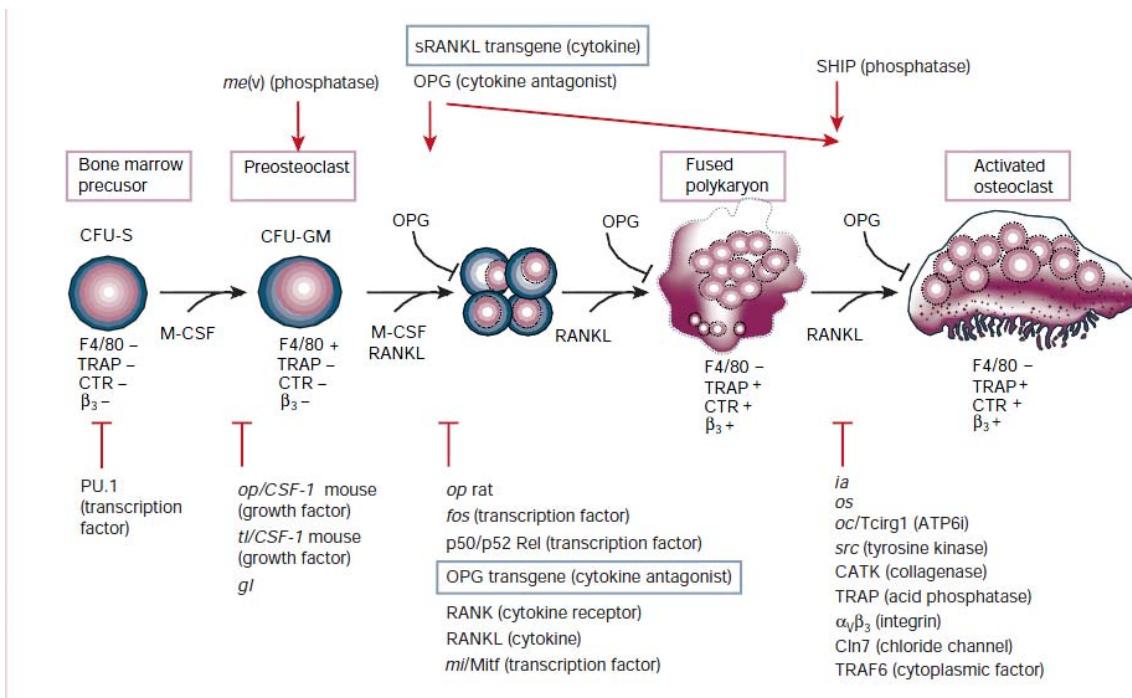


Figure 4. La différentiation ostéoclastique⁴. Elle s'effectue à partir d'un précurseur hématopoïétique, et chaque étape est régulée par la balance entre activateurs et inhibiteurs (M-CSF, RANKL, OPG).

- Les ostéoblastes : ce sont des cellules mononucléées qui dérivent des cellules souches mésenchymateuses pluripotentes communes aux chondrocytes, adipocytes, myocytes et fibroblastes. Ces cellules souches mésenchymateuses sont d'origine mésodermique dans la plupart des sites, sauf au niveau des os du crâne où elles ont pour origine les crêtes neurales. Les ostéoblastes sont les cellules ostéoprogénitrices. On les trouve principalement dans le périoste et le stroma de la moelle osseuse au niveau des sites de remodelage osseux. Le pré-ostéoblaste a une forme spiculée et leur différenciation est sous l'influence des voies Cbfa1/Runx2 et Wnt/β catenin⁶ (figure 5). Les ostéoblastes différenciés sont des cellules cuboïdales disposées en couches monocellulaires sur la surface osseuse ayant pour fonction la synthèse des protéines de la matrice organique (Figure 9A). Elles présentent une polarisation avec hypertrophie des nucléis, de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique au niveau apical pour la production de protéines matricielles et des collagènes. Le cytoplasme renferme des vésicules riches en calcium qui vont servir à la minéralisation de la matrice. Ils sont reliés entre eux par des jonctions de type adherens comprenant des cadhérines et des desmosomes en liaison à leur cytosquelette. A la fin de la minéralisation, les glucocorticoïdes en excès entraînent l'apoptose de la majorité des ostéoblastes (65%), les autres se transformant en cellules bordantes ou en ostéocytes.

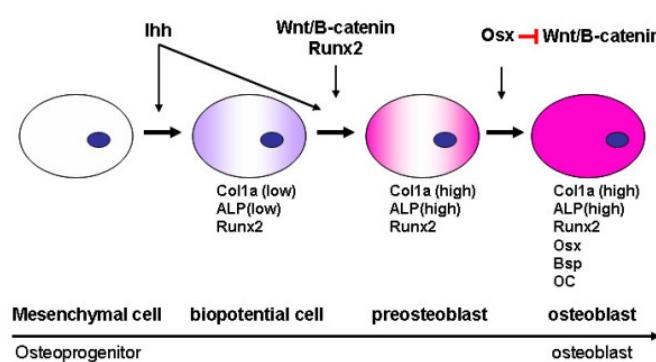


Figure 5. Modèle de coordination de la régulation de la différenciation et de la prolifération ostéoblastique lors de la formation osseuse (selon Zhang et al⁷). Les voies Cbfa1/Runx2 et Wnt/β catenin sont les principales concernées lors de ce processus.

- Les ostéocytes : représentent 90 à 95% des cellules osseuses⁸, on en dénombre 25000/mm³ d'os. Ils proviennent de la différenciation terminale de certains ostéoblastes, encastrés dans des lacunes au sein de la matrice osseuse. Lors de cet enfouissement dans la matrice, ils produisent des extensions cytoplasmiques dans des canalicules (Figure 2 et 6), sous l'action de MT1-MMP⁹, qui vont les mettre en relation avec les cellules bordantes et d'autres ostéocytes au moyen de gap-jonctions et d'hémi-jonctions. Les substances nutritives proviennent par les extensions cytoplasmiques présentes dans les canalicules⁹ mais également par ces jonctions entre les ostéocytes qui permettent une communication directe. Les ostéocytes ont une fonction essentielle dans le remodelage osseux car ils sont la principale source de RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand) nécessaire au recrutement et à la différenciation des ostéoclastes¹⁰. Lors de divers stimuli, les ostéocytes meurent par apoptose, entraînant la libération de RANKL, ce qui va stimuler le recrutement d'ostéoclastes. Les stimuli peuvent être la présence de microfractures libérant des facteurs proapoptotiques, la privation en oxygène ou en œstrogènes, les glucocorticoïdes, le TNFα et l'IL1. Les inhibiteurs de l'apoptose des ostéocytes comprennent les œstrogènes, les bisphosphonates, la calcitonine, le CD40 Ligand, la calbindin D28k et les Monocyte Chemotactic Proteins 1 et 3. L'apoptose des ostéocytes est donc essentielle au remodelage osseux, et tout phénomène perturbant cette apoptose entraînera des troubles liés à cette inhibition du remodelage. Les ostéocytes contrôlent également la production osseuse à travers la sclerostine qui constitue un marqueur spécifique des ostéocytes¹¹.

Ils peuvent remodeler la lacune péricytaire, en résorbant l'os environnant ou au contraire en produisant de la matrice osseuse. En effet, ils peuvent exprimer TRAP et la cathepsine K sous certaines conditions nécessitant une mobilisation rapide des minéraux osseux, par exemple lors de la lactation¹². La formation d'os nouveaux a été observée dans ces lacunes notamment lors du vieillissement des ostéocytes avec micropétrose des lacunes et mort des ostéocytes. Enfin, ils ont une fonction de mécanosensation par leurs dendrites. Sous l'effet d'un stress mécanique, ils

produisent la prostaglandine E2(PGE2), de l'ATP et du monoxyde d'azote (NO). Le NO et la PGE2 inhibent la résorption et stimulent la formation d'os.

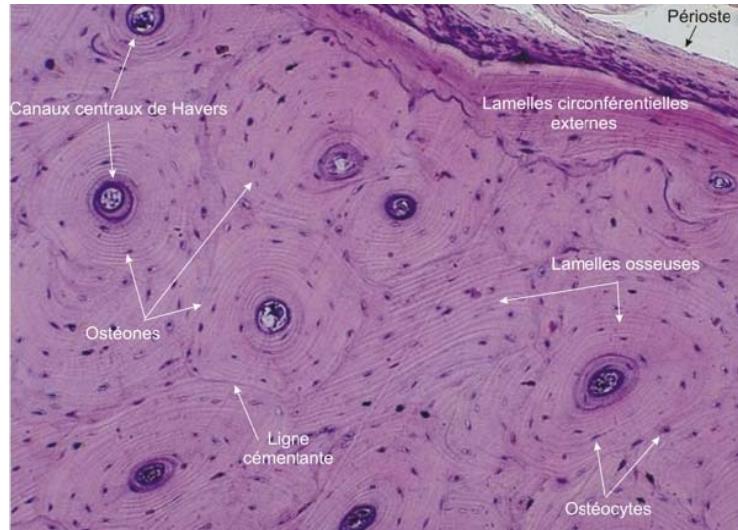


Figure 6. Coupe histologique d'os compact de la diaphyse d'un os long (Coloration Hemalin Eosine, x300, microscopie optique). On observe les ostéocytes encastrés entre les lamelles d'os cortical.

- Les cellules bordantes : ce sont des ostéoblastes aplatis avec activité métabolique très réduite. La majorité des surfaces trabéculaires sont recouvertes de cellules bordantes, seulement 15% de la surface du tissu osseux étant recouverte par des ostéoblastes actifs. Elles assurent l'interface entre la surface osseuse, l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse, mais elles sont également capables de se redifférencier en ostéoblastes actifs¹³. Elles jouent un rôle dans la phase initiale du remodelage et libèrent la surface osseuse pour que celle-ci soit accessible aux ostéoclastes¹⁴.

La matrice osseuse

- La matrice organique :

- o Les protéines collagéniques : elles représentent 85 à 90% des protéines du tissu osseux, principalement du collagène de type I (80% du collagène). Le collagène de type I est constitué de fibres de 300nm sur 1.5nm, comportant trois chaînes élémentaires torsadées en triple hélice, 2 chaîne α_1 et une chaîne α_2 ¹⁵. On trouve également du collagène de type III (5-15%), IV et V (5%), et de nombreuses fibrilles à triple hélice interrompues associées aux collagènes (FACIT) qui constituent des ponts moléculaires pour organiser et stabiliser les grandes fibres de collagène de type I. Il s'agit des collagènes de type IX, XII, XIV, XIX, XX et XXI.

- o Les protéines non collagéniques : elles représentent 10 à 15% des protéines dont 25% de protéines provenant directement du sérum tel que l'albumine sérique, la glycoprotéine α_2 -HS et de nombreux facteurs de croissance qui se lient à l'hydroxyapatite par leur propriétés acides. Les autres protéines sont fabriquées par les ostéoblastes tels que les protéoglycans, l'ostéonectine, les protéines glycosylées (la phosphatase alcaline par exemple), et des protéines γ -carboxylées. Ces protéines jouent un rôle dans la régulation de la minéralisation de la matrice. L'ostéocalcine représente 10 à 20% des protéines non collagéniques, elle contient des résidus d'acide glutamique carboxylés et permet l'attraction des ostéoclastes dans les foyers de résorption et la minéralisation¹⁶.

- La matrice minérale : elle est constituée principalement des cristaux d'hydroxyapatite (HAP : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$), qui représentent 70% du poids de l'os, mais aussi d'ions carbonate, de magnésium et d'acides phosphatés. Les cristaux d'HAP mesurent 200 Angström et sont plus solubles que l'HAP géologique ce qui permet une meilleure régulation métabolique. Ils représentent 99% des réserves de calcium (1kg au total), 85% du phosphore, 40-60% du sodium et du magnésium.

b. *La microarchitecture osseuse*

Le tissu osseux peut être organisé en 3 structures histologiques (figure 2 et 6):

- Les ostéons ou système de Havers, sont des cylindres longitudinaux de 400µm de long sur 200µm de large, parallèles à l'axe de l'os, constitués de 4 à 20 lamelles osseuses concentriques, dans lesquelles sont encastrés les ostéocytes. Ces lamelles entourent un canal central (de Havers) délimité par une couche de cellules endostéales et contenant des cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes), des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des expansions nerveuses. Les lamelles sont constituées de fibres de collagène dont l'orientation est alternée ce qui augmente leur résistance. Du canal central partent de nombreux canalicules radiaux, perpendiculairement ou obliquement au canal central, reliant les ostéocytes, ainsi que des canaux transversaux (canaux de Volkman) qui relient les ostéons, le canal médullaire et le périoste, et qui contiennent des éléments vasculo-nerveux. On estime le nombre d'ostéons à 21.10^6 chez un adulte sain, pour une surface de remodelage de 3,5m².

Les ostéons se retrouvent principalement au niveau de l'os cortical.

- L'os trabéculaire : il est constitué de travées de tissu osseux plus ou moins confluentes disposées en peigne, mesurant 50 à 400µm de long pour 35µm d'épaisseur, entourés de cellules et de vaisseaux sinusoïdes, entre lesquelles se situe la moelle osseuse hématopoïétique, permettant une importante porosité et une grande surface d'échanges métaboliques. L'os trabéculaire constitue la majorité de l'os spongieux et on estime le nombre de trabécules à 14.10^6 chez un adulte sain, pour une surface de remodelage de 7m²

- L'os circonférentiel (ou os lamellaire compact non haversien): il résulte de l'ossification périphérique périosté. Il s'agit de lamelles osseuses bordant les surfaces externe et interne de l'os cortical et qui séparent l'os haversien du périoste et de l'endoste (figure 6).

3. Physiologie osseuse

a. L'ostéogenèse

Il s'agit de la formation du tissu osseux. On distingue 2 types de formations du tissu osseux, et dans les 2 cas, il s'agit d'un processus de métaplasie au cours duquel un tissu conjonctif est transformé en tissu osseux.

- L'ossification membraneuse : il s'agit du premier type d'ossification à être apparu d'un point de vue phylogénique, chez les poissons agnathes il y a 490 millions d'années sous forme de plaques dermiques à la surface de l'animal. Il s'agit du mode de formation des os plats tels que la scapula, les os du crâne et du massif facial. Cette ossification se fait autour d'un noyau d'ossification apparu dans le tissu mésenchymateux, par apposition osseuse à partir d'une membrane (le périoste) et ne passe pas par une trame cartilagineuse.
- L'ossification enchondrale : apparue plus tardivement d'un point de vue phylogénique, elle s'observe dans l'ossification et la croissance des os longs. L'ossification enchondrale se fait à partir d'une zone de cartilage hyalin dans laquelle il y a une prolifération de chondrocytes, avec 4 zones distinctes correspondant à une maturation progressive des chondrocytes, de l'épiphyse vers la métaphyse : la zone de repos avec des chondrocytes normaux, la zone proliférative, la zone hypertrophique et la zone de calcification comprenant des

chondrocytes lysés, ce qui promeut la croissance de capillaires et la migration des cellules ostéoprogénitrices pour la production osseuse (figure 8). Dans la zone hypertrophique, les chondrocytes hypertrophiques produisent le RANKL nécessaire à l'activation des ostéoclastes qui vont dégrader le cartilage calcifié.

Au cours de la maturation de l'organisme, chaque os présente 3 périodes d'ossification (figure 7) :

- L'ossification primaire : il s'agit de la première ossification pendant l'embryogenèse, qui peut être enchondrale ou membraneuse selon les sites. Il s'agit d'os non lamellaire.
- L'ossification secondaire : Elle se déroule pendant l'embryogenèse également et consiste en la destruction de l'os non lamellaire formé lors de l'ossification primaire et en la production d'os lamellaire par des ostéoblastes.
- L'ossification tertiaire ou remodelage osseux permanent : c'est l'équilibre permanent entre la construction et la destruction pendant toute la vie

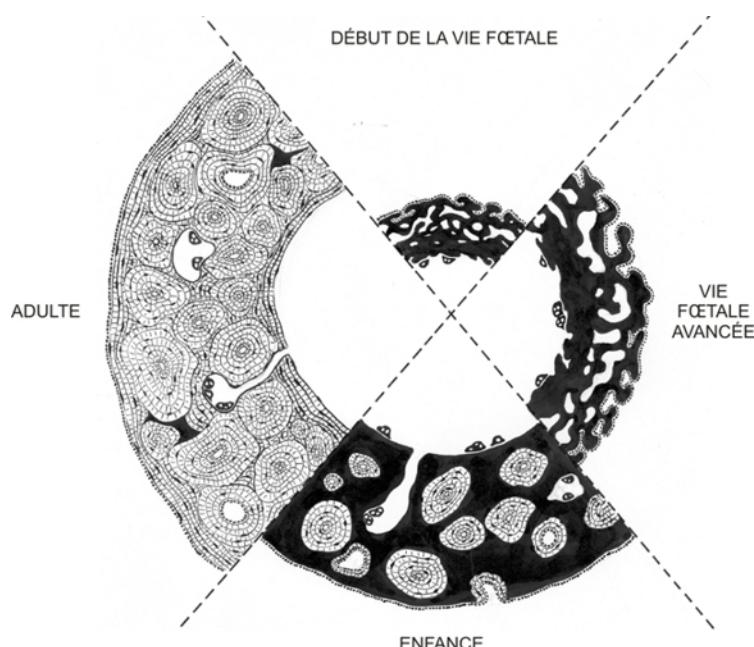


Figure 7. Schéma des stades histologiques de la croissance de la diaphyse d'un os long en coupe transversale. L'os primaire est en noir, l'os lamellaire est en pâle. On observe la transition d'un os non lamellaire à un os lamellaire.

b. La croissance osseuse

La croissance osseuse se déroule pendant l'enfance et l'adolescence et elle peut être longitudinale ou radiale :

- La croissance radiale se fait par ossification membraneuse. C'est la méthode de croissance des os plats. Ce type d'ossification perdure à l'âge adulte et s'observe dans le processus de modelage osseux ou de cicatrisation des fractures.
- La croissance longitudinale a lieu au niveau de la plaque de croissance (ou cartilage de conjugaison) entre l'épiphyse et la métaphyse des os longs par ossification enchondrale (figure 8). Elle est sous contrôle de l'hormone somatotrope (STH). Il y a un pic de croissance au début de la puberté, et la fin de la croissance longitudinale correspond à l'ossification du cartilage de croissance, qui est irréversible.

c. Le modelage osseux

Il s'agit du changement de la structure osseuse sous l'influence de facteurs mécaniques physiologiques. C'est donc l'ajustement progressif de l'architecture osseuse aux forces qu'il rencontre. Le phénomène d'apposition périosté et de résorption endosté entraîne un élargissement progressif de l'os. Selon la loi de Wolff, les os longs changent de forme pour s'accommoder au stress mécanique.

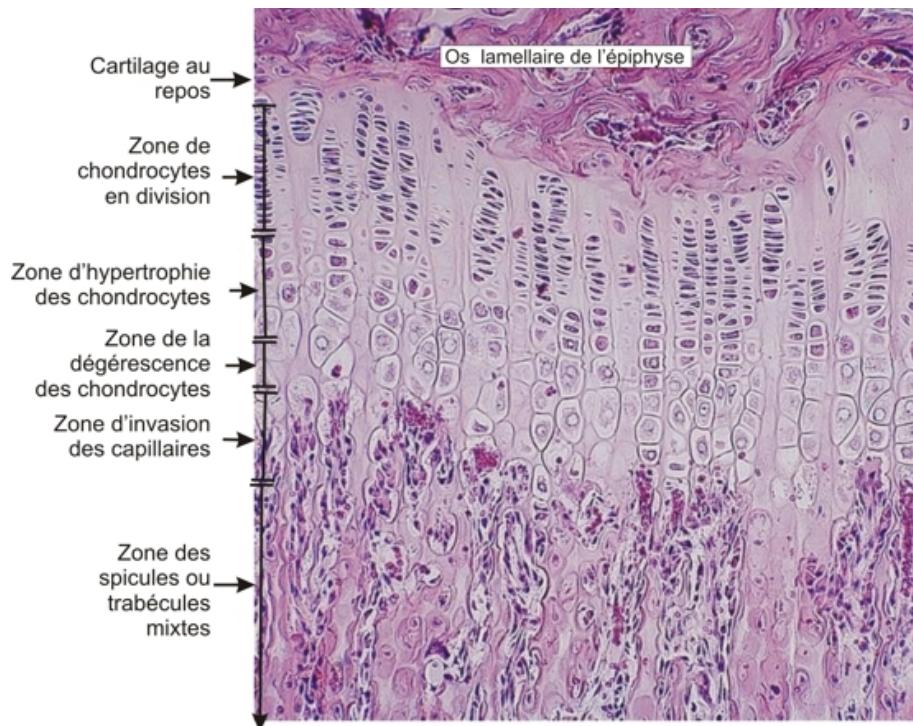


Figure 8. Coupe histologique d'une plaque épiphysaire d'un os long en croissance (Coloration Hemalin Eosine, x300). On observe une maturation progressive des chondrocytes de l'épiphyse vers la diaphyse, et disparition de la trame cartilagineuse au profit de vaisseaux sanguins, de cellules et de tissu osseux.

d. *Le remodelage osseux*

Le remodelage fait intervenir 2 processus, la destruction de l'os ancien par les ostéoclastes et la formation d'un tissu osseux nouveau par les ostéoblastes, les deux types cellulaires agissant de façon orchestrée dans l'espace et le temps (figure 9 et 10). Ce remodelage a pour but le renouvellement de l'os pour maintenir sa résistance et pour l'homéostasie minérale. Il peut être déclenché par des stimuli mécaniques (microfractures, augmentation des contraintes) ou des stimuli hormonaux.

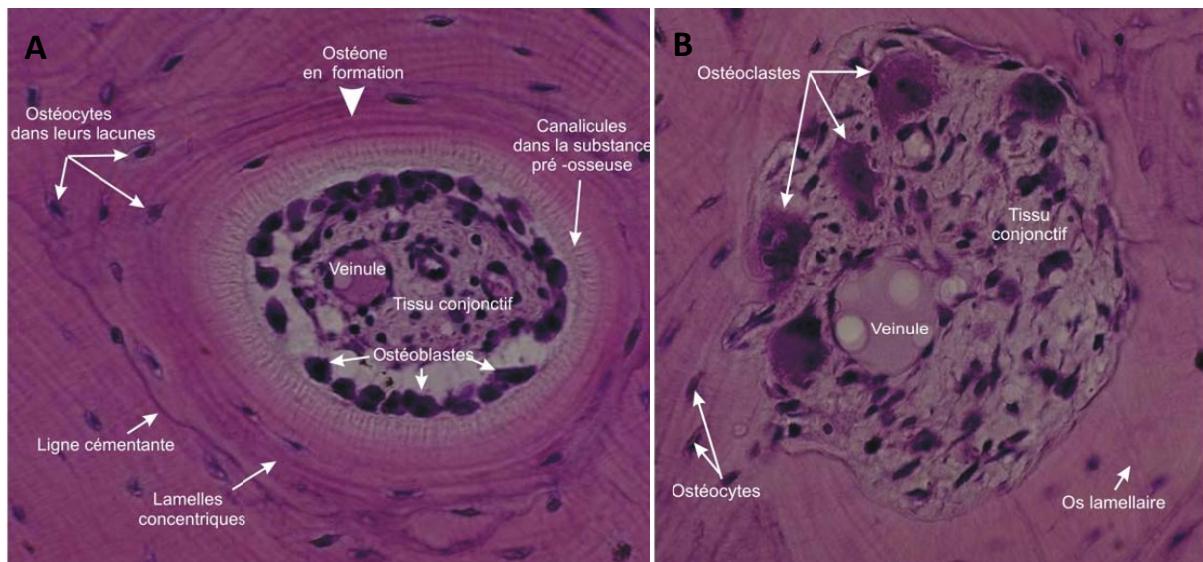


Figure 9. A : Zone de formation d'un ostéon : les ostéoblastes forment une couche de cellule qui produit la matrice protéique osseuse. B : Zone de résorption de l'os : les ostéoclastes au contact de la matrice minéralisée forment des lacunes de résorption dans lesquelles les cristaux d'hydroxyapatite sont solubilisés. (Coloration Hemalin Eosine, x1200, microscopie optique).

Le remodelage osseux comprend 4 phases (figure 10):

La phase d'activation

Pendant cette phase, les pré-ostéoclastes sont recrutés et activés au niveau de la zone de résorption. Sous l'influence de facteurs ostéorésorbants, les cellules bordantes se rétractent et laissent la place aux précurseurs ostéoclastiques qui peuvent alors se fixer à la matrice osseuse. Les ostéoblastes environnants recrutent et activent les précurseurs ostéoclastiques circulants¹⁷ à l'aide de cytokines, la plus importante étant RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand) qui va interagir avec son récepteur RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B) présent à la surface des pré-ostéoclastes¹⁸. Ceux-ci fusionnent et se lient à la matrice par des intégrines membranaires¹⁹ ($\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$). Celles-ci s'associent à un noyau d'actine et à d'autres protéines du cytosquelette pour former des podosomes qui se lient à l'ostéopontine, à la vitronectine et à la

sialoproteine osseuse de la matrice extracellulaire, et ce qui permet une polarisation avec le développement de nombreux replis de la membrane plasmique appelés bordure en brosse, au contact de la matrice osseuse. Il existe ainsi une réorganisation du cytosquelette avec création d'un anneau d'actine à l'origine d'une zone hermétiquement fermée qui constitue le compartiment de résorption²⁰. La formation et l'activation des ostéoclastes et la résorption sont régulées par le ratio RANKL/OPG, l'IL1 et IL6, le CSF, la PTH, la 1,25 VitD et la calcitonine^{4,21}.

La phase de résorption

Elle dure 2 à 4 semaines. Elle consiste à solubiliser les cristaux présents dans la matrice et à dégrader les protéines matricielles. Dans la zone de résorption sont sécrétés des ions H⁺ par des pompes à protons ATP dépendantes et des ions CL⁻ par des canaux chlorés²². Ceci entraîne une baisse du pH dans la zone de résorption, ce qui solubilise les minéraux. Des lysosomes cytoplasmiques contenant la cathepsine K, la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP), des metalloprotéinases (MMP) et des gélatinases, sont transportés par les microtubules au niveau de la bordure en brosse où ils fusionnent avec la membrane²³. Ces enzymes vont dégrader la matrice protéique et créer une lacune (lacune de Howship)²⁴.

Lorsque la profondeur maximale de résorption a été atteinte, l'augmentation de la concentration en calcium dans la lacune va perturber l'anneau d'actine, rendant la lacune moins hermétique. Il va y avoir augmentation du pH dans la lacune, et augmentation de l'activité de la Matrix Metallo-Proteinase 9 (MMP9), ce qui va entraîner la perte d'adhésion des ostéoclastes qui meurent par apoptose médiée par la voie Fas/Fas Ligand^{25,26}.

La phase d'inversion

Les cellules mononucléées envahissent la lacune de Howship sous l'influence de signaux moléculaires présents dans la matrice dégradée (TGF β , IGF-1, IGF-2, BMP, PDGF, FGF). Le TGF β augmente lors de la résorption osseuse, de même que l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline osseuse. Le TGF β diminue la résorption par les ostéoclastes en inhibant la production de RANKL par les ostéoblastes. De même, les contraintes mécaniques aux abords de la lacune de Howship participent car les ostéoclastes sont activés par des contraintes faibles, alors que les ostéoblastes sont activés par des contraintes fortes²⁷.

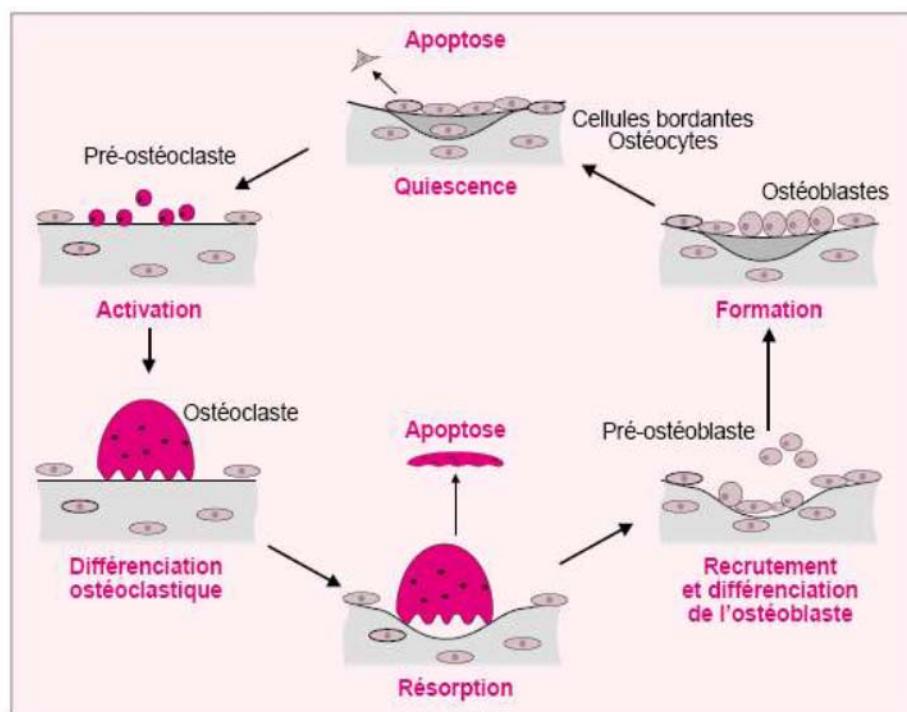


Figure 10. Les différentes phases du remodelage osseux. Des stimuli mécaniques ou hormonaux peuvent déclencher l'apoptose des cellules bordantes et l'activation ostéoclastique, entraînant une ostéolyse. À la fin de la résorption, il y a apoptose des ostéoclastes, exposant la matrice osseuse à des préostéoblastes qui vont se différencier en ostéoblastes matures et produire la matrice protéique osseuse. Cette matrice va ensuite se minéraliser, les ostéoblastes se transformant en ostéocytes ou en cellules bordantes.

La phase de formation

Cette phase dure de 4 à 6 mois et correspond à la synthèse de la matrice organique suivie de la minéralisation de cette matrice 15 jours plus tard. La propriété solide de l'os est obtenue grâce à la minéralisation par transformation du calcium et du phosphate soluble en cristaux solides de phosphate calcique. La minéralisation est régulée par les ostéoblastes et les protéines non collagéniques de la matrice organique ainsi que par la destruction enzymatique d'inhibiteurs de la minéralisation tels que les pyrophosphates et les protéoglycans. Des vésicules produites et sécrétées dans la matrice par les ostéoblastes contiennent un noyau de nucléation constitué des protéines de nucléation, des acides phospholipidiques, du calcium et du phosphate inorganique. Ces protéines promotrices de la nucléation, telles que la dentin matrix protein 1, la sialoprotéine osseuse, la phosphatase alcaline et des phosphoprotéines kinases, augmentent la concentration locale en phosphates, modifient les phosphoprotéines pour qu'elles agissent en nucléateur, ce qui entraîne la précipitation de l'HAP. Les macromolécules matricielles facilitent également la nucléation en concentrant les ions minéraux avec augmentation de la concentration locale en calcium et phosphate. La phosphatase alcaline osseuse hydrolyse les esters phosphoriques qui inhibent la minéralisation.

Pendant cette synthèse de la matrice et la minéralisation, certains ostéoblastes sont piégés et deviennent des ostéocytes, interconnectés entre eux et avec les cellules bordantes par des gap-junctions sur des expansions cytoplasmiques dans un réseau complexe de canalicules. A la fin de la formation osseuse, 50 à 70% des ostéoblastes meurent par apoptose, le reste devient des ostéocytes ou des cellules bordantes. Les cellules bordantes constituent l'interface entre le sang et l'os, et peuvent se redifférencier en ostéoblastes.

Ainsi le turn-over cortical est de 2 à 3% par an, plus important pour l'os trabéculaire car il participe au métabolisme minéral. Ce qui déclenche le remodelage sont les microfissures et l'apoptose des ostéocytes. L'équilibre entre la résorption et la formation est essentiel au maintien de l'intégrité de la structure osseuse et doit être finement régulé. La régulation du remodelage osseux

se fait par l'intermédiaire d'hormones et de facteurs stockés dans la matrice osseuse, la plupart agissant par l'intermédiaire de la triade moléculaire Osteoprotegerin(OPG), Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B (RANK) et RANK Ligand (RANKL) (figure 11)²⁸. Ces trois protéines appartiennent à la superfamille du Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) et de ses récepteurs. RANK est une protéine membranaire exprimée à la surface des progéniteurs ostéoclastiques et des ostéoclastes matures, RANKL est exprimée à la surface des ostéoblastes ainsi que sous forme soluble. La liaison de RANKL à RANK induit la différenciation et l'activation des ostéoclastes matures et active donc la résorption osseuse. L'OPG est un récepteur soluble de RANKL qui agit comme un leurre et empêche la liaison RANK/RANKL, elle a donc un effet anti-résorption osseuse.

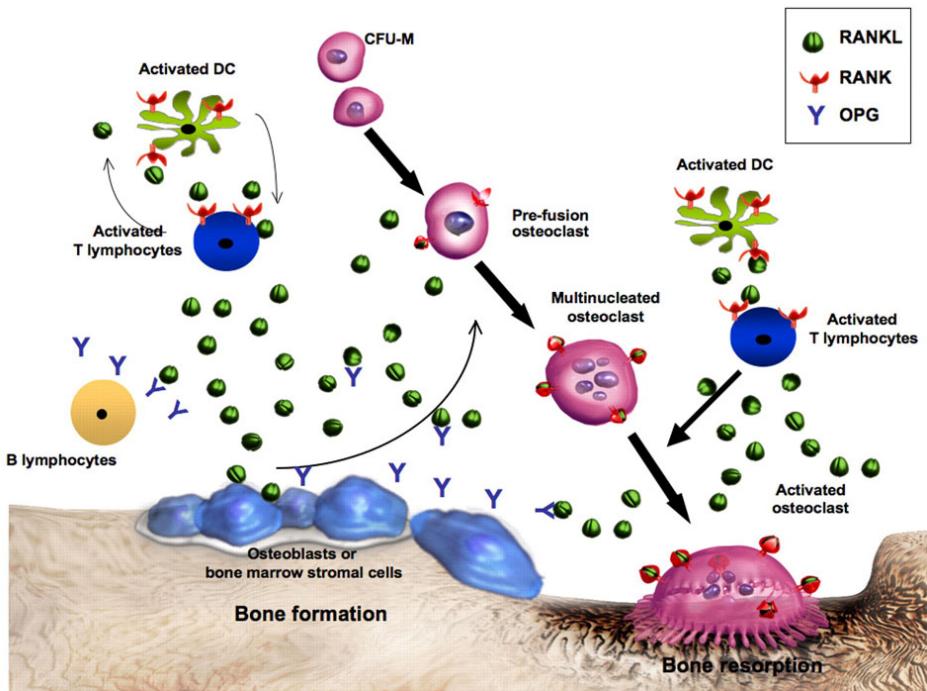


Figure 11. La triade RANK/RANKL/OPG (d'après Amgen, adapté de Boyle et al⁴). RANKL produit par les ostéoblastes activent le RANK situé à la surface des préostéoclastes, ce qui induit leur différenciation et leur activation. L'OPG est le récepteur soluble de RANKL et inhibe sa fixation au RANK sur les préostéoclastes, et inhibe donc l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse.

4. Physiopathologie tumorale osseuse

L'os est fréquemment le siège de développement de pathologies tumorales, le plus souvent secondaires par processus métastatique (cancers du sein, prostate, poumon et rein parmi les plus fréquents), mais aussi primitives (ostéosarcome, sarcome d'Ewing et chondrosarcome), bien que beaucoup plus rares. Lors du développement tumoral en milieu osseux, on observe un déséquilibre soit en faveur de la résorption à l'origine de l'ostéolyse tumorale, soit en faveur de la formation à l'origine de l'ostéocondensation. Ces dérégulations de la balance du remodelage osseux sont à l'origine d'une morbidité osseuse importante (fractures, douleurs, compressions médullaires). Deux processus sont essentiels au développement d'une tumeur dans l'os : les cellules tumorales doivent pouvoir induire une ostéolyse locale, et elles doivent pouvoir se diviser en milieu osseux. En fait ces deux processus sont interdépendants dans ce qu'on appelle le cercle vicieux de l'ostéolyse tumorale (figure 12).

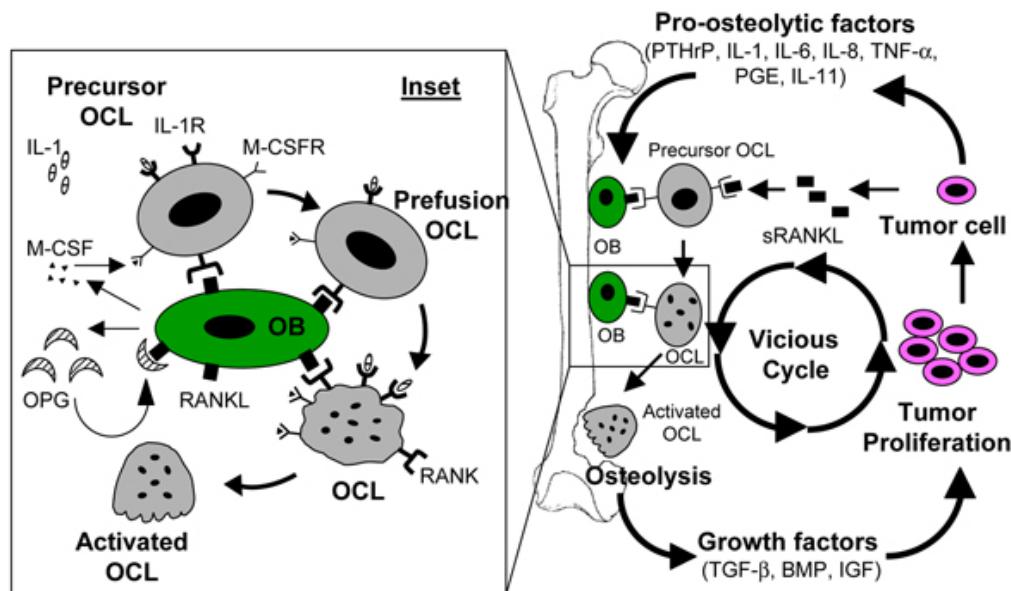


Figure 12. Le cercle vicieux de l'ostéolyse tumorale²⁹. Les cellules tumorales produisent des facteurs de croissance qui vont stimuler la différenciation et l'activation ostéoclastique. Les ostéoclastes matures vont dégrader la matrice osseuse, ce qui va libérer des facteurs de croissances qui vont à leur tour stimuler la prolifération des cellules tumorales.

Bien que les cellules tumorales peuvent participer à l'ostéolyse en produisant des protéines telles que des metalloprotéinases³⁰, il est maintenant prouvé que les ostéoclastes sont les seules cellules de l'organisme pouvant dégrader le tissu osseux³¹. Ainsi, les cellules tumorales sécrètent des facteurs pro-ostéoclastiques, soit en produisant des facteurs stimulant directement la différenciation ostéoclastique et leur activation (IL6, IL8, MCSF, VEGF, MMP...), soit en produisant des facteurs agissant sur les processus de régulation de l'ostéoclastogenèse (PTHRP, IL1, TGFβ). Cette activation ostéoclastique va entraîner une résorption osseuse qui va libérer des facteurs de croissance tels que l'IGF, le TGFβ, le VEGF. Ces facteurs de croissance vont stimuler à leur tour la croissance des cellules tumorales.

Chaque tumeur se développant en milieu tumoral possède ses propres mécanismes de stimulation de ce cercle vicieux. Cependant, malgré les nombreuses méthodes et voies développées par les cellules tumorales pour se développer en milieu osseux, il semble que des facteurs de transcription clés tels que RunX2 soient à l'origine de l'ensemble de ces mécanismes dans les métastases³².

II - Le sarcome d'Ewing

1. Epidémiologie

Les cancers sont la première cause de mortalité chez l'enfant de 1 à 14 ans depuis 2007, devant les accidents domestiques. Parmi les cancers infantiles, les tumeurs osseuses primitives malignes représentent environ 10% de l'ensemble des tumeurs de l'enfant et de l'adulte jeune et ils sont la troisième cause de mortalité après les leucémies et les tumeurs cérébrales. Le taux de survie de l'ensemble des cancers de l'enfant est de 80% à 5 ans, et pour les tumeurs osseuses, il est de 72% à 5 ans.

Le sarcome d'Ewing est la deuxième tumeur osseuse maligne primitive par ordre de fréquence, après l'ostéosarcome³³. Il touche préférentiellement l'enfant et l'adulte jeune avec un pic d'incidence observé autour de 15 ans, mais 20% des cas apparaissent dans les premières années de vie, et 20% à l'âge adulte. Actuellement on décrit 3 nouveaux cas par million d'habitant de moins de 20 ans³⁴ soit 80 nouveaux cas par an en France.

2. Clinique

La présentation clinique est non spécifique avec des douleurs locorégionales d'horaire mixte et d'intensité variable chez un adolescent actif physiquement, prises souvent à tort pour des douleurs de croissance³³. Plus tardivement, une masse palpable accompagne la douleur (Figure 13A). Le délai diagnostique est de 3 à 9 mois, d'autant plus long que la localisation est profonde (pelvis). Il s'y associe dans 15 à 20 % des cas des signes généraux, en particulier de la fièvre, une asthénie et un amaigrissement, souvent associés à une maladie métastatique ou à une localisation pelvienne.

Les localisations préférentielles sont le pelvis (25%), la diaphyse des os longs (fémur, tibia, humérus) et la paroi thoracique (côtes) cependant le sarcome d'Ewing peut survenir dans n'importe quelle partie du squelette. Le bilan pré-thérapeutique comprend une radiographie standard. Elle

permet de fortement suspecter le diagnostic de tumeur osseuse maligne devant le caractère très ostéolytique de la lésion avec un aspect multilamellaire en bulbe d'oignon, et la réaction périostée en feu d'herbe (figure 13B et 14). Parfois, la tumeur est découverte à l'occasion d'un traumatisme s'accompagnant de fracture pathologique. Une IRM permettra d'évaluer l'extension intramedullaire et dans les parties molles. Le bilan d'extension recherche des lésions disséminées, telles que des métastases pulmonaires par un scanner thoracique, des micrométastases ostéo-médullaires par de multiples myélogrammes ou biopsies ostéo-médullaires, des métastases osseuses par une scintigraphie au méthylène diphosphonate marqué au ⁹⁹Technétium, non spécifique mais évocatrice. Les métastases sont présentes lors du diagnostic initial dans 15 à 33% des cas selon les études^{33,35-39}. Dans 16% des cas cependant, la tumeur se développe dans les parties molles et n'a pas de connexion à l'os (SE extraosseux)⁴⁰.

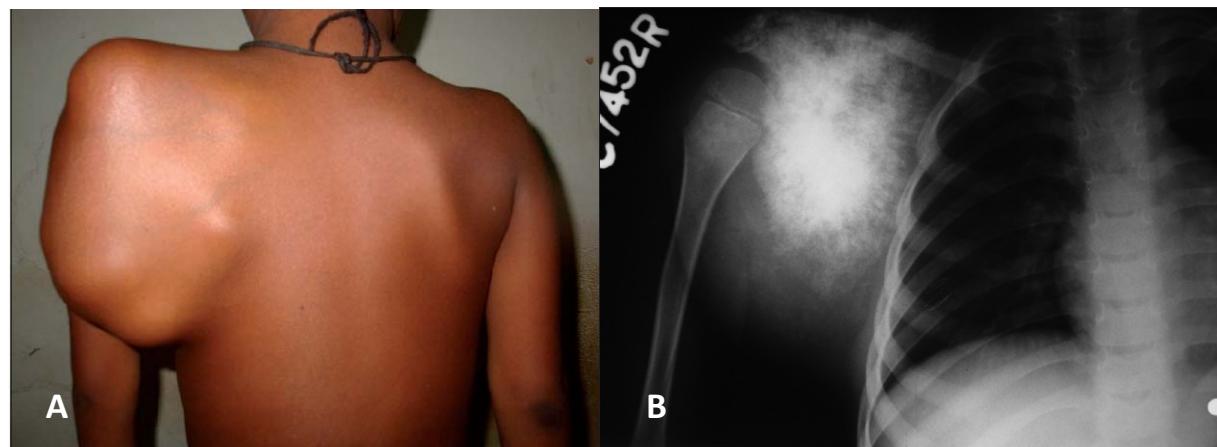


Figure 13. A : syndrome de masse d'un sarcome d'Ewing évolué au niveau de la scapula. B : aspect radiographique de cette même masse.



Figure 14. Aspect radiographique classique avec images périostées en feu d'herbe (cercles rouge et bleu).

3. Histologie

Seule la biopsie chirurgicale avec analyse histologique permet de faire le diagnostic. Décrit initialement en 1921 sous le nom d'« endothéliome diffus de l'os » par James Ewing, il a depuis été classé au sein des tumeurs neuroectodermiques (primitive neuroectodermal tumors : PNET) qui associent les tumeurs d'Askin et les tumeurs neuroectodermiques périphériques. Le sarcome d'Ewing est constitué de petites cellules rondes avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé prenant une architecture en rosettes ou pseudo-rosettes (figure 15). Parfois d'aspect typique, il existe des formes moins évocatrices nécessitant des analyses immuno-histochimiques. De nombreuses caractéristiques immuno-histochimiques ont été décrites dont la plus fréquente est l'expression du CD99 (95 à 100% des cas), mais d'autres entités tumorales peuvent exprimer certains de ces marqueurs.

La caractéristique pathognomonique, recherchée en cas de doute diagnostique, est une translocation chromosomique impliquant le chromosome 22 au niveau du gène EWS⁴¹ avec un gène de la famille ETS (FLI1 sur le chromosome 11 dans 85% des cas, ERG dans 10% des cas, ETV1, ETV5, FEV). De ces translocations résulte un gène de fusion entre EWS qui code pour une protéine de liaison à l'ARN et un gène de la famille ETS qui code pour un facteur de transcription⁴² (Figure 16).

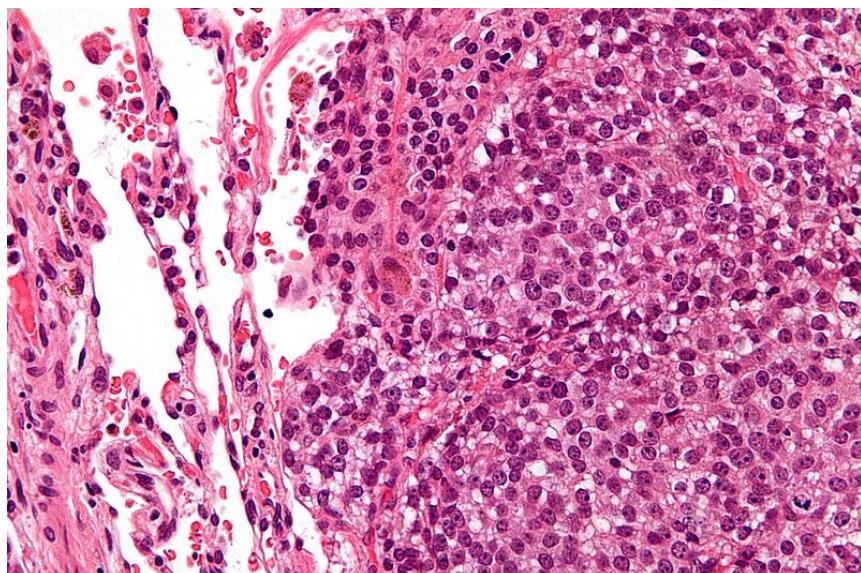


Figure 15. Aspect histologique de sarcome d'Ewing classique avec présence de petites cellules rondes (X60, coloration Hemalin Eosine).

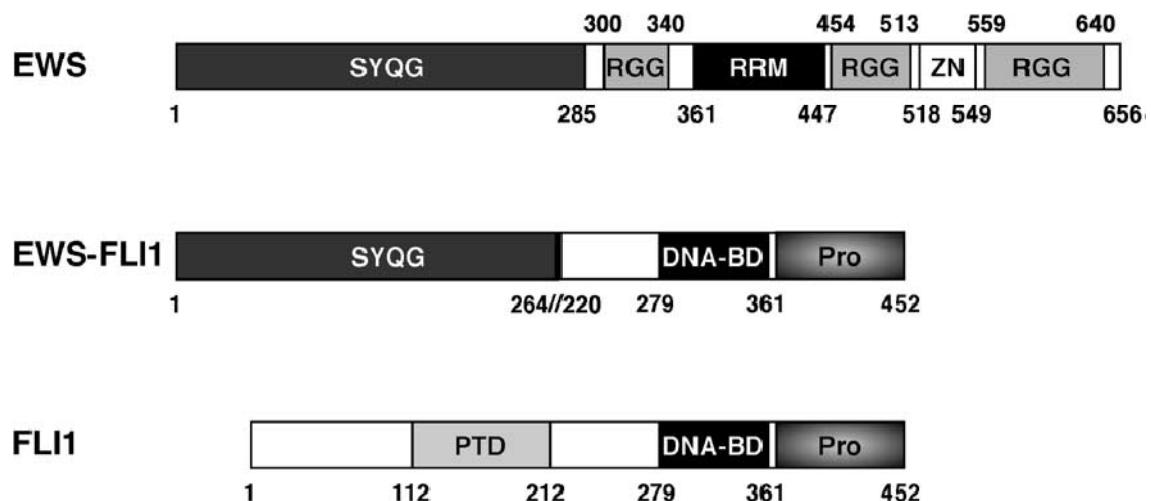


Figure 16. Gènes EWS et FLI1 et la fusion EWS/FLI1 dans le sarcome d'Ewing⁴³. La fusion EWS/FLI1 code pour un facteur de transcription aberrant comprenant un domaine de fixation à l'ADN (DNA-BD), un domaine d'activation riche en proline (PRO), et un domaine de transactivation riche en Ser-Tyr-Glu-Gly (SYQQG) en N-Term.

4. Biologie tumorale

Le gène de fusion code pour une protéine qui se comporte comme un facteur de transcription aberrant qui va déréguler de multiples voies de signalisation, et conférer le phénotype tumoral⁴⁴. L'inactivation de la protéine de fusion EWS-FLI1 par une technique de shRNA abolit le phénotype tumoral, les cellules tumorales se dédifférenciant en cellules souches mésenchymateuses⁴⁵. L'origine du sarcome d'Ewing semble donc être la conséquence de cette translocation au sein d'une cellule souche mésenchymateuse, expliquant la possibilité de sarcome d'Ewing extraosseux puisqu'il existe des cellules souches mésenchymateuses extraosseuses. L'origine de la translocation n'est pas connue mais semble liée à une intense activité mitogénique des cellules souches mésenchymateuses au cours de la croissance. Ce facteur de transcription suractivé va déréguler de multiples voies⁴⁶ impliquées dans la différenciation, la prolifération, la survie cellulaire. Il induit l'hyperexpression de certain gènes cibles (NKX2.2, NR0B1) ou l'inhibition d'autres gènes (TGFBR2, IGFBP3). Ainsi, sur certains loci, EWS/FLI1 se lie à des activateurs (tels p300/CBP) et hyperexprime le gène en question et sur d'autres loci, il se lie à des répresseurs (tel le complexe NuRD avec intervention de HDAC 2 et 3 et LSD1) et inhibe l'expression du gène⁴⁷. Cette inhibition est essentielle à la transformation oncogénique, et il y a plus de gènes inhibés que de gènes hyperexprimés. Il est difficile cependant de différencier les cibles primaires des cibles secondaires : ainsi seulement 5% des gènes réprimés dans cellules de SE le sont directement par EWS/FLI1, ce qui représente 100 gènes potentiellement directement inhibés par EWS/FLI1⁴⁷. Comme dans toutes les tumeurs se développant en milieu osseux, les cellules tumorales秘ètent des cytokines telles que le RANKL, les TNFα et β (Tumor Necrosis Factor α et β), l'IL1 et 6 (interleukines 1 et 6), la PTH-rP) (PTH related peptide), stimulant la différenciation et l'activation des ostéoclastes. Il résulte une hyper-résorption osseuse qui libère à son tour des facteurs de croissance : le TGF β (Transforming Growth Factor β) et l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) piégés dans la matrice osseuse. Les produits de dégradation de la matrice stimulent l'activité et la prolifération tumorale. Il y a donc instauration d'un cercle vicieux entre les cellules tumorales et l'environnement osseux⁴⁸ comme décrit précédemment.

5. Traitement

Le traitement du sarcome d'Ewing a beaucoup évolué ces 50 dernières années. Avant la mise en place des protocoles de chimiothérapie, l'amputation était systématique. Malgré ce traitement chirurgical radical, la récidive sous forme de métastases multiples aboutissait dans 90% des cas au décès en quelques mois. Il existait donc déjà des micrométastases au moment du diagnostic que le traitement chirurgical radical ne permettait pas d'éliminer. L'avènement des chimiothérapies dans les années 1970 a permis de révolutionner le pronostic, ciblant ainsi la tumeur et les micrométastases en même temps. Cependant, celui-ci reste sombre en présence de macrométastases au diagnostic.

Les traitements actuels varient selon le volume de la tumeur, sa résécabilité chirurgicale et la présence de métastases au diagnostic. Globalement, ils reposent sur une polychimiothérapie néoadjuvante associée à un geste chirurgical et suivi d'une polychimiothérapie adjuvante. Au cours des 30 dernières années, de nombreux protocoles se sont succédés pour tenter d'améliorer le taux de survie et diminuer la toxicité, et actuellement, différents protocoles sont en cours d'évaluation à travers le monde. Les tumeurs osseuses primitives, et notamment le SE, sont des tumeurs rares et les essais thérapeutiques nécessitent plus d'une décennie pour obtenir le nombre de malades suffisant pour une interprétation statistique des résultats. Il faut à cela rajouter un suivi prolongé pour déterminer la survie à long terme et la toxicité.

Ainsi, les résultats du protocole européen Euro-Ewing 99 commencent à faire l'objet de publications. Il s'agissait d'un essai multicentrique randomisé international cherchant à évaluer différent protocoles de chimiothérapie de consolidation selon le stade initial de la tumeur (Annexe 1). Dans tous les cas, les patients recevaient une chimiothérapie néoadjuvante comprenant 6 cures de VIDE (vincristine, ifosfamide, doxorubicine, étoposide). Toutes ces molécules agissent sur la division cellulaire et sont utilisées dans les leucémies, les lymphomes hodgkiniens et non

hodgkiniens, dans les sarcomes osseux, dans les cancers du sein, du poumon et autres pour la Vincristine et l’Ifosfamide. La Vincristine est un poison du fuseau mitotique qui empêche la polymérisation des microtubules et donc la division cellulaire, l’Ifosfamide est un agent alkylant qui inhibe la réPLICATION de l’ADN en liant les bases Guanine, la doxorubicine (ou adriamycine) est une anthracycline qui s’intercale dans l’espace entre les paires de bases de l’ADN et inhibe l’action de l’ADN topoisomérase II, empêchant ainsi la réPLICATION de l’ADN, et l’Etoposide (ou VP16) est un inhibiteur de la topoisomérase II. Ces molécules ne ciblent pas spécifiquement la cellule tumorale, ce qui induit de nombreuses toxicités : neuropathie périphérique (Vincristine), encéphalopathie et insuffisance rénale (Ifosfamide), cardiomyopathie (Doxorubicine), immunosuppression (Doxorubicine et Etoposide), cancers secondaires (Etoposide), perte de cheveux (Vincristine et Ifosfamide). Ces toxicités sont d’intensité variable mais peuvent aboutir à de graves séquelles voir entraîner le décès du patient.

Le traitement local était fonction de la localisation, réalisé avant ou après les 6 cures de VIDE, selon la résécabilité. Puis les patients étaient randomisés selon la présentation de la tumeur initiale. Dans un premier bras de randomisation (bras R1), les patients recevaient soit du cyclophosphamide, soit de l’ifosfamide, en association avec la vincristine et l’actinomycine D (VAC vs VAI, 7 cures), pour tester l’équivalence en terme d’efficacité et comparer la toxicité à long terme. Les patients éligibles présentaient une tumeur localisée opérable avec moins de 10% de cellules viables après la chimiothérapie néoadjuvante, une tumeur localisée opérée d’emblée <200ml, une tumeur localisée inopérable <200ml et avec une réponse clinique >50%, une tumeur localisée nécessitant une radiothérapie précoce, <200ml et présentant <10% de cellules viables sur la pièce d’exérèse. Les patients présentant une tumeur localisée n’entrant pas dans les critères ci-dessus étaient inclus dans un autre bras de randomisation (bras R2 Loc), qui cherchait à tester le gain en terme de survie apporté par une chimiothérapie à haute dose comprenant Busulfan et Melphalan + transplantation de moelle autologue comparativement à une chimiothérapie d’entretien conventionnelle

comportant 7 cures de VAI. L'association Busulphan/Melphalan et transplantation de moelle autologue a en effet montré des résultats encourageants dans des études précédentes. Les patients présentant des métastases pulmonaires étaient randomisés dans un autre bras (bras R2 pulm), pour comparer une chimiothérapie d'entretien conventionnelle (8 cures de VAI) associée à une radiothérapie pulmonaire totale externe, à une chimiothérapie à haute dose comportant une cure de VAI associé à une intensification par Busulfan/Melphalan + transplantation de moelle autologue. Les patients présentant un SE multimétastatique (bras R3) étaient inclus dans une étude pilote avec un protocole comportant 1 cure de VAI associé à une consolidation par Busulfan/Melphalan + transplantation de moelle autologue ± radiothérapie ± chirurgie.

Les résultats précoce à 3 ans de suivi comportant 856 patients du bras R1 ont été publiés récemment⁴⁹. Dans cette étude, la survie sans maladie à 3 ans était de 75,4% dans le groupe VAC et de 78,2% dans le groupe VAI, sans que la différence ne soit statistiquement significative, mais avec une toxicité statistiquement moindre dans le groupe VAC. Le suivi des malades se poursuit pour confirmer l'absence d'infériorité du groupe VAC et la diminution de la toxicité à long terme. Les résultats du bras R3 incluant 281 patients à 3,8 ans de suivi ont été publiés en 2010⁵⁰. A 3 ans de suivi, la survie sans maladie était de 27% et la survie de 34%. Des facteurs de mauvais pronostic étaient l'âge > 14 ans, un volume tumoral initial > 200ml, la présence de métastases osseuses et pulmonaires et le nombre de métastases. Ainsi un score pronostic a plus été établi, les patients ayant un score faible présentaient une survie sans maladie à 3 ans de 50%, et seulement de 10% pour les patients avec un score élevé.

Le nouveau protocole Euro-Ewing 2012 a débuté en décembre 2013 et doit se poursuivre jusqu'en 2025. Cette étude comporte une double randomisation et inclus tous les patients porteurs d'un SE à l'exclusion de patients porteurs de métastases extrapulmonaires. Les groupes sont constitués des mêmes critères d'inclusion que le protocole Euro-Ewing 99 pour les bras R1, R2 loc et R2 pulm, mais ne comporte pas de bras R3. La première randomisation est réalisée pour l'ensemble

des patients inclus et cherche à comparer le protocole de chimiothérapie néoadjuvante européen (VIDE toutes les 3 semaines) au protocole américain alternant VDC (vincristine, doxorubicine, cyclophosphamide) et IE (ifosfamide et étoposide) toutes les 2 semaines en néoadjuvant. Dans le groupe R1, les patients ayant reçu le protocole VIDE initialement recevront VAI ou VAC selon l'analyse des effets secondaires, les patients ayant reçu le protocole VDE/IE recevront une alternance IE/VC selon le protocole américain. Les patients du groupe R1 sont randomisés, un groupe recevant de l'acide Zolédonique (ZOL), l'autre non. Les groupes R2 (loc et pulm) sont randomisés selon le protocole EuroEwing 99 (chimiothérapie conventionnelle vs intensification Busulfan/Melphalan).

Malgré des progrès récents, le SE reste une des tumeurs osseuses primitives avec le plus sombre pronostic, avec moins de 60% de survie à 5 ans tous stades confondus. Les tumeurs localisées de petit volume ont un meilleur pronostic d'environ 70%⁵¹⁻⁵³. En cas de métastases, la survie à 5 ans varie de 9 à 41%^{36,38,39,54,55} selon la localisation et le nombre de métastases, les patients présentant des métastases pulmonaires et osseuses concomitantes ayant le plus mauvais pronostic (moins de 10% à 5 ans)^{56,57}. Les métastases osseuses sont de plus associées à une morbidité considérable (fractures pathologiques, compressions médullaires, hypercalcémie et douleurs osseuses) et par conséquent elles détériorent sévèrement la qualité de vie des patients et peuvent même parfois engager leur pronostic vital. Même si le traitement chirurgical a beaucoup progressé avec une optique de conservation de membre, elle aboutit cependant à 15% d'amputation. Les effets secondaires liés à la chimiothérapie décrits plus hauts ne sont pas négligeables non plus, notamment ceux liés à l'Ifosfamide avec un risque à long terme de tubulopathie, fonction de la dose cumulée, ainsi que de cancers secondaires liés principalement à l'Etoposide^{56,58}. Enfin, il n'y a pas de thérapie standardisée en cas de rechute ou de résistance à une première ligne de chimiothérapie.

6. Les nouvelles cibles thérapeutiques (annexe 2)

a. Thérapie anti EWS-ETS :

La protéine de fusion constitue une cible thérapeutique idéale puisqu'elle peut être responsable à elle seule du phénotype tumoral. Bien que de nombreuses molécules soient en cours d'essai, il n'y a pas à ce jour de traitement ciblant la protéine de fusion EWS/ETS.

- Stratégie siRNA^{42,59-64} : l'utilisation d'oligonucléotides ciblant l'ARN d'EWS-FLI1 a montré des effets intéressants sur des cellules in vitro et dans des modèles animaux précliniques. Ils ont le potentiel d'avoir un effet thérapeutique pour maintenir le résidu tumoral à un niveau faible ou pour accentuer les effets d'agents thérapeutiques antitumoraux conventionnels. Cependant, à ce jour, aucune stratégie thérapeutique siRNA antitumorale n'a montré d'effet probant chez l'Homme.
- Perturber l'interaction de la protéine chimérique EWS-FLI1 avec la RNA Hélicase A⁶⁵ : la petite molécule YK-4-279 a montré des résultats prometteurs in-vivo avec des régressions complètes des tumeurs⁶⁶.
- Stratégie de vaccination contre la fusion EWS-FLI1⁶⁷ : dans cette étude de 2002, 16 patients présentant des sarcomes d'Ewing résistants dont le transcrit de fusion était connu ont été vaccinés par stimulation in vitro de dendrocytes exposés au transcrit et réinjection de ces mêmes dendrocytes avec de l'IL2 pour stimuler la réaction immunitaire. Tous les patients ont présenté une progression tumorale après 1 ou 2 cycles de vaccination et aucun n'a présenté de réponse immunitaire.

b. Thérapie Anti IGF1R

L'IGF1R (Insulin Like Growth Factor 1 Receptor) joue un rôle important dans la croissance et le développement des tissus normaux ainsi que dans l'initiation, la survie, la progression et le processus métastatique de nombreux sarcomes dont le sarcome d'Ewing⁶⁸. L'IGF1 et 2 se fixent sur l'IGF1R à la surface cellulaire, ce qui entraîne l'autophosphorylation du récepteur et l'activation de multiples cascades de signalisation intracellulaire, dont la voie Phosphatidyl Inositol 3 Phosphate Kinase(PI3K)/AKT / mammalian Target Of Rapamycin (mTOR), qui, lorsqu'elle est activée de manière anormale, induit le phénotype tumoral. La protéine IGFBP3 (Insulin like Growth Factor Binding Protein 3) se lie aux protéines IGF1 et 2 et inhibe leur activité, et il a été montré que EWS/FLI se lie directement au promoteur du gène IGFBP3 et inhibe son expression⁶⁹. L'activité IGF1R a été prouvée dans le sarcome d'Ewing⁷⁰ et des études précliniques inhibant l'IGF1R ont montré un effet sur la prolifération cellulaire *in vitro* et sur le développement tumoral *in vivo*⁷¹. Suite à des résultats initiaux prometteurs, de nombreux essais thérapeutiques de phase I et II ont été développés et sont en cours. Différentes stratégies sont utilisées :

- Stratégie anticorps (Cixutumumab⁷², Dalotuzumab⁷³, BIIB022⁷⁴, AVE-1642⁷⁵,...): il s'agit d'anticorps monoclonaux humanisés anti-IGF1R. Les résultats des études de phase I et II ont montré une réponse dans 8 à 15% des cas au mieux, chez des patients porteurs de sarcome d'Ewing en échec thérapeutique⁷⁶⁻⁷⁸.
- Stratégie petites molécules (OSI-906^{74,79}, XL-228^{74,80}, INSM-18⁶⁸, BMS-554417⁸¹, GSK-19045297⁸², GSK-1838705⁸³): il s'agit de petites molécules qui se fixent à l'IGF1R et inhibent sa fonction. Des effets inhibiteurs sur la prolifération cellulaire ont été observés *in vitro*, mais aucune étude clinique n'a encore été publiée dans le sarcome d'Ewing.

Après 20 ans de recherche dans l'inhibition de la voie IGF1R dans le sarcome d'Ewing, les résultats des études cliniques se sont avérés décevants, probablement lié à une sélection de patients ayant une pathologie très avancée. Cependant, certains patients ont présenté une réponse marquée, et il semble qu'un sous groupe de patients exprimant un taux élevé d'IGF1R pourraient bénéficier de cette thérapie. En effet, une étude récente démontre l'expression de l'IGF1R dans les cellules de sarcome d'Ewing, mais cette expression est faible dans la plupart des cas⁸⁴.

c. Autres voies

- CD99 : il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire de 32 kDa impliquée dans la costimulation des récepteurs des lymphocytes T, ainsi que dans divers processus cellulaires tels que l'adhésion et la migration^{85,86}, l'apoptose^{87,88} et le transport de molécules de surface^{89,90}. Elle est très exprimée dans le SE et utilisée comme marqueur diagnostic⁹¹⁻⁹³. La protéine EWS-FLI1 serait responsable de l'activation transcriptionnelle de CD99⁹⁴, mais aussi de l'hyperexpression du microRNA miR-30a-5p, ce dernier étant un modulateur post-transcriptionnel de CD99⁹⁵. Le CD99 inhibe la différentiation neuronale et contribue à l'oncogenèse dans les cellules de sarcome d'Ewing⁹⁴. Son inhibition par des anticorps monoclonaux entraîne une apoptose indépendante des caspases *in vitro*⁹⁶, potentialise l'effet de la doxorubicine et de la vincristine et inhibe la croissance tumorale *in vivo*⁹⁷. Il n'y a pas de résultats d'essais cliniques ciblant le CD99 dans le sarcome d'Ewing publié à ce jour.

- La voie p53 : dans les cellules de sarcome d'Ewing, l'inhibition de EWS/FLI1 entraîne une augmentation de l'activité p53^{98,99}. EWS/FLI1 inhibe p53 par un mécanisme post-translationnel, soit par un mécanisme indirect (Notch)⁹⁸, soit en formant un complexe protéique EWS/FLI1-p53 par la partie EWS⁹⁹ (directement ou à l'aide d'autres protéines). P53 est actif et non muté dans la plupart des SE. La Nutlin3a et le MI219 sont de petites

molécules qui antagonisent l'interaction p53-MDM2 en bloquant la poche p53 de MDM2. Elles entraînent ainsi une stabilisation et une augmentation de p53¹⁰⁰. La molécule MI219 a une haute sélectivité, est moins毒ique et a des propriétés intéressantes. Elle est en cours d'essais cliniques actuellement. D'autres molécules tels que les Tenovins (activateur de p53 qui augmente l'acétylation de p53) ou l'actinomycine D (qui mime la Nutlin3a à certaines doses) sont en cours d'essai clinique dans différentes pathologies et pourraient faire l'objet d'études cliniques spécifiques dans le sarcome d'Ewing¹⁰¹⁻¹⁰³.

- Inhibition de la voie mTOR (mammalian target of rapamycine) : il s'agit d'une séroïne/thréonine protéine kinase qui régule la croissance, la prolifération, la mobilité la survie cellulaire, la synthèse protéique et la transcription. La voie mTOR est activée par plusieurs voies en amont dont l'IGF1 et 2. Cette voie est suractivée dans de nombreuses pathologies cancéreuses dont le sarcome d'Ewing¹⁰⁴. Plusieurs molécules inhibant la voie mTOR sont connues (Rapamycine, Everolimus, Temserolimus, Ridaforolimus) et sont en cours d'essais thérapeutiques dans des pathologies tumorales¹⁰⁵. Pour l'instant, ces inhibiteurs inhibent le complexe mTORC1 mais ils n'ont aucun effet sur le complexe mTORC2. Des molécules sont en cours de développement pour inhiber également mTORC2¹⁰⁶.
- D'autres molécules actives spécifiquement dans le SE (Mithramycine¹⁰⁷, Midostaurine¹⁰⁸), ou dans des voies activées dans le sarcome d'Ewing (VEGF¹⁰⁹, inhibiteur multikinase tel que le Pazopanib, ou des inhibiteurs de la voie PI3K/AKT) ont été identifiées ou développées. Certaines de ces molécules ont montré un effet dans des études cliniques sur certains types de sarcome, d'autres uniquement *in vitro* sur des lignées de SE, et elles mériteraient des études cliniques plus spécifiques sur des patients porteurs de SE¹⁰⁶.

III - L'acide Zolédonique

C'est dans l'optique d'améliorer la survie et de diminuer les effets secondaires des chimiothérapies que de nouveaux agents thérapeutiques adjoints sont recherchés. L'inhibition de la résorption osseuse est une nouvelle voie thérapeutique qui rompt le cercle vicieux entre prolifération tumorale et ostéolyse, conduisant ainsi à l'inhibition du développement tumoral en site osseux. Nous avons vu que la seule cellule capable de dégrader l'os est l'ostéoclaste et donc les stratégies d'inhibition de la résorption osseuse ont toutes pour cible l'ostéoclaste. Deux stratégies ont été développées pour inhiber la résorption osseuse : 1) l'inhibition directe de la fonction ostéoclastique par les bisphosphonates (BP) et 2) l'inhibition de la régulation de la fonction ostéoclastique par inhibition du RANKL. Les BP sont déjà utilisés dans de nombreuses pathologies tumorales et non tumorales, et à l'instar des effets observés dans l'ostéosarcome¹¹⁰, nous nous sommes intéressés au BP le plus efficace en pathologie tumorale : l'acide Zolédonique (ZOL).

1. Effets cellulaires des bisphosphonates

Les BP constituent la classe d'agents anti-résorption osseuse la plus efficace et la plus utilisée pour traiter les troubles du métabolisme phosphocalcique associés au développement tumoral (hypercalcémie maligne), la maladie de Paget et l'ostéoporose¹¹¹. Ce sont des analogues du pyrophosphate dans lesquels l'atome d'hydrogène reliant les atomes de phosphore est remplacé par un atome de carbone (liaison P-C-P : phosphore-carbone-phosphore, figure 17), ce qui les rend totalement résistants aux systèmes enzymatiques présents dans les ostéoclastes.

Pyrophosphoric acid		Bisphosphonic acid	
Bisphosphonate	Chaîne R1	Chaîne R2	
Etidronate*	OH	CH ₃	
Clodronate*	Cl	Cl	
Pamidronate*	OH	CH ₂ CH ₂ NH ₂	
Alendronate*	OH	(CH ₂) ₃ NH ₂	
Risedronate*	OH	CH ₂ -3-pyridine	
Tiludronate*	H	CH ₂ -S-phenyl-Cl	
Ibandronate*	OH	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃)(pentyl)	
Zoledronate	OH	CH ₂ -imidazole	
YH529	OH	CH ₂ -2-imidazo-pyridinyl	
Incadronate (YM175)	H	N-(cyclo-heptyl)	
Olpadronate	OH	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	
Neridronate	OH	(CH ₂) ₅ NH ₂	
EB-1053	OH	CH ₂ -1-pyrrolidinyl	

Figure 17. Structure des bisphosphonates. Les chaines R1 et R2 déterminent leur activité biologique.

Ils ont une forte affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite et ils se fixent ainsi à la surface minérale des sites de renouvellement osseux en bloquant la croissance et la dissolution de ces cristaux. L'activité biologique du BP peut être modifiée en changeant la structure des 2 chaînes latérales sur l'atome de carbone. La liaison à la matrice minérale dépend de la structure P-C-P et est augmentée en incluant un groupe hydroxyle en R1. La structure et la configuration tridimensionnelle de la chaîne R2 détermine les effets cellulaires des BP et leur efficacité relative pour inhiber la résorption osseuse. Ainsi, chaque BP possède son activité propre, déterminée par sa chaîne latérale

unique. Après des essais cliniques prometteurs avec l’Etidronate, la chaîne R2 a été modifiée et inclut un atome d’azote dans une chaîne alkyl pour la 3^{ème} génération. Ceci a permis de multiplier par 100 l’effet des premiers BP¹¹². Le ZOL est un BP de troisième génération, comprenant un radical hétérocyclique avec deux atomes d’azote et est à ce jour le BP avec la plus forte activité (x10000 par rapport aux premiers BP).

Alors que les premiers BP s’incorporaient dans l’ATP, inhibaient son passage de la mitochondrie vers le cytoplasme induisant l’apoptose, les BP azotés (N-BP) inhibent la voie du mévalonate (figure 18), notamment l’activité de la farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS), enzyme clé pour la production des lipides isopréniques impliqués dans la modification post-translationnelle des protéines et notamment la prénylation¹¹³⁻¹¹⁶. La prénylation est un processus qui consiste à ajouter des chaînes carbonées sur des résidus cystéines appartenant à des motifs caractéristiques de la partie carboxy-terminale de certaines protéines, permettant ainsi leur fixation à la membrane et leur interaction avec d’autres protéines¹¹⁷. Ainsi 2% de l’ensemble des protéines d’une cellule sont prénylées. Les N-BP induisent ainsi une inhibition de la prénylation des petites protéines G (Ras, Rho, Rab) et leur localisation membranaire¹¹⁸, entraîne leur accumulation sous leur forme active et stimule de manière aberrante de nombreuses voies de signalisation essentielles à la physiologie cellulaire¹¹⁹. Ainsi, l’inhibition de la géranylgerylation de la petite protéine G RhoA induit l’inhibition de l’invasion cellulaire¹¹⁹.

De plus, l’inhibition de la FPPS entraîne une accumulation d’isopentenyl pyrophosphate (IPP), le métabolite juste en amont de la FPPS dans la voie du mévalonate. L’accumulation d’IPP dans les cellules entraîne une production d’Appp1 et d’ApppD inhibant le complexe Adenine nucleotide translocase (ANT) mitochondrial et induisant l’apoptose. Ainsi les BP peuvent induire l’apoptose cellulaire par 2 voies différentes, l’inhibition de la prénylation et l’accumulation d’Appp1.

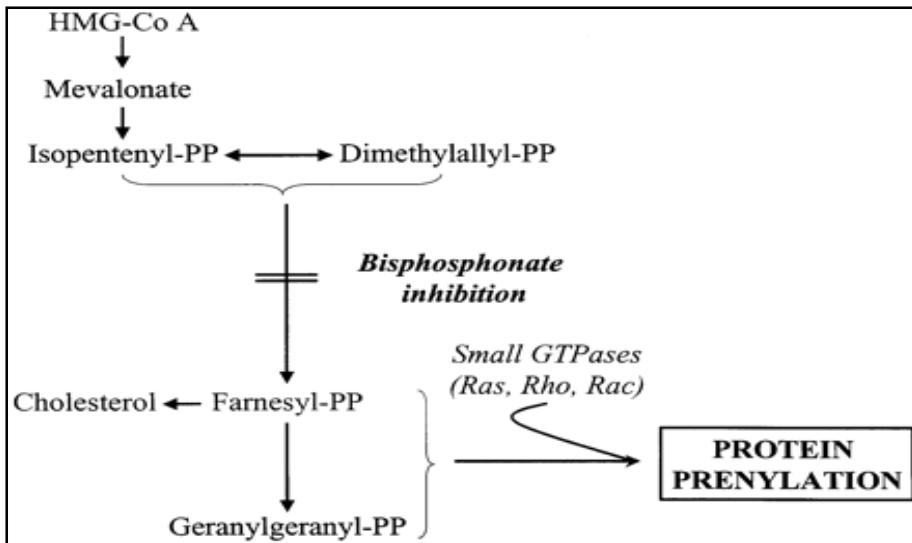


Figure 18. Mécanisme d'action des bisphosphonates azotés, par inhibition de la voie du mévalonate.

2. Effets des bisphosphonates sur la résorption osseuse

Les BP ont une forte affinité pour les cristaux calciques et se fixent à l'os dès leur injection dans le sang. Lors de la résorption osseuse par les ostéoclastes, le pH acide de la lacune de résorption entraîne une dissociation du BP des cristaux calciques. Ils sont ensuite internalisés par l'ostéoclaste par un mécanisme d'endocytose en phase liquide, à une concentration suffisamment élevée ($10^{-5} M$) pour observer les effets cellulaires toxiques décrits ci-dessus. Ceci induit leur mort par apoptose en 15 à 24h¹²⁰, et donc une diminution de la résorption osseuse. Parmi les BP, le ZOL est le plus puissant inhibiteur de la résorption osseuse. Des études précliniques ont montré que le ZOL est de 100 à 850 fois supérieur au Pamidronate pour inhiber l'ostéolyse, avec un effet obtenu pour des doses de $0.002 \mu M$ in vitro¹¹². De plus, il a été observé un effet inhibiteur des BP sur la production de RANKL et une augmentation de la production d'OPG par les ostéoblastes, entraînant une inhibition de la différenciation et de l'activation des ostéoclastes¹²¹⁻¹²³.

Il a également été démontré que les BP ont un effet protecteur sur les ostéoblastes et les ostéocytes¹²⁴. Cet effet est présent pour des concentrations très faibles allant de 10^{-11}M à 10^{-6}M , ce qui est très inférieur aux effets toxiques rencontrés pour les ostéoclastes. En effet, malgré leur forte affinité pour les cristaux calciques, il y a un relargage permanent des BP à partir des cristaux calciques, ce qui entraîne une faible concentration dans le milieu environnant les ostéoblastes et les ostéocytes. Cet effet protecteur est indépendant de l'internalisation des molécules de BP et se fait par ouverture des hémicanaux transmembranaires de la connexine Cx43, ce qui induit un signal de survie intracellulaire par activation de la voie ERK¹²⁵. Le ZOL induit également la différenciation ostéoblastique et l'augmentation de la production osseuse¹²⁶.

Ainsi les BP diminuent la résorption osseuse par inhibition de la différenciation et de l'activation ostéoclastique, par apoptose des ostéoclastes matures et augmentent la production osseuse par différenciation et activation des ostéoblastes et par protection des ostéocytes.

3. Effets des bisphosphonates dans les pathologies tumorales.

a. Effet direct des bisphosphonates sur les cellules tumorales.

La FPPS est une enzyme hautement conservée et ubiquitaire, et il a été montré que le ZOL et d'autres N-BP ont un effet in-vitro direct sur des cellules de cancer du sein¹²⁷, de myélome¹²⁸, de cancer du pancréas¹²⁹, de mélanome¹³⁰, de cancer de la prostate⁸⁹, de neuroblastome¹³¹, de leucémies¹³², de fibrosarcome¹³³, de carcinomes oraux¹³⁴ et autres. Dans l'ostéosarcome, le ZOL inhibe directement la prolifération des cellules tumorales *in vitro* par blocage du cycle à la transition S - G2/M et induction de l'apoptose^{135,136} selon un mécanisme indépendant de p53 ou Rb¹³⁵. Le ZOL exerce donc à la fois un effet indirect sur les cellules tumorales en inhibant la résorption osseuse (via

le cercle vicieux), et un effet direct *in vitro*. Cependant, les doses nécessaires pour trouver un effet inhibiteur dans ces différentes études sont beaucoup plus élevées que celles retrouvées dans l'organisme. Il a néanmoins été observé un effet pro-apoptotique du ZOL sur des cellules tumorales de myélome¹³⁷ *ex-vivo*, et également sur des cellules MDA-MB-436 de cancer du sein dans des modèles animaux en association à une chimiothérapie classique type doxorubicine¹³⁸. Le ZOL peut donc avoir une action synergique en association avec une chimiothérapie classique sur des tumeurs extraosseuses à des doses cliniques. Cet effet synergique est mal compris mais peut résulter d'une déprivation en macrophage associés aux tumeurs CD11b⁺¹³⁹, ou à une augmentation de l'absorption de ZOL par les cellules tumorales suite à l'agression cellulaire induite par la chimiothérapie¹³⁸.

Il a également été observé un effet inhibiteur de certains BP et notamment du ZOL sur l'invasion et la migration cellulaire, bloquant ainsi les premières étapes de la dissémination tumorale métastatique¹⁴⁰.

b. Effets précliniques et cliniques des bisphosphonates dans les pathologies tumorales

Le tissu osseux est un environnement propice au développement de métastases de cancers du sein, de la prostate, de la thyroïde, du rein et du foie entre autres. Ce développement tumoral en milieu osseux entraîne une destruction du tissu osseux en raison du cercle vicieux qui s'instaure entre les cellules tumorales et le tissu osseux, et induit une morbidité osseuse avec douleurs, fractures, compressions médullaires ou nerveuses, nécessité d'interventions chirurgicales, et des hypercalcémies malignes. La réalisation d'études randomisées dans les années 90 et 2000 a permis de montrer le bénéfice clinique de l'utilisation des BP, et surtout la supériorité du ZOL dans les métastases de cancer du sein et de la prostate, dans le myélome et même dans tous types de cancers solides présentant des métastases pour diminuer la morbidité osseuse¹⁴¹⁻¹⁴⁸. Les BP permettent également de diminuer la détérioration du tissu osseux induite par les chimiothérapies et

l'hormonothérapie¹⁴⁹⁻¹⁵¹. De plus, il a été observé une diminution de l'apparition de nouvelles métastases osseuses et viscérales chez des patientes porteuses de cancer du sein avec et sans métastases osseuses, de myélome et d'autre types de cancers¹⁵²⁻¹⁵⁵. Dans le cancer de la prostate l'essai randomisé contrôlé ZEUS, n'a pas trouvé de supériorité du ZOL dans la prévention de l'apparition des métastases osseuses¹⁵⁶.

L'effet du ZOL sur la survie est controversé. L'étude récente (ABCSG-12) a montré que l'association du ZOL à une chimiothérapie classique dans des cancers du sein non métastatiques permettait de diminuer la progression tumorale, d'améliorer la survie et de diminuer l'apparition de cancer du sein controlatéral, suggérant un effet direct du ZOL sur le tissu tumoral en dehors de l'environnement osseux¹⁵⁴. Les résultats récents de l'étude AZURE au contraire n'ont pas montré d'amélioration de la survie dans le groupe ZOL^{157,158}. Une autre étude, rétrospective, n'a pas trouvé d'intérêt d'associer un BP de 3^{ème} génération chez les patientes porteuses d'un cancer du sein non métastatique¹⁵⁹. Il semble que ces résultats discordants soient en rapport avec le statut ménopausique des femmes traitées, et une étude récente (ZO-FAST), sur l'utilisation précoce du ZOL dans le cancer du sein chez des femmes ménopausées en association avec le Letrozol montre une amélioration de la survie sans maladie¹⁶⁰. Enfin, différentes méta analyses sur le cancer du sein n'ont pas trouvé d'effet bénéfique du ZOL sur la survie^{161,162}. Dans le myélome, Morgan et al ont montré une amélioration de la survie en cas d'utilisation du ZOL en première intention en comparaison au clodronate¹⁶³. Dans une étude clinique de phase II sur des patients porteurs de cancers pulmonaires non à petites cellules non résécables, le ZOL n'a pas montré de bénéfice sur la survie¹⁶⁴. Dans le cancer du rein, une étude rétrospective récente a montré que le ZOL était un facteur de bon pronostique sur la survie¹⁶⁵.

Enfin, il a été émis l'hypothèse que le ZOL pouvait prévenir l'apparition de tumeurs malignes. Dans une étude clinique récente, des patientes traitées plus de 3 ans par du ZOL ou de l'Alendronate pour prévention de fractures liées à l'ostéoporose ne présentaient pas de diminution du risque de développer un cancer du sein¹⁶⁶.

Ainsi, cliniquement, le ZOL permet une protection contre la morbidité osseuse tumorale ou induite par les chimiothérapies dans tous les types de tumeurs métastasées à l'os. Dans certains types de tumeur et certains sous groupes de patient, le ZOL permet également une protection contre l'apparition de nouvelles métastases osseuses et viscérales, et une possible amélioration de la survie.

Dans un modèle préclinique murin de carcinome cervical induit par le papillomavirus, le ZOL a permis une inhibition de la progression de lésions prétumorales vers des lésions tumorales et une inhibition de la croissance tumorale de tumeurs établies. Cette étude montre que le ZOL peut avoir un effet direct sur des cellules tumorales extraosseuses. Cette action était médiée par l'inhibition de la production de MMP9 par les macrophages, ainsi que leur activation, induisant une activité antiangiogénique¹⁶⁷.

c. Effets des bisphosphonates dans les tumeurs osseuses primitives

In-vivo, il a été montré un effet anti-résorption osseuse et anti-tumoral du ZOL dans un modèle d'ostéosarcome chez le rat, ainsi que son association bénéfique avec un agent de chimiothérapie conventionnelle, l'Ifosfamide dans la prévention des récidives tumorales¹¹³. De plus, plusieurs études ont montré que le ZOL réduisait significativement l'apparition de métastases pulmonaires dans différents modèles murins d'ostéosarcome^{110,168}. Cependant, une étude récente ne retrouve pas d'effet sur les métastases pulmonaires dans un modèle d'ostéosarcome chez le rat¹⁶⁹. Dans le chondrosarcome, le ZOL entraîne également une inhibition de la croissance tumorale¹⁷⁰.

Dans le sarcome d'Ewing, une seule étude a analysé l'effet du ZOL *in vitro* et *in vivo*. Dans cette étude, une seule lignée a été utilisée, et le ZOL avait un effet inhibiteur *in vitro* sur la prolifération cellulaire et *in vivo* sur l'incidence des tumeurs¹⁷¹.

Au niveau clinique, le ZOL est actuellement en phase d'évaluation clinique dans l'ostéosarcome avec le protocole OS2006 où il est associé en pré- et postopératoire à la polychimiothérapie conventionnelle chez l'enfant et l'adulte (essai clinique de phase 3 randomisé multicentrique). De même, il a été inclus au nouveau protocole EuroEWING2012 de chimiothérapie dans le SE.

d. Autres effets anti-tumoraux indirects des bisphosphonates

L'effet *in-vivo* semble principalement médié par les propriétés antirésorptives dans les métastases osseuses des tumeurs solides. En effet, des essais avec un BP présentant une activité très diminuée sur la résorption osseuse, mais une activité identique sur les cellules tumorales de cancer du sein *in-vitro* n'a pas permis de limiter le développement tumoral osseux et extraosseux dans un modèle murin¹⁷². Cependant d'autres effets des BP ont été étudiés en dehors de leurs propriétés anti résorption osseuse et antimorale :

- Effets sur l'angiogenèse : les BP inhibent l'angiogenèse associée aux tumeurs en bloquant le recrutement de précurseurs myéloïdes de cellules endothéliales au niveau de la moelle osseuse au site de la tumeur^{140,173}, mais également leur différenciation¹⁷⁴. Il a également été observé une réduction significative de la concentration circulante de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) chez des patientes porteuses de métastases osseuses traitées par du ZOL^{175,176}. Dans une étude clinique chez des patients atteints de tumeurs solides avec métastases osseuses, l'injection de 1mg/semaine de ZOL a permis de rapidement diminuer, et cela de manière durable, la concentration circulante en VEGF¹⁷⁷.

- Effets immunitaires : l'IPP est un ligand pour les lymphocytes T Vγ9Vδ2, qui sont des lymphocytes T γδ ne nécessitant pas un complexe majeur d'histocompatibilité pour reconnaître un antigène. Ils peuvent ainsi reconnaître des métabolites phosphorylés de la

voie du mévalonate tels que l'IPP. Leur activation entraîne une libération de TNF α et initie une réponse pro-inflammatoire. Lors du passage systémique du ZOL, une petite fraction de celui-ci est absorbée dans les monocytes et dendrocytes circulant induisant la production d'IPP et déclenchant une activation systémique des lymphocytes T V γ 9V δ 2 circulants, responsables des réactions aigues aux injections de BP avec fièvre et syndrome grippal¹⁷⁸. De même, les cellules tumorales exposées au ZOL produisent plus d'IPP et sont donc activatrices des lymphocytes T V γ 9V δ 2, induisant une réponse antitumorale *in vitro*¹⁷⁹. Des études précliniques ont ainsi montré l'intérêt sur la survie de l'utilisation de lymphocytes T V γ 9V δ 2 et d'Alendronate dans des modèles murins de carcinomes pancréatiques et de mélanome¹⁷⁹. Cependant, une étude récente observe une accumulation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 dans la circulation en raison de l'accumulation d'IPP dans les monocytes, empêchant leur extravasation dans le tissu tumoral¹⁸⁰. De plus, ces mêmes monocytes deviennent la cible des lymphocytes T V γ 9V δ 2, induisant une diminution de la production de chimiokines telles que CCR5 et CXCR3, ce qui compromet ainsi une des réponses antitumorales de l'organisme¹⁸⁰.

En conclusion, les BP et notamment le ZOL possèdent des effets directs sur le développement tumoral en induisant une apoptose des cellules tumorales, en inhibant l'invasion, et en ayant un effet synergique avec les chimiothérapies classiques, et des effets indirects en inhibant la résorption osseuse pourvoyeuse de facteurs de croissance, en bloquant l'angiogenèse, en stimulant la réponse immunologique antitumorale. Cependant, il est difficile de déterminer la part que prend chacun de ces mécanismes dans l'effet global observé *in-vivo*. Dans des études comparant différent BP, le ZOL est toujours le plus puissant pour inhiber l'ostéolyse mais aussi pour induire l'apoptose des cellules tumorales.

IV - Objectifs de l'étude

Le but de cette étude est d'évaluer l'intérêt de l'association du ZOL aux chimiothérapies conventionnelles dans le traitement du sarcome d'Ewing (SE) *in-vitro* et *in-vivo*. La limite actuelle dans le traitement du SE est le mauvais pronostic lié aux métastases et aux récidives. La réponse à la chimiothérapie initiale est aussi un élément important du pronostic mais celui-ci est resté inchangé depuis l'introduction de la chimiothérapie dans les années 70, malgré différents protocoles cliniques évaluant différentes doses et différentes séquences. L'intérêt du ZOL est d'être une molécule à activité anti-résorption osseuse mais aussi anti-tumorale. Il permet de briser le cercle vicieux à deux niveaux, intervenant dans d'autres voies métaboliques que les chimiothérapies déjà utilisées et permettant peut être ainsi de contourner les résistances aux chimiothérapies classiques.

Dans la première partie, nous évaluerons l'effet du ZOL sur le développement tumoral du SE *in-vitro* et *in-vivo*. Il a été démontré dans d'autres études citées ci-dessus que le ZOL pouvait avoir un effet directement sur les cellules tumorales exposées et nous souhaitions déterminer s'il possède également des propriétés antitumorales directes sur les cellules de SE *in-vitro* avant de le tester *in-vivo*. Nous disposons pour cette étude de 7 lignées cellulaires humaines de SE sur lesquelles nous avons évalué l'effet du ZOL sur la prolifération. Nous étudierons ensuite le mécanisme d'action du ZOL dans ces lignées par analyse de l'apoptose et du cycle cellulaire. Des mécanismes de résistance ayant été décrit pour d'autres lignées tumorales, nous analyserons la possibilité d'une résistance naturelle de certaines lignées de SE au ZOL. Pour cela, nous connaissons certaines caractéristiques moléculaires de ces lignées que nous pourrons alors corrélérer à la sensibilité des lignées aux ZOL. Nous rechercherons également une corrélation entre l'expression de la FPPS et cette résistance.

Dans un second temps (partie 1), nous évaluerons l'intérêt *in-vivo* du ZOL seul et en association avec la chimiothérapie dans le SE dans différents modèles animaux de SE. Comme il n'existe pas d'équivalent animal décrit de SE, nous avons développé des modèles par injection intramusculaire ou intra-osseuse de cellules de SE humaines dans la patte arrière de souris Nude immunodéprimées. Nous évaluerons l'efficacité de différents protocoles de traitement, associant ou non un agent de chimiothérapie standard. Cette évaluation portera sur la mesure du volume tumoral, l'analyse de l'ostéolyse tumorale par radiographie et l'analyse de la survie des souris. Nous rechercherons ensuite les mécanismes d'action *in-vivo* du ZOL (direct ou indirect) dans ces modèles en modulant les doses de ZOL et la sensibilité des lignées étudiées. Enfin, nous étudierons le développement précoce du SE dans le modèle intra-osseux et l'effet du ZOL durant cette phase initiale.

Dans un troisième temps (partie 2), nous étudierons l'effet du ZOL sur le processus métastatique pulmonaire dans le SE. Les différentes études citées ci-dessus sont contradictoires, mais dans une autre tumeur osseuse primitive, l'ostéosarcome, le ZOL inhibe le développement de métastases pulmonaires. Comme la plupart des lignées tumorales sensibles au ZOL ont une inhibition de leur propriétés invasives *in-vitro*, nous déterminerons d'abord l'effet du ZOL sur les capacités d'invasion des cellules de SE *in-vitro*. Puis nous évaluerons l'effet du ZOL sur des métastases pulmonaires installées, et sur la prévention des métastases pulmonaires dans le modèle à développement intra-osseux décrit ci-dessus.

Partie I

**Effets de l'acide Zolédonique sur le
développement du sarcome d'Ewing**

I- Introduction

Dans les tumeurs osseuses primitives, il existe un cercle vicieux entre l'ostéolyse et le développement tumoral (figure 12). Nous avons vu que le ZOL possède des propriétés anti-résorption osseuse mais aussi des propriétés anti-tumorales directes et peut donc agir à 2 niveaux de ce cercle vicieux. Il est déjà utilisé dans plusieurs pathologies tumorales pour lutter contre la morbidité métastatique osseuse. Dans l'ostéosarcome, autre tumeur osseuse primitive, le ZOL a un effet direct *in-vitro* sur les lignées cellulaires d'ostéosarcome et il inhibe la croissance tumorale dans des modèles *in-vivo*¹¹⁰. Le protocole OS2006 de traitement de l'ostéosarcome inclut le ZOL dans l'arsenal thérapeutique en néoadjuvant, dès le premier cycle de chimiothérapie dans certains groupes.

Dans cette première partie de l'étude, nous avons voulu savoir si le ZOL avait un effet direct sur les cellules de SE comme décrit dans les autres lignées cellulaires tumorales. Pour cela, nous avons cultivé 7 lignées cellulaires de SE différentes, pour lesquelles nous avions des données moléculaires (gènes impliqués dans la translocation, statuts p53, p21...). Ces lignées ont été exposées *in-vitro* au ZOL à des concentrations différentes mais aussi au Mafosfamide, agent de chimiothérapie classique, analogue de l'Ifosfamide, utilisé dans le protocole clinique EuroEWING 99. Un test de viabilité cellulaire était effectué pour quantifier l'effet inhibiteur de ces différentes concentrations. Les différentes lignées ont également été cultivées en présence de ZOL et de Mafosfamide, à la recherche d'un effet potentialisateur. Nous avons analysé les mécanismes d'action du ZOL et du Mafosfamide sur ces cellules en effectuant une coloration au bleu de trypan pour quantifier la proportion de cellules mortes, en analysant l'activité des caspases qui sont des protéines impliquées dans le déclenchement et l'exécution de l'apoptose, et en analysant le cycle cellulaire par FACS.

Nous avons ensuite voulu déterminer l'action du ZOL sur la croissance de SE *in-vivo*. Il a fallu pour cela utiliser et développer des modèles animaux de SE. Nous avons ainsi injecté des cellules de

SE humain chez des souris Nude qui possèdent l'avantage d'être athymiques, de ne pas développer de lymphocytes T et donc de ne pas rejeter la xénogreffe. Ceci permet le développement de SE avec apparition de tumeurs dès J8 et une croissance très rapide. Deux modèles ont été utilisés : un modèle intramusculaire et un modèle intra osseux (figure 19). Le modèle intramusculaire a été utilisé en premier. Il est facile à réaliser et consiste en l'injection des cellules en paratibial dans les pattes arrières des souris. Ceci permet le développement rapide des tumeurs dans le muscle et une invasion secondaire de l'os du tibia adjacent. Nous avons ainsi une ostéolyse tumorale à partir d'une tumeur extraosseuse. Cependant, ce modèle ne correspondait pas aux situations cliniques les plus fréquentes dans lesquelles le sarcome d'Ewing est une tumeur qui se développe avant tout dans l'os. Nous avons alors développé un modèle intraosseux. Un modèle avait déjà été décrit, nécessitant d'aborder l'os et de le forer pour injecter les cellules. Ce modèle était complexe d'utilisation avec un risque d'infection lors de l'abord et de dissémination des cellules en extraosseux, et il a été préféré le développement d'un modèle qui consiste en l'injection percutanée de cellules de SE en intratibial en passant par la plaque de croissance proximale de ce même tibia. Ceci permet le développement d'une tumeur en intra-tibial puis secondairement en intramusculaire. Les souris ont ensuite été traitées par du ZOL seul, de l'Ifosfamide seul, une combinaison de ZOL et d'Ifosfamide et enfin par un agent sans effet (PBS) en tant que groupe contrôle. L'ensemble de ces études *in vitro* et *in-vivo* ont fait l'objet d'une publication (article 1).

Pour prolonger ces travaux et répondre aux questions soulevées par leurs résultats, il a ensuite été effectué une étude des mécanismes de sensibilité au ZOL. En effet, comme rapporté dans la littérature, de nombreux types cellulaires sont sensibles au ZOL, mais cette sensibilité varie d'une lignée cellulaire à l'autre au sein de la même pathologie. Nous avons souhaité étudier différentes causes possibles de cette variation de sensibilité. Ensuite, comme nous l'avons vu, le ZOL peut avoir un effet direct sur les cellules, mais son action principale *in-vivo* est suspectée d'être indirecte par inhibition de la résorption osseuse. Dans le cas du SE, nous avons voulu déterminer le mécanisme

d'action du ZOL *in-vivo*. Enfin, le SE étant une tumeur d'origine osseuse dans la plupart des cas, avec un développement osseux initial, nous avons souhaité déterminer l'action du ZOL sur ces phases précoces du développement intraosseux.

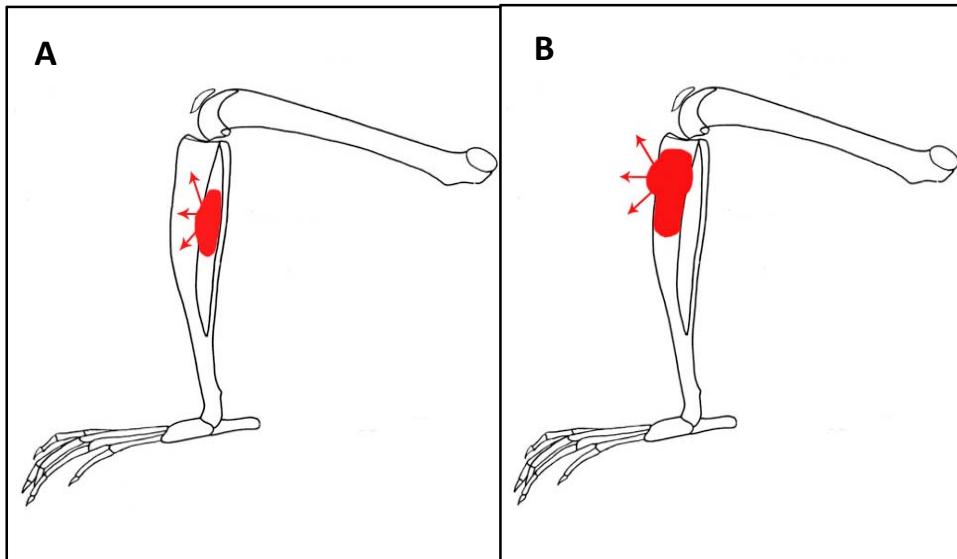


Figure 19. Les deux modèles murins de SE. A : le modèle intramusculaire. B : le modèle intraosseux.

II- Article 1

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

Guillaume A. Odri^{1,2,3}, Sophie Dumoucel^{1,2,4}, Gaëlle Picarda^{1,2}, Séverine Battaglia^{1,2}, François Lamoureux^{1,2}, Nadège Corradini⁴, Julie Rousseau^{1,2}, Franck Tirode⁵, Karine Laud⁵, Olivier Delattre⁵, François Gouin^{1,2,3}, Dominique Heymann^{1,2}, and Françoise Redini^{1,2}

Abstract

Ewing's sarcoma (ES) is the second most frequent pediatric bone tumor also arising in soft tissues (15% of cases). The prognosis of patients with clinically detectable metastases at diagnosis, not responding to therapy or with disease relapse, is still very poor. Among new therapeutic approaches, bisphosphonates represent promising adjuvant molecules to chemotherapy to limit the osteolytic component of bone tumors and to protect from bone metastases. The combined effects of zoledronic acid and mafosfamide were investigated on cell proliferation, viability, apoptosis, and cell cycle distribution of human ES cell lines differing in their p53 and p16/ink4 status. ES models were developed to reproduce both soft tissue and intraosseous tumor development. Mice were treated with 100 µg/kg zoledronic acid (two or four times per week) and/or ifosfamide (30 mg/kg, one to three cycles of three injections). ES cell lines showed different sensitivities to zoledronic acid and mafosfamide at the cell proliferation level, with no correlation with their molecular status. Both drugs induced cell cycle arrest, but in the S or G₂M phase, respectively. *In vivo*, zoledronic acid had no effect on soft tissue tumor progression, although it dramatically inhibited ES development in bone. When combined with ifosfamide, zoledronic acid exerted synergistic effects in the soft tissue model: Its combination with one cycle of ifosfamide resulted in an inhibitory effect similar to three cycles of ifosfamide alone. This very promising result could allow clinicians to diminish the doses of chemotherapy.

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

Introduction

Ewing's sarcoma (ES) is the second most frequent primitive malignant bone tumor in children and adolescents after osteosarcoma. Its frequency is around three cases per million in people under 20 years old, with a peak incidence in the second decade of life (1). Current treatments developed in the Euro-EWING99 protocol consist of neoadjuvant chemotherapy, local surgical resection with limb salvage, followed by adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy. These treatments lead to a 70% overall survival, but it is less than 40% in patients with metastasis and only 15% for bone metas-

tasis. Radiographs show marked osteolysis with periosteal reaction and frequent soft tissue invasion around the primary tumor. ES are included in the primitive neuroectodermal tumors (PNET) sharing a chromosomal translocation involving the *EWS* gene on chromosome 22 with a gene of the erythroblast transformation sequence (ETS) family (2). In 85% of cases, the translocation t(11;22)(q24;q12) occurs leading to the *EWS-FLI1* fusion gene, which behaves as an oncogene.

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

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

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

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

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

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

©2010 American Association for Cancer Research.

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

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

Materials and Methods

Cell lines

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

Cell viability assay

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

Trypan blue counting

Fifteen thousand cells seeded in 24-well plates were treated for 72 hours as above. Cells and culture medium were collected after trypsinization, and trypan blue (Sigma) was

added. The cells in each well were then manually counted to determine the ratio of dead cells to viable cells.

Apoptosis analysis

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

Cell cycle analysis

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

Mouse models of ES

All procedures involving mice [their housing in the Experimental Therapeutic Unit at the Faculty of Medicine of Nantes (France) and care, the method by which they were anesthetized and killed, and all experimental protocols] were conducted in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA.PdL.06). Four-week-old male athymic mice were purchased from Harlan. The soft tissue ES model was induced by an i.m. injection of 2×10^6 ES cells next to the tibia, leading to a rapidly growing tumor in soft tissue with secondary contiguous bone invasion. For the bone model, the same number of cells was injected in the medullar cavity of the tibia, leading to a slow-growing intraosseous tumor that progressively destroyed the cortical bone and invaded the surrounding soft tissues. Mice were anesthetized by inhalation of a combination of isoflurane/air (1.5%, 1 L/min) and buprenorphine (0.05 mg/kg; Temgesic, Schering-Plough). Mice were randomly assigned to treatment groups 1 day after tumor cell injection. The tumor volume was calculated by using the formula $L \times (l^2)/2$, where L and l are the longest and the smallest perpendicular diameter, respectively. The mice died either spontaneously or were killed by CO₂ inhalation when the tumor volume exceeded 6,000 mm³. The tumor-bearing hind limb was dissected and kept in 10% paraformaldehyde for radiography, micro-computed tomography (micro-CT), and histologic analyses.

Dosing regimens and experimental protocols

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

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

Radiographic analysis

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

Micro-CT analysis

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

Bone and tumor histology

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

Statistical analysis

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

were bilateral. R software and Excel software were used for these analyses.

Results

In vitro experiments

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

Cell death—apoptosis. Studies on cell viability were performed using trypan blue on cells treated by zoledronic acid and ifosfamide for 72 hours. Figure 2A shows that the proportion of dead cells increased with increasing zoledronic acid and ifosfamide concentration. To characterize the cell mechanisms involved in this process, apoptosis and cell cycle were analyzed. An increase in caspase-3 activation was observed in cells treated with both drugs but in a lower extent with zoledronic acid than ifosfamide (Fig. 2B). However, the use of the pan-genomic caspase inhibitor Z-VAD-FMK did not abrogate the zoledronic acid–induced inhibition of cell proliferation (Supplementary Data). Cell cycle distribution analyzed by flow cytometry revealed that zoledronic acid treatment increases the proportion of A673 cells in the S phase (34% versus 18% in controls) whereas ifosfamide blocks cells in the G₂M phase (84% versus 33% in untreated cells; Fig. 2C). Therefore, this therapy combination may overcome the potential resistance to either drug.

Experimental *in vivo* protocols

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

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

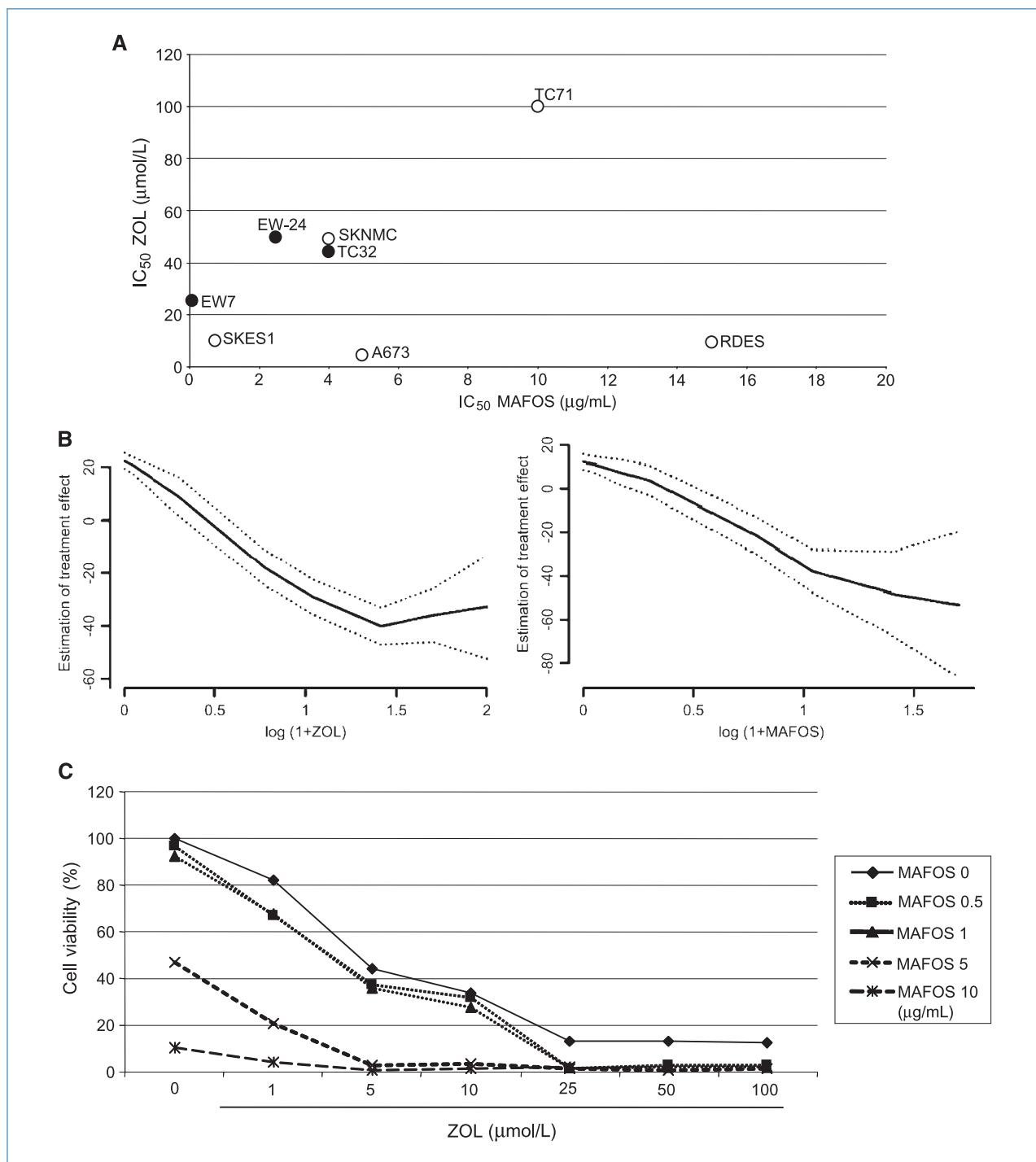


Figure 1. *In vitro* effects of zoledronic acid (ZOL) and/or mafosfamide (MAFOS) on ES cell proliferation. A, ES cell line sensitivity for zoledronic acid and mafosfamide expressed as IC₅₀ values. ●, wild-type or functional p53; ○, mutated p53. B, dose-dependent effects of zoledronic acid or mafosfamide alone on human A673 cell line proliferation for 72 hours, represented as linear regression curves. C, effects of the zoledronic acid and mafosfamide combination on A673 cell proliferation (48 hours).

course of ifosfamide (30 mg/kg beginning at day 10; right). In the first set of experiments, zoledronic acid alone had no effect on tumor development, ifosfamide alone decreased tumor progression by 27% at day 25 compared with control

mice ($P < 0.05$), and the combination of both drugs exerted an effect similar to that of ifosfamide alone (Fig. 3A, left). In the second set of experiments, zoledronic acid and ifosfamide alone had no significant effect on tumor progression,

but the combination reduced the mean tumor volume by 54% at day 25 compared with untreated animals ($P < 0.01$; Fig. 3A, right), a higher extent than three courses of ifosfamide alone (Fig. 3A, left). Taken together, both these experiments show that the combination of zoledronic acid with a single course of ifosfamide exerts a greater inhibitory effect on tumor progression than three courses of ifosfamide alone, suggesting that chemotherapy combined with bisphospho-

nate may allow the reduction of chemotherapy doses. Complementary radiography (Fig. 3B) and micro-CT (Fig. 3C) analyses showed a global reduction of bone mineralization, marked osteolysis with disruption of cortical continuity leading to multiple fractures in untreated mice bearing ES (Fig. 3B and C). The severity of these bone lesions was strongly diminished in zoledronic acid-treated mice (alone or combined with ifosfamide), indicating that zoledronic acid protects bone from tumor-associated osteolysis. Quantitation of specific bone volume [BV/total volume (TV)] confirmed these observations: BV/TV of tibia from zoledronic acid- and zoledronic acid + ifosfamide-treated mice is strongly increased (53.41% and 53.24%) compared with the ifosfamide and untreated groups (33% and 25%, respectively; Fig. 3C), being comparable with normal tibia (52.1%). Histology analysis confirmed the protective effect of zoledronic acid on bone, leading to the prevention of tumor cell invasion in the bone marrow (Fig. 3D). However, it cannot protect against tumor progression in soft tissue; thus, chemotherapy is needed in combination with zoledronic acid in this case.

Zoledronic acid alone prevents ES development in bone.

This model closely reproduces ES development in patients, with a slower tumor growth than that observed in the previous model in soft tissue (42 and 27 days, respectively, to reach a tumor volume of 4,000 mm³). Figure 4A shows that zoledronic acid alone (100 µg/kg, four times a week for 9 weeks) strongly inhibits tumor development as shown by a 97% reduction in mean tumor volume 46 days after tumor cell inoculation. The corresponding radiography analyses showed that zoledronic acid protects bone from tumor cell invasion compared with untreated animals (Fig. 4B). This result was confirmed at the osteoclast level as revealed by TRAP staining (Fig. 4C): Osteoclasts were clearly evident at the tumor site in control animals but were absent in zoledronic acid-treated mice. The direct effect of zoledronic acid on ES cell apoptosis was confirmed *in vivo* by increased TUNEL staining in the tumors from the zoledronic acid-treated group compared with untreated animals (Fig. 4D).

Zoledronic acid combined with ifosfamide prevents tumor relapse in bone.

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

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

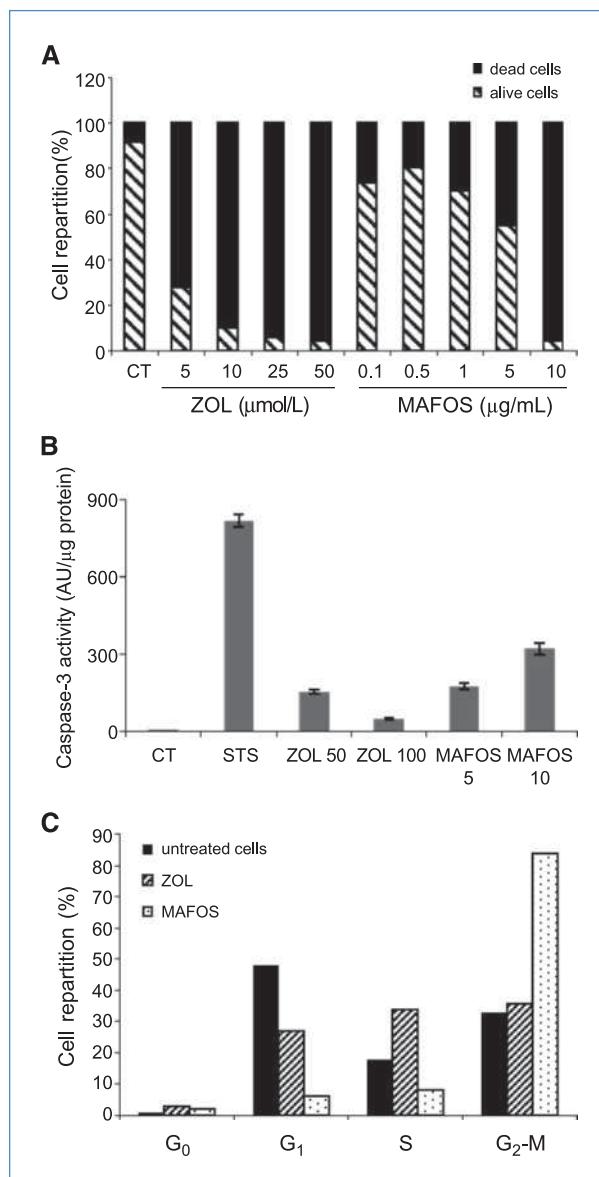


Figure 2. Effects of zoledronic acid or mafosfamide on ES cell death. A, A673 cell viability analyzed by trypan blue staining at 5 to 50 µmol/L (zoledronic acid) or 0.1 to 10 µg/mL (mafosfamide) for 72 hours. B, caspase-3 activity per microgram of protein in A673 cells treated or not with zoledronic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

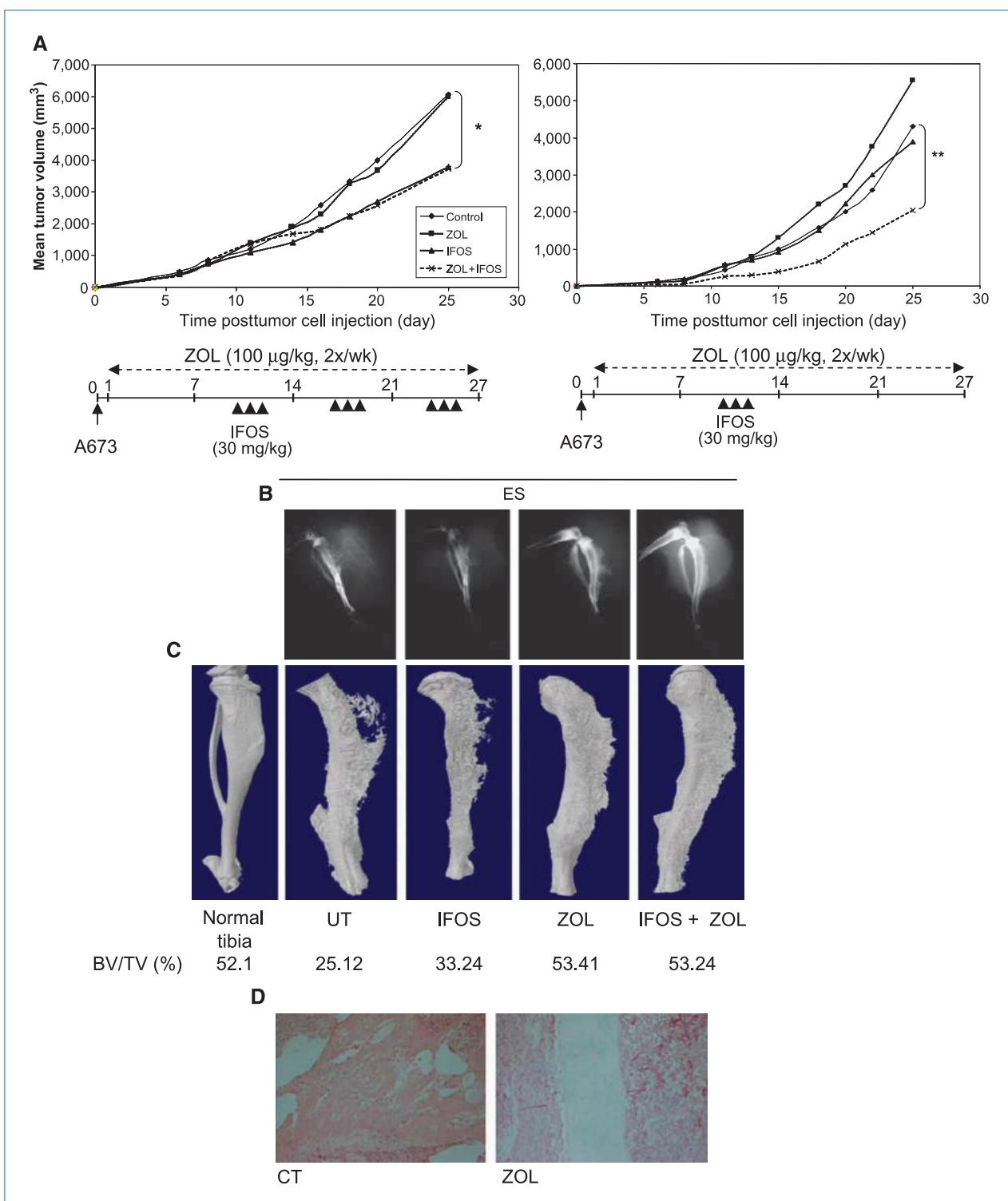


Figure 3. Synergistic effect of zoledronic acid and ifosfamide (IFOS) on the development of ES in soft tissue. A, A673 ES cells (2×10^6) were injected into the tibial muscle of immunodeficient mice. Animals were then divided into four groups (eight mice per group) designed as control, zoledronic acid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

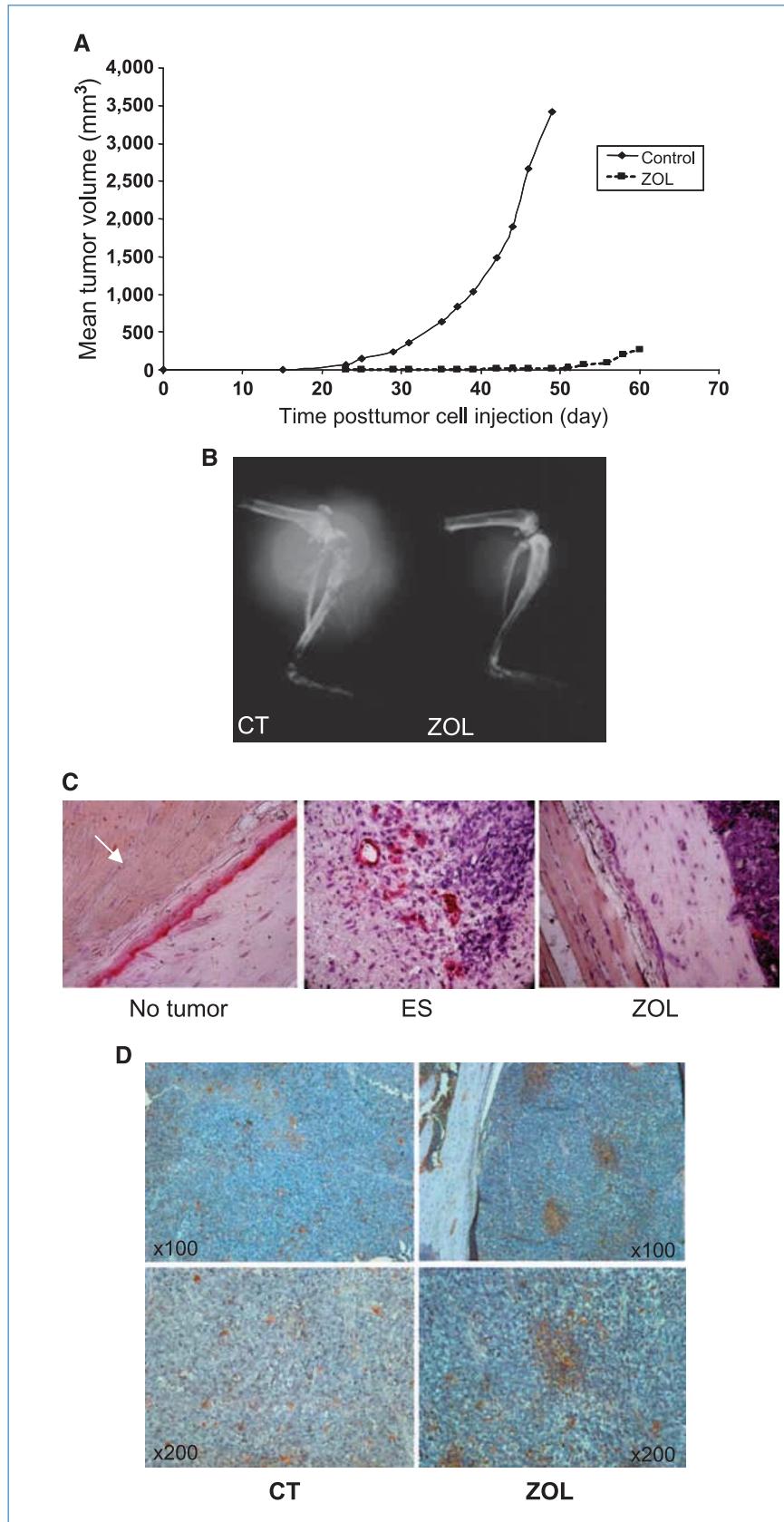
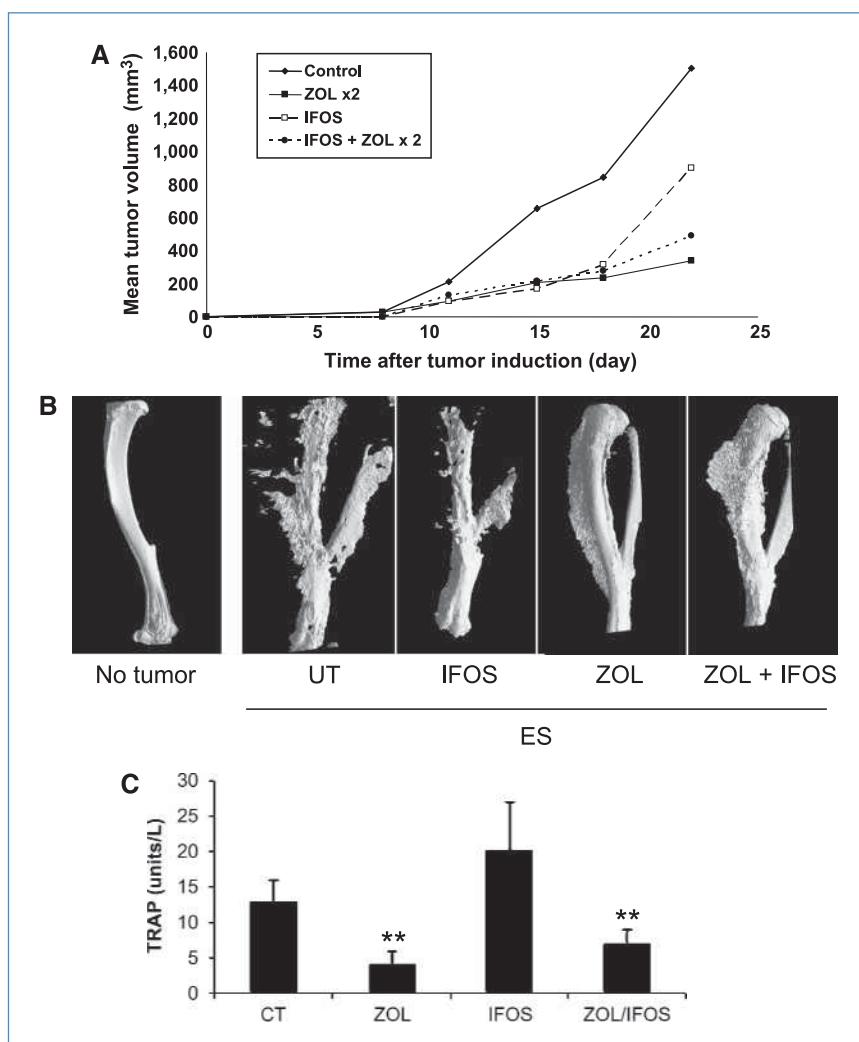


Figure 4. Monotherapy with zoledronic acid prevents ES development in bone. A, A673 ES cells (2×10^6) were injected in the medullar cavity of the tibia of immunodeficient mice. Mean tumor volume of control and zoledronic acid (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, two times per week beginning at day 1 after tumor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

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



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

Discussion

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

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

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

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

We thus wanted to extend these studies by using eight human ES cell lines, all expressing the fusion gene *EWS-FLI1* but differing in their p53 (mutation) and p16/ink4 (homozygous/hemizygous deletion) status. The results presented here, showing that all these ES cell lines were sensitive to zoledronic acid whatever their p53 mutation or p16 deletion status, are encouraging for treating a large cohort of ES patients. The data on ES cell growth inhibition can be compared with others obtained with different bisphosphonates: Sonnemann and colleagues' study showed that 50 μmol/L pamidronate reduced cell number by up to 80% in eight ES cell lines, whereas clodronate had limited effects, reducing cell viability by maximally 40% at 1 mmol/L (28). To investigate the mechanism of action of zoledronic acid in ES, apoptosis and cell cycle analyses were performed. The results showed that zoledronic acid inhibits cell viability by blocking the cell cycle in S-G₂M phase, as previously described for osteosarcoma cells (30). In addition, a low caspase-3 activation was shown in ES cells, more probably reflecting a postmitotic process linked to the cell cycle blockade rather than a caspase-dependent mechanism. Indeed, the use of the pan-genomic caspase inhibitor Z-VAD-FMK had no effect on zoledronic acid-induced of ES cell proliferation.

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

in bone may be explained by the fact that bisphosphonates concentrate in bone due to their high tropism for the calcified bone matrix. The efficacy of zoledronic acid may be therefore potentiated in bone tissue by a dual mechanism: antitumoral and antibone resorption activities. Higher concentrations could be tested in soft tissue models, but would be irrelevant to clinical dosing regimens.

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

Because ES is characterized by marked bone resorption, therapeutics that target osteoclasts such as bisphosphonates are promising. Our study shows, by complementary fundamental and preclinical analyses, that zoledronic acid represents a promising therapeutic agent for ES patients as a first-line therapy in combination with chemotherapy to limit bone lesions and to prevent bone tumor relapse, and also as an adjuvant therapy for the treatment of bone or medullary metastases. This is particularly important in the context of the EuroEWING99 protocol, which is nearing completion, and for the choice of new future strategies, especially for patients at high risk of relapse.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank C. Bailly, C. Le Corre, A. Lefèvre, and M-A. Muller from the Experimental Therapy Unit Platform and P. Pilet from the microscopy platform of the IFR26 (Nantes, France) for their technical assistance; Dr. David Biau (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S 717, Paris, France) for statistical consultation; and Dr. Jonathan Green (Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) for critical review.

Grant Support

Novartis Pharma (Rueil-Malmaison, France), "Fédération Nationale Enfants et Santé", "Société Française de lutte contre les Cancers et les leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent", and "Institut National du Cancer" (grant no. R09018NN).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received 11/25/2009; revised 05/07/2010; accepted 05/25/2010; published OnlineFirst 09/14/2010.

References

1. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, et al. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* 2006;11:503–19.
2. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir G. Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma. *C R Seances Acad Sci III* 1983;296:1101–3.
3. Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone* 1996;19:281–90.
4. Sato M, Grasser W, Endo N, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991;88:2095–105.
5. Verdijk R, Franke HR, Wolbers F, Vermes I. Differential effects of bisphosphonates on breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 2007; 246:308–12.
6. Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Russell RG, Croucher PI. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. *Br J Haematol* 1997;98:665–72.
7. Tassone P, Tagliaferri P, Visconti C, et al. Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells *in vitro*. *Br J Cancer* 2003;88:1971–8.
8. Riebeling C, Forsea AM, Raisova M, Orfanos CE, Geilen CC. The bisphosphonate pamidronate induces apoptosis in human melanoma cells *in vitro*. *Br J Cancer* 2002;87:366–71.
9. Lee MV, Fong EM, Singer FR, Guenette RS. Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61:2602–8.
10. Heymann D, Ory B, Blanchard F, et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 2005;37:74–86.
11. Coleman RE. Risks and benefits of bisphosphonates. *Br J Cancer* 2008;98:1736–40.
12. Roodman GD. The biology of osteoclast activation in cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3562–71.
13. Zhou Z, Guan H, Duan X, Kleinerman ES. Zoledronic acid inhibits primary bone tumor growth in Ewing sarcoma. *Cancer* 2005;104: 1713–20.
14. Daubiné F, Le Gall C, Gasser J, Green J, Clézardin P. Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:322–30.
15. Hastie TJ. Generalized additive models. Chapter 7 of statistical models in S. In: Chambers JM, Hastie TJ, editors. Belmont, California; Wadsworth & Brooks/Cole, 1991.
16. Tse LF, Wong KC, Kumta SM, Huang L, Chow TC, Griffith JF. Bisphosphonates reduce local recurrence in extremity giant cell tumor of bone: a case-control study. *Bone* 2008;42:68–73.
17. Wunder J, Nielsen TO, Maki RG, O'Sullivan B, Alman BA. Opportunities for improving the therapeutic ratio for patients with sarcoma. *Lancet Oncol* 2007;8:513–24.
18. Lau YS, Adamopoulos IE, Sakobari A, Giele H, Gibbons CLMH, Athanasou NA. Cellular and humoral mechanisms of osteoclast formation in Ewing's sarcoma. *Br J Cancer* 2007;96:1716–22.
19. Inoue R, Matsuki NA, Jing G, Kanematsu T, Abe K, Hirata M. The inhibitory effect of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate on the PI3K-Akt-NFkB pathway in osteosarcoma cells. *Br J Pharmacol* 2005;146:633–41.
20. Kubista B, Trieb K, Sevelda F, et al. Anticancer effects of zoledronic acid against human osteosarcoma cells. *J Orthop Res* 2006;24: 1145–62.
21. Kubo T, Shimose S, Matsuo T, et al. Inhibitory effects of a new bisphosphonate, minodronate, on proliferation and invasion of a variety of malignant bone tumor cells. *J Orthop Res* 2006;24:1138–44.
22. Benassi MS, Chiechi A, Ponticelli F, et al. Growth inhibition and sensitization to cisplatin by zoledronic acid in osteosarcoma cells. *Cancer Lett* 2007;250:194–205.
23. Murayama T, Kawasoe Y, Yamashita Y, et al. Efficacy of the third generation bisphosphonate risedronate alone and in combination with anticancer drugs against osteosarcoma cell lines. *Anticancer Res* 2008;28:2147–54.
24. Labridinis A, Hay S, Liapis V, Ponomarev V, Findlay DM, Evdokiou A. Zoledronic acid inhibits both the osteolytic and osteoblastic components of osteosarcoma lesions in a mouse model. *Clin Cancer Res* 2009;15:3451–61.
25. Kubo T, Shimose S, Matsuo T, Sakai A, Achi M. Efficacy of a nitrogen-containing bisphosphonate, minodronate, in conjunction with a p38 mitogen activated protein kinase inhibitor or doxorubicin against malignant bone tumor cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 62:111–6.
26. Anderson P, Kopp L, Anderson N, et al. Novel bone cancer drugs: investigational agents and control paradigms for primary bone sarcomas (Ewing's sarcoma and osteosarcoma). *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17:1703–15.
27. Windsor R, Strauss S, Seddon B, Whelan J. Experimental therapies in Ewing's sarcoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18:143–59.
28. Sonnemann J, Eckervogt V, Truckenbrod B, Boos J, Winkelmann W, van Valen F. The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of Ewing's sarcoma cell growth *in vitro*. *Anticancer Drugs* 2003;14: 767–71.
29. Huang HY, Illei PB, Zhao Z, et al. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol* 2005;23:548–58.
30. Ory B, Blanchard F, Battaglia S, Gouin F, Rédati F, Heymann D. Zoledronic acid activates the DNA S-phase checkpoint and induces osteosarcoma cell death characterized by apoptosis-inducing factor and endonuclease-G translocation independently of p53 and retinoblastoma status. *Mol Pharmacol* 2007;41:333–43.
31. Corey E, Brown LG, Quinn JE, et al. Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:295–306.
32. Croucher PI, De Hendrik R, Perry MJ, et al. Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. *J Bone Min Res* 2003;18:482–92.
33. Michigami T, Hiraga T, Williams PJ, et al. The effect of the bisphosphonate ibandronate on cancer metastasis to visceral organs. *Breast Cancer Res Treat* 2002;75:249–58.
34. Hiraga T, Williams PJ, Ueda A, Tamura D, Yoneda T. Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. *Clin Cancer Res* 2004;10:4559–67.
35. Ottewell PD, Mönkkönen H, Jones M, Lefley DV, Coleman RE, Holen I. Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1167–78.
36. Boudou-Rouquette P, Alexandre J, Soubrane O, Bertagna X, Goldwasser F. Antitumoral effect of the bisphosphonate zoledronic acid against visceral metastases in an adrenocortical cancer patient. *Ann Oncol* 2009;20:1747.
37. Kijima T, Fujii Y, Suyama T, Okubo Y, Yonese J, Fukui I. Lung and bone metastases from renal cell carcinoma responsive to bisphosphonates: a case report. *Int J Urol* 2008;15:546–7.
38. Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, et al. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med* 1998;339:357–63.
39. Clemons MJ, Dranitsaris G, Ooi WS, et al. Phase III trial evaluating the palliative benefit of second-line zoledronic acid in breast cancer patients with either a skeletal-related event or progressive bone metastases despite first-line bisphosphonate therapy. *J Clin Oncol* 2006;24:4895–900.
40. Neville-Webbe HL, Evans CA, Coleman RE, Holen I. Mechanisms of the synergistic interaction between the bisphosphonate zoledronic acid and the chemotherapy agent paclitaxel in breast cancer cells *in vitro*. *Tumour Biol* 2006;27:92–103.
41. Yano S, Zhang H, Hanibuchi M, et al. Combined therapy with a new bisphosphonate, minodronate (YM529), and chemotherapy for multiple organ metastases of small cell lung cancer cells in severe combined immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 2003;9:5380–5.
42. Fan TM, Charney SC, de Lorimier LP, et al. Double-blind placebo-controlled trial of adjuvant pamidronate with palliative radiotherapy and intravenous doxorubicin for canine appendicular osteosarcoma bone pain. *J Vet Intern Med* 2009;23:152–60.

III- Conclusion de l'article 1

Le ZOL possède des propriétés anti-tumorales directes sur les cellules de SE in-vitro. Il induit une inhibition de la prolifération cellulaire avec accumulation des cellules en phase S, et un excès d'apoptose par un mécanisme indépendant des caspases. Cet effet direct est dose dépendant et lignée dépendant. On observe également un effet direct du Mafosfamide sur les cellules de SE in vitro. Cet effet est également dose dépendant et lignée dépendant, par un mécanisme d'apoptose dépendant des caspases. Les caractéristiques moléculaires connues des lignées sont exposées en annexe 3. Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les données moléculaires à notre disposition et la sensibilité des lignées au ZOL. Ceci est en accord avec la littérature, qui ne retrouve pas de liaison au statut p53 notamment¹⁸¹. Nous observons cependant que la plupart des lignées utilisées pour l'étude in-vitro du SE ont un statut p53 muté alors que la plupart des SE cliniques ont p53 non muté et fonctionnel. Il n'est donc pas impossible que nous utilisions des lignées particulièrement résistantes aux différents agents de chimiothérapie, et que l'effet *in-vivo* sur des SE humains avec p53 non muté soit plus important. Nous étudierons la possibilité d'une sensibilité dépendante du taux d'expression de la FPPS dans la suite de cette étude.

In-vivo, nous n'avons pas trouvé d'effet du ZOL seul dans le modèle intramusculaire. Son association à l'Ifosfamide ne permettait pas d'augmenter l'effet sur la croissance du volume tumoral. Cependant, lorsque la dose d'Ifosfamide était diminuée à une fois par semaine, l'association au ZOL deux fois par semaine présentait un meilleur résultat que l'Ifosfamide seul. Dans le modèle intraosseux, on observe un effet inhibiteur très important du ZOL en utilisant une lignée sensible (A673). Dans ce modèle, le ZOL a un effet plus important que l'Ifosfamide seul sur le volume tumoral. Cependant, l'association à l'Ifosfamide ne permet pas d'augmenter l'inhibition induite par le ZOL. Dans les deux modèles, le ZOL a permis d'inhiber l'ostéolyse tumorale et a prévenu la survenue de fractures pathologiques.

IV- Analyse de la sensibilité des lignées cellulaires au ZOL

D'après les résultats exposés ci-dessus, les concentrations qui permettent une inhibition de la prolifération cellulaire de 50% (IC50) sont différentes pour chaque lignée cellulaire, certaines étant plus sensibles que d'autres. Ceci a été décrit dans d'autres études, dans lesquelles différentes lignées cellulaires d'une même pathologie tumorale présentaient une sensibilité différente au ZOL (sein^{182,183}, myélome^{128,184,185}, pancréas¹²⁹, hépatique¹⁸⁶, prostate¹⁸⁷, mélanome¹³⁰, ostéosarcome¹⁸⁸). Dans ces études, la sensibilité au ZOL des différentes lignées varie de 3 à 100µM. Dans notre étude, la lignée la plus sensible est A673 avec une IC50 autour de 5µM, et la lignée la moins sensible est TC71 avec une IC50 autour de 100µM. Il faut noter cependant que même si certaines lignées nécessitent une concentration plus importante de ZOL pour obtenir le même effet, nous obtenons quand même un effet et il ne s'agit donc pas d'une résistance totale avec absence d'inhibition de la prolifération cellulaire. Bien que ces différences de sensibilité entre lignées cellulaires d'une même pathologie aient été notées auparavant, peu d'études ont été faites pour en déterminer l'origine. Dans le myélome, il a été évoqué la possibilité du statut EBV¹⁸⁵.

Une induction de la résistance *in-vivo* a été évoquée pour expliquer les résultats contradictoires entre les effets observés *in-vitro* et *in-vivo*. Après injection dans la circulation, les BP se fixent rapidement à l'os. Il existe ensuite un relargage permanent à partir de l'os à faible concentration, avec une demi-vie dans l'organisme de 12 ans. Dans une étude sur des lignées de myélome multiple, une résistance a pu être induite en 2 mois de traitement *in-vitro* à des doses croissantes d'Alendronate. Cette résistance acquise à l'Alendronate a également induit une résistance croisée au ZOL. L'analyse du mécanisme moléculaire responsable de cette résistance a permis d'impliquer la FFPS dans cette résistance¹⁸⁹. Dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome, la sensibilité au ZOL a pu être modifiée en traitant les lignées avec du ZOL 1µM pendant 12 semaines, sans modifier la sensibilité aux autres agents de chimiothérapie. Cette résistance induite était liée au taux

d'expression de la FPPS intracellulaires et était réversible en transfectant le siRNA de la FPPS¹⁸⁸. Dans une étude sur les mécanismes de résistance acquise dans une lignée de cancer de la prostate, il a été retrouvé une hyperactivation spécifique de la voie p38/MAPK¹⁹⁰.

Nous avons souhaité quantifier le taux d'expression de la FPPS dans ces lignées par QPCR pour corréler ce taux à la sensibilité naturelle de ces lignées au ZOL.

Matériels et méthodes

Pour quantifier le taux d'expression de la FPPS dans les différentes lignées cellulaires, nous avons réalisé une RT-PCR quantitative. Chaque lignée cellulaire a été cultivée dans son milieu adéquat, jusqu'à confluence. L'ARN cellulaire total était isolé en utilisant du TRIzol (Invitrogen, France). La RT PCR était réalisée avec le Kit Invitrogen Thermoscript RT PCR System en utilisant les primers de la FPPS humaine [sense: AGATCTGTGGGGTCTCCT, anti-sense: TCCCGGAATGCTACTACCAC]. La même quantité d'ARN était déposée pour chaque lignée, et la PCR quantitative en temps réel était réalisée à l'aide du kit SYBR Green. Dans chaque échantillon, le niveau d'ARNm était normalisé selon la quantité d'ARNm de la GAPDH. Les résultats sont exprimés en prenant pour valeur étalon le résultat pour la lignée A673. Ainsi, pour chaque lignée, nous avons la comparaison d'ARNm de FPPS par rapport à la quantité d'ARNm de FPPS dans la lignée A673.

Les résultats sont exposés dans la figure 20. Nous n'avons pas trouvé de relation entre ce taux d'expression de la FPPS et la sensibilité au ZOL. Ainsi, dans ces lignées cellulaires, le taux d'expression de FPPS ne semble pas lié à la sensibilité au ZOL.

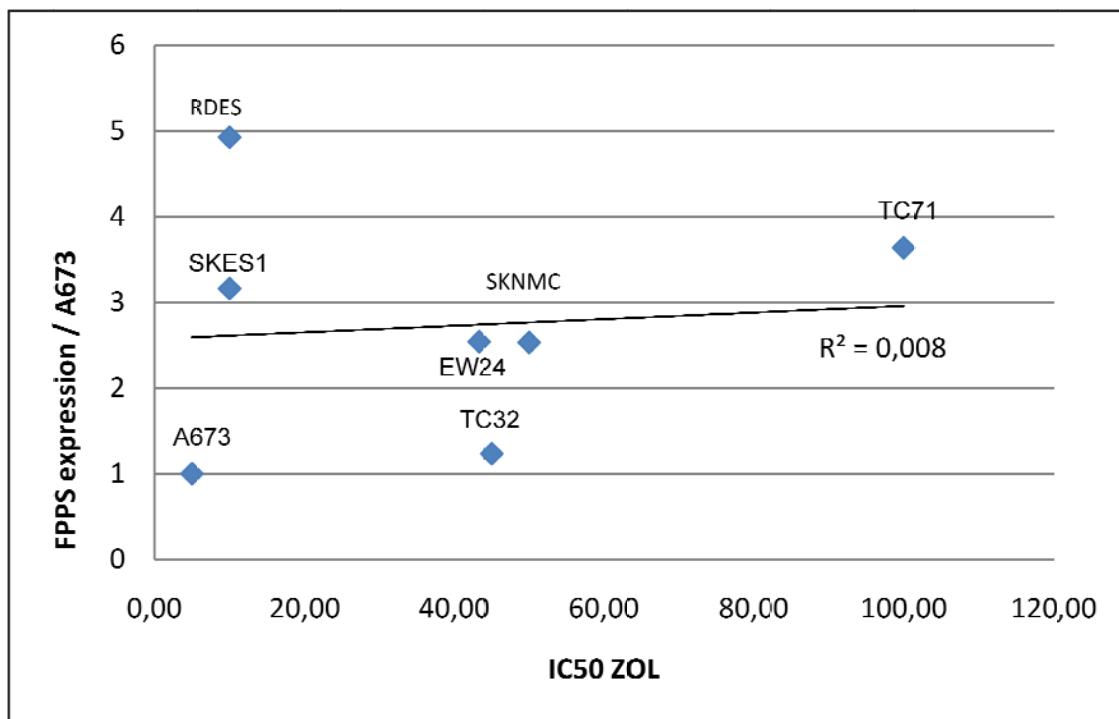


Figure 20. Corrélation entre le taux d'expression de la FPPS et l'IC50 au ZOL. Il n'existe pas de relation entre la sensibilité au ZOL et l'expression relative de la FPPS dans les lignées cellulaires utilisées.

V- Effet du ZOL *in vivo* : direct ou indirect ?

Comme exposé dans l'article 1, le ZOL possède un effet sur le développement tumoral de SE *in-vivo* dans un modèle intraosseux. Cet effet peut être soit direct par action du ZOL sur les cellules tumorales, soit indirect par inhibition de l'ostéolyse. L'analyse du mécanisme d'action exact du ZOL *in-vivo* a été rapporté dans de nombreuses études précliniques et cliniques (revue de l'ensemble de ces travaux par Gnant et Clézardin¹⁹¹), mais il est difficile d'avoir des preuves directes. Les BP étaient initialement utilisés pour inhiber l'ostéolyse et notamment dans le cadre de l'ostéoporose. Ensuite, ils ont été utilisés dans tous types de pathologies présentant une ostéolyse et notamment l'ostéolyse tumorale. Cependant, les preuves précliniques de l'effet direct des BP sur des cellules tumorales ont porté la réflexion sur une possible action directe *in-vivo*, notamment avec le ZOL qui possède l'activité la plus puissante. Nous avons donc également cherché à déterminer le mécanisme d'action *in-vivo* du ZOL dans le SE. Comme nous avions des lignées de sensibilités différentes, nous avons d'abord étudié si ces lignées répondaient également différemment au ZOL *in-vivo*. En effet, si la progression tumorale est inhibée *in-vivo* sur les 2 lignées, une sensible et une résistante, alors l'effet est plus probablement lié à l'inhibition de la résorption osseuse. Si les effets *in-vivo* diffèrent, le ZOL ayant un effet sur la lignée sensible et non sur la lignée résistante, alors la sensibilité de la lignée interfère avec la réponse et donc il s'agit d'un effet direct.

Matériels et méthodes

Le même protocole que décrit dans l'article 1 a été utilisé (1 million de cellules tumorales injectées en intratibial de souris Nude) avec des lignées cellulaires très différentes dans leur sensibilité au ZOL. Ainsi, nous avons utilisé les cellules A673 qui possèdent une IC50 de 5µM et les cellules TC71 qui possèdent une IC50 de 100µM. Les souris étaient ensuite séparées en 2 groupes : un groupe traité par du ZOL 50µg/kg 3 fois par semaine, et un groupe non traité (PBS). Les tumeurs

étaient mesurées et le volume tumoral calculé 2 fois par semaine. Les souris étaient euthanasiées lorsque la tumeur excédait 3000mm³. Les résultats sont reportés dans les figures 21 et 22.

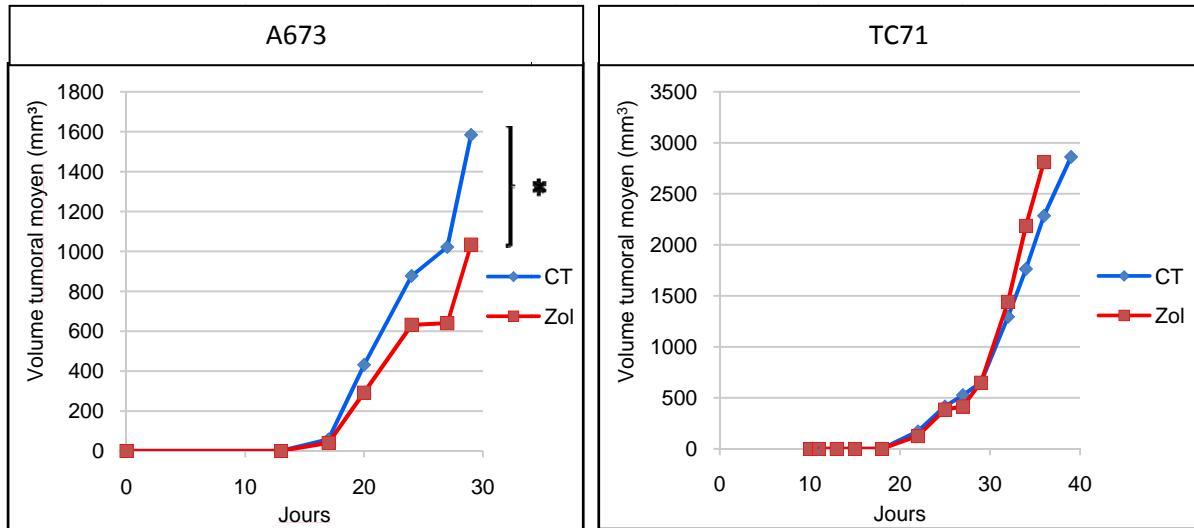


Figure 21. Effet in-vivo du ZOL sur le volume tumoral moyen de SE développés à partir d'une lignée « sensible » (A673), et d'une lignée « résistante » (TC71). On observe un effet significatif dans la lignée sensible (A673), mais pas dans la lignée résistante (TC71).

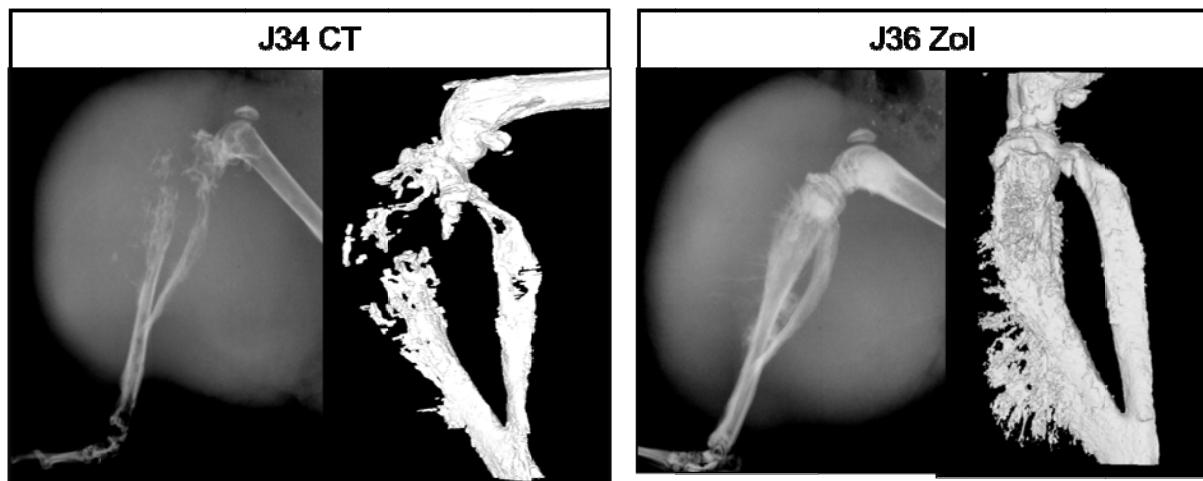


Figure 22. Radiographies et images microscanner 3D chez des souris non traitées et traitées par du ZOL (modèle A673). Le ZOL protège de l'ostéolyse tumorale.

Résultats

Nous voyons qu'il existe une inhibition de la croissance tumorale dans le groupe A673 traité par ZOL, et que l'on n'observe pas cette inhibition pour les tumeurs développées à partir de la lignée « résistante » TC71. Dans les 2 cas cependant, l'os n'est pas dégradé en présence de ZOL et il n'y a pas de fracture (modèle A673 dans la figure 22, images identiques non exposées dans le modèle TC71), le ZOL ayant inhibé l'ostéolyse tumorale. Ainsi, si les cellules tumorales ne sont pas sensibles, il n'y a pas d'effet sur le développement tumoral malgré l'inhibition de l'ostéolyse. Ceci est en faveur d'un effet direct du ZOL *in-vivo*. Nous pouvons de plus en conclure que l'ostéolyse tumorale n'est pas essentielle au développement de la tumeur dans l'os dans ce modèle de SE, et son inhibition par le ZOL ne permet pas l'inhibition du développement de la tumeur.

Si l'effet sur la croissance tumorale se fait par effet direct du ZOL sur les cellules tumorales, alors cet effet peut être lié à la concentration en ZOL dans la circulation. Cependant, nous savons que la concentration circulante du ZOL est faible car celui-ci se fixe rapidement à l'os. Dans différentes études, il a été montré qu'une exposition de faible durée (30 minutes) permettait de déclencher le phénomène apoptotique de cellules tumorales¹²⁹. Ainsi une dose plus forte pourrait avoir un effet plus important sur les cellules tumorales. De même, nous avons pensé que si les doses n'étaient pas plus fortes mais plus fréquentes, ceci permettrait d'obtenir une concentration suffisante plus fréquemment et avoir plus d'effet sur la tumeur.

Matériels et méthodes

Nous avons utilisé le même modèle que décrit précédemment (1 million de cellules injectées en intraosseux). La lignée A673 a été utilisée. Trente souris ont ainsi été réparties en 5 groupes de 6. Un groupe ne recevait pas de traitement. Les autres groupes recevaient des doses de ZOL différentes dans leur posologie et leur fréquence (28.5µg/Kg tous les jours, 100µg/Kg 2 fois par semaine, 200µg/Kg fois par semaine, 200µg/Kg une seule fois). Le but était de rester dans des doses

cliniquement acceptables et transposables pour une utilisation clinique. Les résultats sont exposés dans la figure 23.

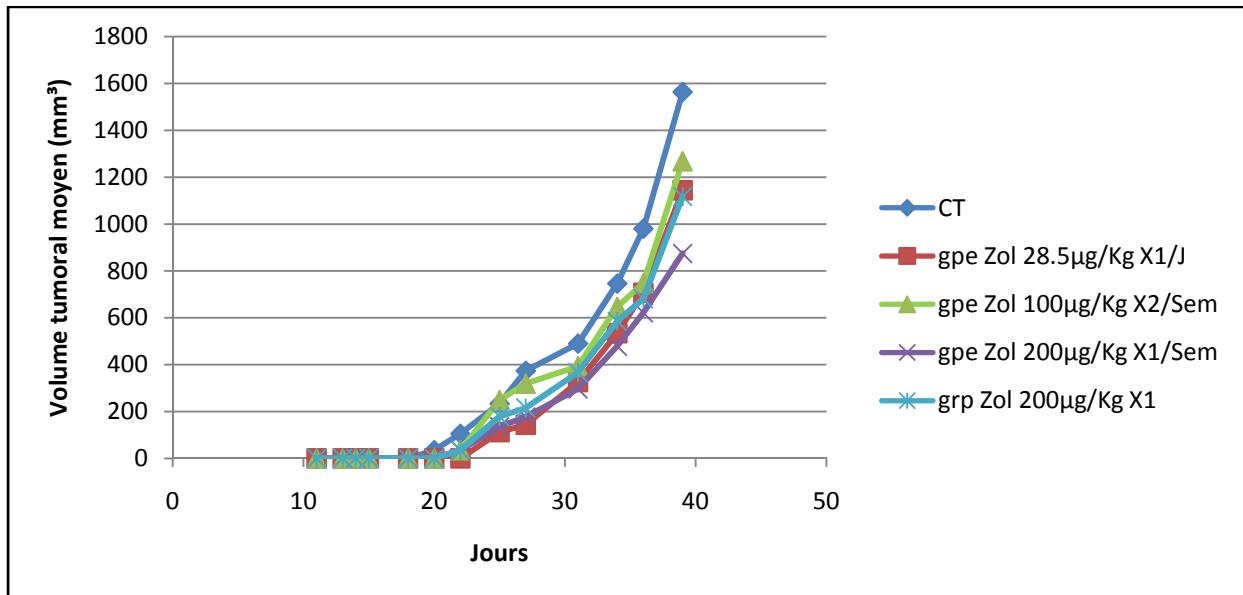


Figure 23. Effet de doses fractionnées ou plus importantes de ZOL sur un modèle intraosseux sensible (Lignée A673). Il n'y a pas d'effet supplémentaire en utilisant des doses fractionnées ou des doses plus importantes. L'administration de doses importantes moins fréquemment semble néanmoins avoir plus d'effet sur la croissance tumorale.

Résultats

Nous observons une diminution du volume moyen dans tous les groupes, bien que la plupart n'atteignent pas la significativité statistique (sauf le groupe ZOL 200µg/Kg 1 fois par semaine). Il n'y a pas de groupe dont l'efficacité est supérieure aux autres, mais la très forte dose répétée semble avoir eu plus d'effet que les autres doses. De même, il ne s'agit pas de dose totale injectée puisque une seule injection de 200µg/kg de ZOL a eu le même effet que les autres groupes où la dose totale était plus élevée. L'effet est donc plutôt lié au pic plasmatique de ZOL, puisque la dose la plus forte

répétée était la plus efficace. Nous n'avons pas trouvé d'amélioration en utilisant des doses fractionnées. Une dose faible et continue ne permet probablement pas d'obtenir une concentration plasmatique suffisamment élevée pour avoir plus d'effet qu'une dose importante à intervalles réguliers.

V- Etude des phases précoces

Lorsque l'on observe la courbe de croissance du volume tumoral moyen de la figure 21 en détaillant la progression du volume tumoral pour chaque souris (figure 23), nous voyons qu'il existe différentes cinétiques de croissance des tumeurs. Dans les 2 groupes (ZOL et CT), certaines souris ne développent pas de tumeur, et ce en même proportion dans les 2 groupes. De même, lors de l'injection des cellules, certaines souris meurent de détresse respiratoire probablement par embolie pulmonaire. Ces souris ont été exclues des analyses car elles ne permettent pas de déterminer l'effet du ZOL sur la progression tumorale. Ensuite nous voyons que certaines souris développent une tumeur très précocement, dès J8. D'autres souris développent des tumeurs plus tardivement mais avec la même cinétique de croissance une fois que la tumeur est mesurable. Ces tumeurs apparaissent vers J15-J18 chez les souris non traitées, plus tardivement dans le groupe ZOL (J18-J25). Enfin, dans le groupe ZOL, il existe des souris qui développent des tumeurs beaucoup plus tardivement (J29-J32) et qui progressent plus lentement, groupe qui n'existe pas dans le groupe contrôle.

Ces courbes représentent des tumeurs qui deviennent mesurables lorsqu'elles sont palpables, c'est-à-dire lorsqu'elles sortent de l'os et envahissent les parties molles environnantes. Tant qu'elles sont intraosseuses strictes, elles ne sont pas mesurables. Comme nous l'avons vu précédemment, le ZOL n'a pas d'effet sur les tumeurs extraosseuses et c'est probablement la raison pour laquelle nous observons la même cinétique de croissance dans les 2 groupes une fois que ces tumeurs deviennent palpables. Ce qui change avec le ZOL, ce n'est pas la cinétique de croissance des tumeurs palpables

extraosseuses, mais c'est le délai d'apparition des tumeurs. Dans l'article de Zhou et al, étudiant également le ZOL dans un modèle intraosseux de SE, seule l'incidence des tumeurs était noté à la 5^{ème} semaine, et il était noté une diminution de cette incidence dans le groupe ZOL¹⁷¹. Lorsque l'on s'intéresse aux situations cliniques, une grande proportion des patients se présentent avec une tumeur qui est encore intraosseuse, sans envahissement des parties molles (figure 25).

Nous avons donc souhaité étudier les phases précoces du développement des SE dans le modèle intraosseux et déterminer pourquoi les souris présentaient des cinétiques de développement tumoral différentes. Nous avons également voulu déterminer l'effet du ZOL sur ces étapes précoces, avant que la tumeur ne devienne extraosseuse et non sensible au ZOL. Pour cela, nous avons réalisé une étude *in-vivo* en injectant des cellules de SE en intra osseux, et en prélevant les pattes des souris ayant reçu l'injection avant l'apparition des tumeurs. Une analyse histologique était ensuite réalisée pour visualiser l'étendue des tumeurs.

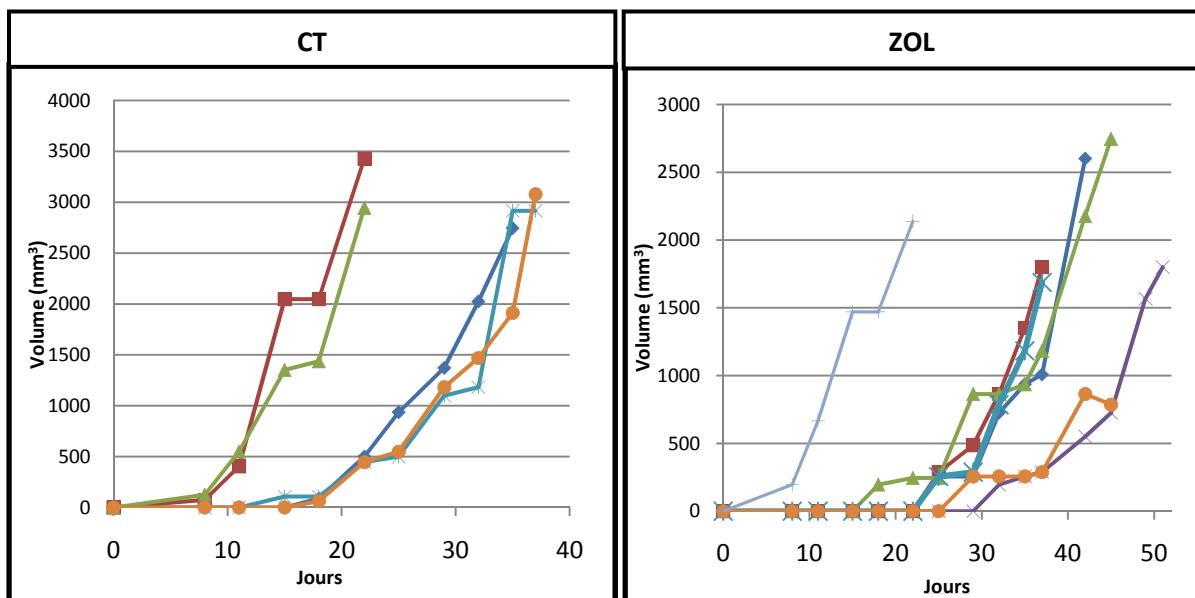


Figure 24. Volume tumoral moyen détaillé pour chaque souris ayant reçus 1 millions de cellules A673 en intraosseux. On observe différente cinétiques de croissance, certaines étant très rapides, d'autres plus lentes.

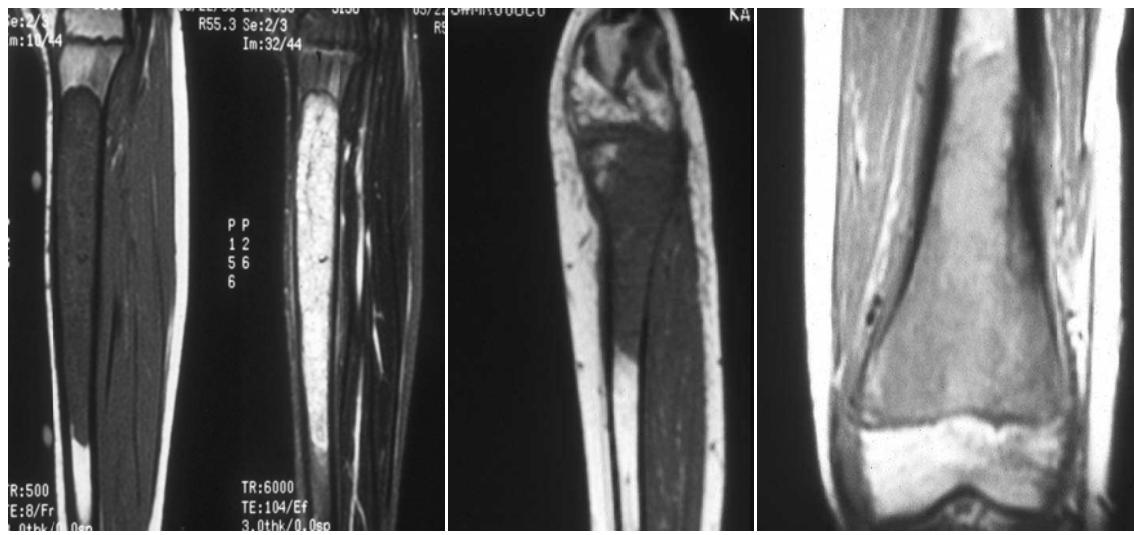


Figure 25. Radiographies de patients porteurs de SE strictement intraosseux, sans envahissement des parties molles.

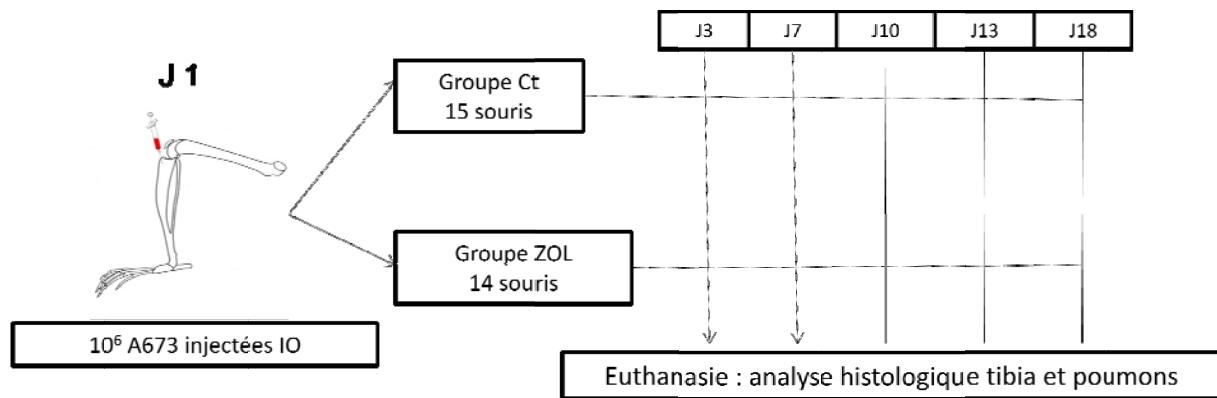


Figure 26. Protocole d'étude des phases précoce du développement tumoral intra-osseux. Les souris étaient euthanasiées à J3, J7, J10, J13 et J18 pour analyse histologique des tibias.

Matériels et méthodes

Un million de cellules A673 ont été injectées dans le tibia de 29 souris Nude. Quatorze souris étaient traitées par du ZOL dès J1, 15 souris n'étaient pas traitées (injections de PBS), selon les mêmes protocoles que ceux décrits précédemment. Ensuite les souris étaient euthanasiées à J3, J7, J10, J13, J18 et leurs pattes arrières avec les cellules injectées étaient prélevées (Figure 26). Elles étaient ensuite fixées dans le formol. Toutes les pattes prélevées étaient décalcifiées pendant 24 heures et incluses en paraffine. Des coupes de 2-4µm étaient réalisées au microtome (Leica RM 2255, Leica microsystème SAS, France). Les coupes étaient ensuite déparaffinées automatiquement (HMS740 automatic : 3 × 5 mn OTTIX PLUS, 3 × 5 mn Ethanol 100°, 1 × 5 mn Ethanol 95°, 1 × 5 min Ethanol 80°, 3 × 5 mn en eau distillée), puis rincées au TBS 1x pH = 7.6 Tween 0.05% à température ambiante. Chaque échantillon était coloré au trichrome de Masson et sur certaines lames d'intérêt était réalisé un immunomarquage avec l'anticorp anti CD99 humain (marquage des cellules d'Ewing).

Trichrome de Masson : cette coloration permet de distinguer le collagène en vert, le cytoplasme des cellules en violet, les hématies en orange et les noyaux cellulaires en noir. Les lames à colorer étaient introduites dans un automate (HMS740 automatic) avec un protocole de coloration pour le trichrome de Masson, comprenant un protocole de déparaffinage décrit ci-dessus, puis un passage de 15mn dans l'Hématoxyline de Groat, suivi d'un rinçage de 5mn en eau distillée, un passage de 5mn dans la Fuchsine de Ponceau suivi de 15secondes dans l'eau acétifiée, puis un passage de 5mn dans l'Orange G suivi de 15s en eau acétifiée, un passage de 5mn dans le Vert lumière suivi de 15s en eau acétifiée, un passage de 2 mn dans l'éthanol à 95%, 2 bains de 2mn dans l'éthanol 100% et un bain de 2mn d'OTTIX plus. Les lames étaient montées et prêtées pour observation.

Immunomarquage au CD99 humain : sur les coupes déparaffinées, les peroxydases endogènes étaient bloquées par de l'H₂O₂ 3% pendant 15 minutes à température ambiante et les sites non spécifiques étaient bloqués par du sérum de chèvre 5%, BSA 1% dilué dans du TBS 1x pH = 7.6 Tween 0.05%. Les échantillons étaient ensuite incubés en présence d'un anticorps primaire anti-CD99 de

souris (dilué à 1 :50) à température ambiante, puis rincé au TBS 1× pH = 7.6 Tween 0.05%. L'anticorps secondaire biotinylé chèvre anti-souris (Dako, E0433) dilué au 1:200 était appliqué pendant 30 minutes à 37°C et rincé au TBS 1× pH= 7.6 Tween 0.05%. Les échantillons étaient ensuite incubés avec de la streptavidine/peroxydase (Dako, P0397) diluée au 1/200 dans du TBS. Le substrat était appliqué 1 à 10 minutes dans l'obscurité et rincé. Les échantillons étaient ensuite contre colorés dans l'HMS740 à l'hématoxyline de Gill. Les lames étaient montées et prêtes pour observation.

Résultats

- Groupe contrôle :

Dans un cas, nous observons des cellules tumorales en extraosseux, en regard du tendon rotulien alors qu'il n'y a pas de cellules tumorales observées en intraosseux à J3 (figures 27C et D). Nous observons également le trajet d'injection qui passe par le tendon rotulien, l'épiphyse, la plaque de croissance et aboutit dans la diaphyse tibiale (figures 27A et B). Il s'agit donc d'un cas d'injection intraosseuse avec contamination des parties molles adjacentes. Ceci induit le développement d'une tumeur extraosseuse avec une cinétique identique à celle du modèle d'injection IM, c'est-à-dire un développement initial rapide, et une absence d'efficacité du ZOL. Il s'agit probablement du phénomène à l'origine des courbes observées dans la figure 24, avec apparition précoce et cinétique de croissance très rapide, identique dans le groupe traité et le groupe contrôle. Dans le groupe traité par ZOL, nous avons trouvé un cas identique avec développement d'une tumeur en extraosseux. Il y a donc un risque d'induire un modèle de type intramusculaire avec ces injections intraosseuses. Environ 1 souris sur 6 présentait cette cinétique dans les différentes expériences et elles étaient retirées de l'analyse. Dans certains cas, il n'y a pas de cellules tumorales visualisées même à J18. Ceci est probablement en rapport avec une mort de toutes les cellules injectées, et explique que certaines souris ne développent pas de tumeurs après injection des cellules pendant toute la durée de l'expérience (souris également retirées de l'analyse dans les différentes expériences).

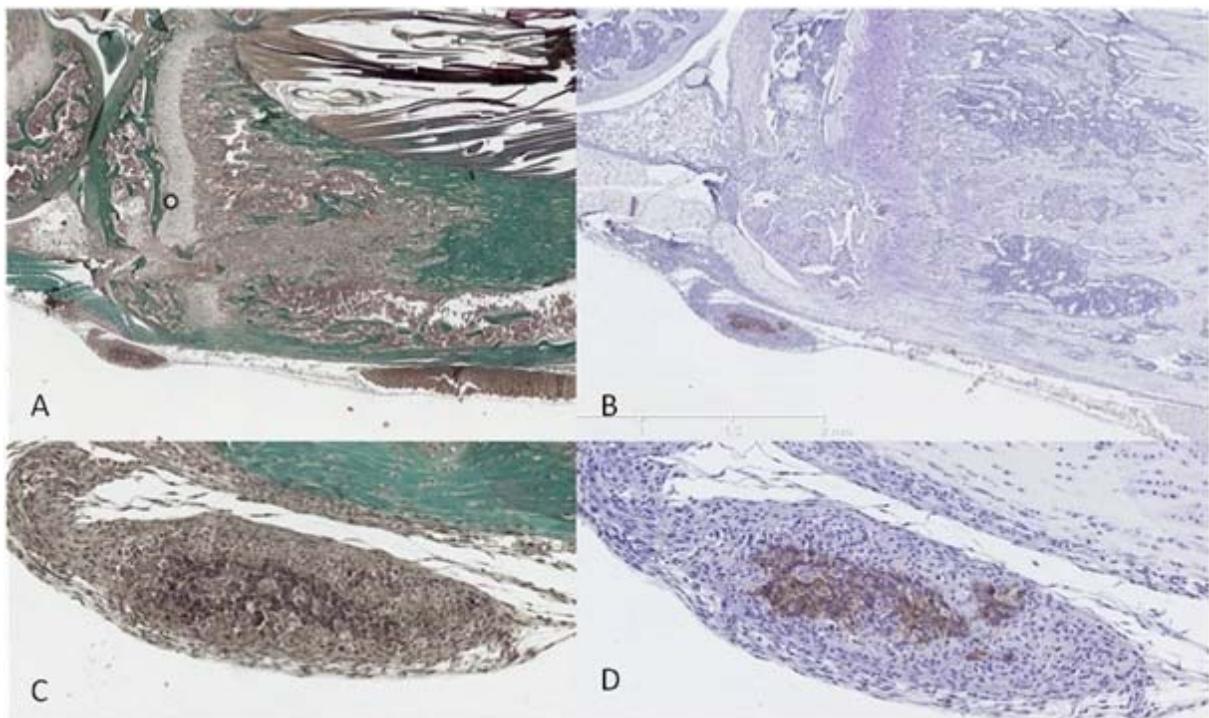


Figure 27. Coupes passant par le trajet d'injection des cellules en IO (A et B). On observe le développement d'une lésion à la base du tendon rotulien en extraosseux (C et D).

A J7, nous observons des cellules tumorales qui se développent et commencent à attaquer l'os cortical de la diaphyse (figures 28A et B) sans atteinte des parties molles initialement. Ensuite apparaît une destruction importante de l'os cortical et issue des cellules tumorales dans les tissus mous environnant autour de J10-J13 (figures 28C, D, E et F). Nous voyons que le développement extraosseux commence par une diffusion des cellules au contact de la surface externe de l'os, en nappe, et à fort grossissement, nous observons que ce développement se fait dans un dédoublement du périoste et que les insertions musculaires sont décollées de l'os. Il y a ensuite effraction du périoste et invasion du tissu musculaire adjacent. A fort grossissement, on observe un développement tumoral dans les espaces entre les fibres musculaires et parfois des fibres musculaires totalement englobées dans la tumeur. Il est difficile de dire si la tumeur induit une lyse directe des cellules musculaires ou si elles détruisent leur apport vasculaire et nerveux induisant leur

mort. Cependant, il est certain qu'il ne s'agit pas juste d'un refoulement du muscle mais bel et bien d'un envahissement et destruction du tissu musculaire. A J18, on observe une destruction complète de la métaphyse allant jusqu'au cartilage de croissance (figures 28G et H). C'est à ce délai que les tumeurs deviennent palpables. Ainsi, les tumeurs deviennent palpables à un stade tardif de la progression tumorale dans l'os. La nécessité de détruire l'os avant de pouvoir se développer dans les tissus mous environnants explique le plus long délai d'apparition des tumeurs dans le modèle intraosseux par rapport au modèle intramusculaire. De plus, la chimiothérapie par Ifosfamide n'était débutée qu'en présence d'une tumeur palpable, donc à un stade évolué de la pathologie, en intraosseux comme en intramusculaire, ce qui peut expliquer l'effet modéré de cette chimiothérapie sur le développement tumoral observé dans ces modèles. Dans tous les cas, les cellules tumorales ne sont jamais en contact direct avec le tissu osseux, et il y a toujours une couche cellulaire non tumorale entre la matrice osseuse et les cellules tumorales. On ne sait pas si les cellules tumorales de sarcome d'Ewing peuvent se fixer directement à l'os et il n'y a pas eu d'étude décrivant cette possibilité dans la littérature. De même il n'y a jamais de développement tumoral dans la plaque de croissance. La lésion se développe dans la cavité médullaire, détruit l'os cortical, envahit la métaphyse mais respecte toujours la plaque de croissance. On observe ce phénomène également sur les clichés radiographiques, sur lesquels la plaque de croissance et l'épiphyse sont toujours respectées. En pathologie humaine, il est très fréquent d'observer une tumeur qui s'arrête au cartilage de croissance quand celui-ci est présent. Dans la littérature, il n'a pas été retrouvé d'analyse histologique étudiant ce phénomène. Ceci est probablement l'effet combiné de l'absence de vaisseaux sanguins dans la plaque de croissance et l'impossibilité des cellules tumorales à produire des facteurs stimulant la dégradation de la trame protéique cartilagineuse ou à dégrader elles-mêmes cette matrice.

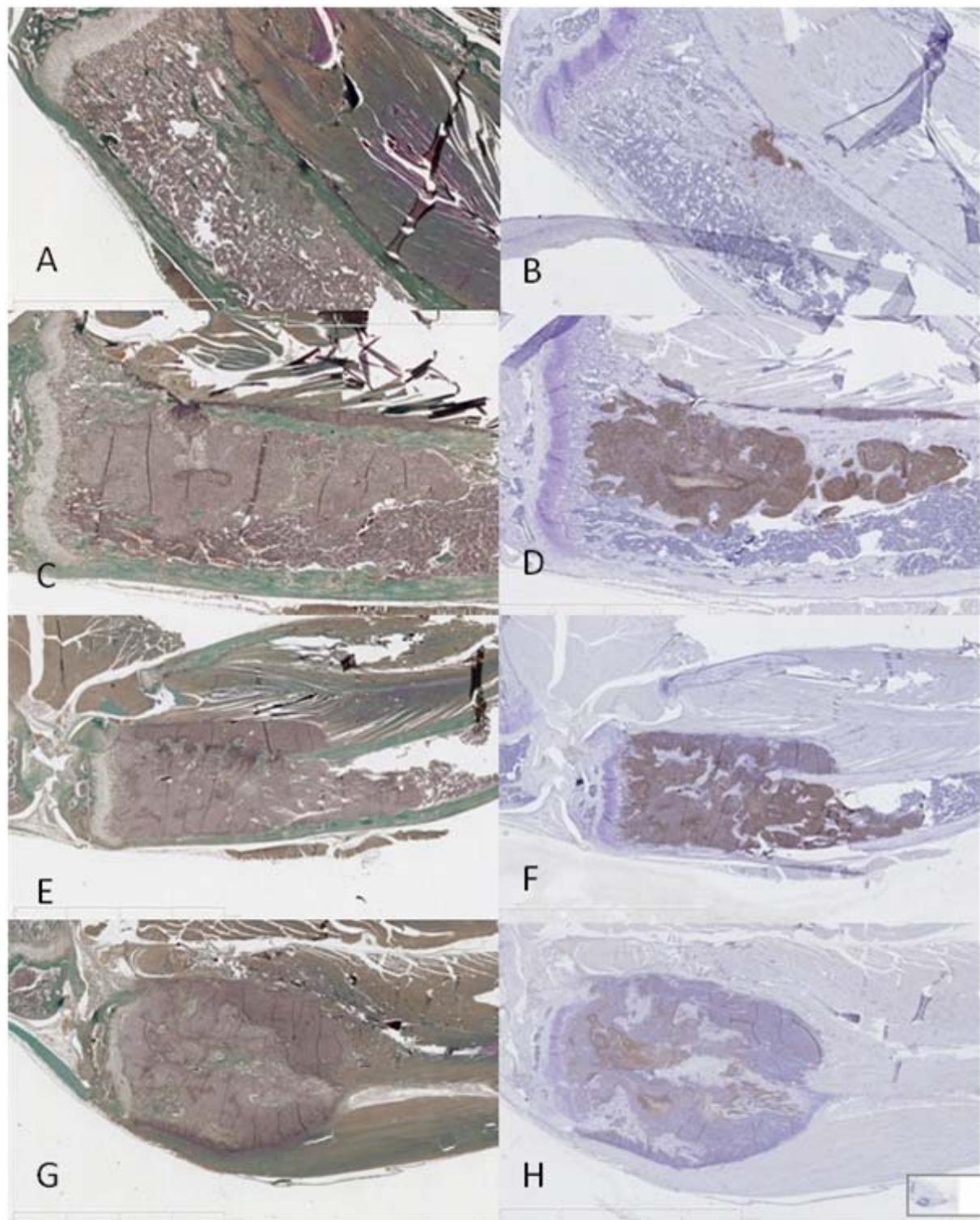


Figure 28. Développement tumoral précoce en intraosseux dans le groupe non traité. A, C, E et G : trichrome de Masson. B, D, F, et H : immunomarquage CD99. A et B (grossissement x20) : J7. C et D (grossissement x20) : J13. E et F (grossissement x15): J13. G et H (grossissement x15): J18.

- Groupe ZOL :

Nous observons des cellules tumorales de manière très précoce avec la persistance du trajet d'injection et un développement intraosseux comme dans le groupe contrôle (figure 29A et B). Les corticales sont épaissies très tôt et il n'y a aucun moment de destruction de ces corticales. On voit à J10 qu'il peut exister un développement tumoral intraosseux important sans qu'il y ait sortie de la tumeur par la voie corticale (Figure 29C et D). De même, au niveau métaphysaire, on observe une zone de travées d'os trabéculaire non dégradé entre le cartilage de conjugaison et la tumeur maintenant ainsi la tumeur à distance du cartilage de conjugaison.

Cependant, si nous observons un autre cas avec un développement uniquement métaphysaire de la tumeur, on observe un passage des cellules tumorales en extraosseux avec un développement dans les parties molles (Figure 29E et F). Dans ce cas, l'os métaphysaire est bien respecté et les cellules tumorales se développent entre les travées osseuses. Ainsi, pour sortir de l'os, les cellules tumorales ne pouvant stimuler l'ostéolyse au niveau diaphyse, passent probablement par les vaisseaux diaphysaires ou métaphysaires, ou entre les travées d'os spongieux en métaphysaire. Ce passage est donc plus difficile et ralentit le développement tumoral et son passage en extraosseux, ce qui explique le délai prolongé que mettent les tumeurs à sortir de l'os dans le modèle sensible A673. Dans le modèle résistant, nous avons vu que le volume tumoral moyen est identique dans les 2 groupes et qu'il n'y a pas de ralentissement du développement tumoral. Les cellules sensibles sont donc freinées par l'inhibition de l'ostéolyse, mais pas les cellules non sensibles. Ceci prouve un effet direct du ZOL sur les cellules sensibles, avec ralentissement du passage en extraosseux, probablement par un effet de proximité du ZOL fixé à l'os lorsque les cellules passent dans les vaisseaux ou entre les travées. Ainsi il existe un phénomène d'endiguement avec limite physique au passage de la tumeur dans les parties molles, mais aussi chimique dans le cas des lignées sensibles par inhibition des cellules au contact cherchant à passer par les vaisseaux sanguins. Dans les lignées

peu sensibles, le passage au travers de l'os cortical est donc possible et plus rapide car non inhibé par le ZOL.

Enfin, on observe dans un cas à J18 (figure 29G et H) une tumeur développée dans la diaphyse, au contact de l'os cortical et ne s'étendant pas à la métaphyse, ni aux tissus mous extraosseux. Il s'agit probablement d'un cas d'endiguement cortical, associé à un effet direct du ZOL, ralentissant la croissance tumorale jusqu'à la métaphyse et donc limitant son extension en extraosseux. Ce cas correspond probablement aux cinétiques d'apparition très lente des tumeurs décrit dans le groupe ZOL uniquement.

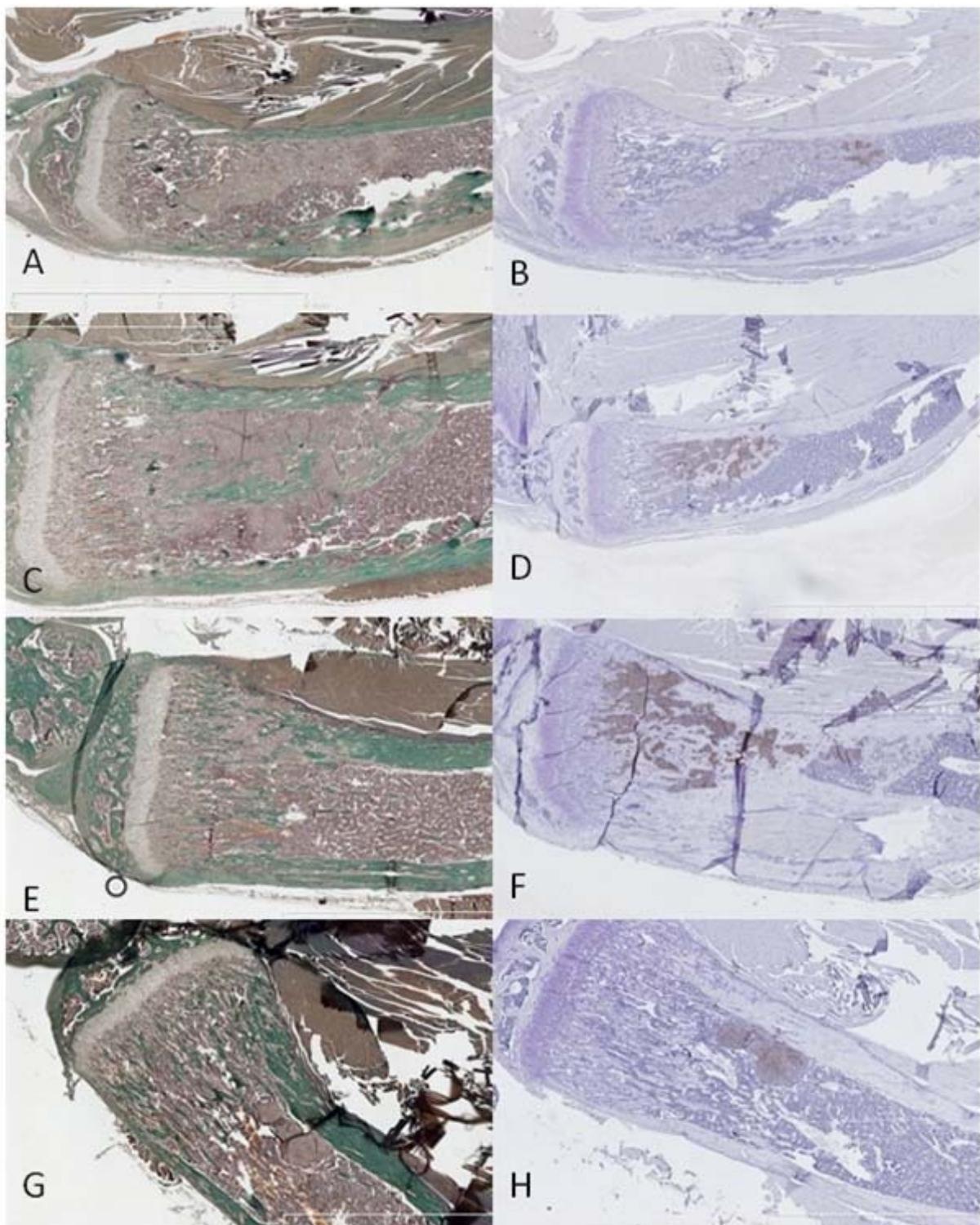


Figure 29. Développement tumoral précoce dans le groupe traité par ZOL. A, C, E et G : trichrome de Masson. B, D, F et H : immunomarquage CD99. A et B (grossissement x15) : J3. C et D (grossissement x 20) : J10. E et F (grossissement x 15) : J13. G et H (grossissement x 15) : J18.

Conclusion

L'étude des phases précoce du développement tumoral nous a permis d'observer le développement initial d'un SE injecté dans l'os d'une souris Nude. Ainsi, après installation des cellules tumorales dans la diaphyse, il y a prolifération de ces cellules, destruction de l'os cortical au contact et développement de la tumeur dans les parties molles adjacentes. L'ensemble de la diaphyse et de la métaphyse sont envahis, l'os minéralisé est détruit induisant des fractures pathologiques, le tissu musculaire est également envahi et détruit. Le cartilage de croissance est conservé et constitue une barrière au passage des cellules tumorales. Il y a donc une reproduction fidèle du développement tumoral observé dans le SE chez l'Homme. La cinétique de croissance est cependant extrêmement rapide comparé à la pathologie humaine. Ceci n'est peut être qu'une fausse impression en rapport avec la taille très faible du tibia des souris, entraînant inévitablement une tumeur comparativement plus volumineuse, pour une cinétique de croissance identique que chez l'Homme, chez qui la tumeur ne devient cliniquement décelable que pour un volume beaucoup plus important. Cette agressivité peut aussi être une caractéristique des lignées utilisées, qui sont souvent des lignées anciennes, issus de patients ayant une pathologie évoluée et métastatiques, et donc probablement des cellules plus agressives que celles présentent dans les tumeurs de la plupart des patients. Enfin, cette agressivité peut être en rapport avec l'absence de tout phénomène antitumoral chez ces souris athymiques qui ne présentent d'immunité médiée par les lymphocytes T.

Dans le groupe traité par ZOL, on observe le même développement tumoral précoce, mais une conservation de l'os cortical et un passage en extraosseux au moyen des vaisseaux ou espaces trabéculaires métaphysaires. Il n'y a pas de fracture pathologique et la tumeur se développe plus lentement dans le cas d'une lignée sensible avec un passage extraosseux plus tardif.

VI- Discussion et conclusion de la partie I

Dans cette partie, nous avons montré que le ZOL possède des propriétés anti-tumorales directes *in-vitro* sur les lignées de SE en induisant l'apoptose selon une voie indépendante des caspases. En analysant le cycle cellulaire, nous observons que le traitement par ZOL entraîne une accumulation des cellules au passage de la transition S-G2M. Il n'a pas été déterminé si c'est ce blocage en S-G2M qui induit l'apoptose ou alors s'il s'agit d'un autre mécanisme induisant directement l'apoptose. Bien que le mécanisme d'apoptose induit dans les ostéoclastes par le ZOL soit bien compris, les mécanismes en cause dans les cellules tumorales semblent varier selon le type cellulaire étudié. Dans l'ostéoclaste, le ZOL inhibe la FPPS, ce qui induit une inhibition de la prénylation des petites protéines G et une augmentation d'IPP, induisant l'apoptose selon 2 voies exposées précédemment. Dans les lignées tumorales, le ZOL peut avoir un effet apoptotique, ou induire une nécrose¹⁸⁷, et parfois il est juste cytostatique¹³⁰. Shipman et al ont montré que le mécanisme d'apoptose en cause dans les cellules de myélome multiple est le même que celui impliqué dans les ostéoclastes en inhibant la voie du mévalonate et en activant la cascade des caspases¹⁹². Une autre étude dans laquelle l'expression de BCL2 a été augmentée dans des cellules tumorales de myélome montre une protection des cellules traitées par ZOL contre l'apoptose, mais pas contre l'inhibition de la prolifération, indiquant l'importance du ratio BCL2/BAX dans le phénomène apoptotique des cellules tumorales en réponse au ZOL¹⁸⁵. D'autres études ont montré que le ZOL inhibait la FPPS dans des lignées de tumeurs du sein¹⁹³. La cible enzymatique intracellulaire du ZOL dans les cellules tumorales semble être la FPPS. Cette inhibition de la FPPS entraîne une perturbation de nombreuses voies et il est probable qu'en fonction du type cellulaire et de leur protéome, différentes voies d'activation de l'apoptose soient stimulées ou non¹⁹³.

Sur les cellules de SE, l'effet du ZOL est dose dépendant, mais aussi lignée dépendante. Ainsi, certaines lignées sont plus ou moins sensibles au ZOL, avec des IC50 allant de 5µM à 100µM. Ceci est

en accord avec ce qui est observé dans la littérature avec des IC₅₀ allant de 3 à 100µM. Le mécanisme de résistance au ZOL n'est pas bien connu, mais il semble que cette résistance peut être induite par exposition prolongée de lignées sensibles. Cette résistance induite peut être due à une surexpression de la FPPS, comme dans l'ostéosarcome¹⁸⁸, mais aussi par d'autres voies (p38-MAPK dans le cancer de la prostate¹⁹⁰). Nous n'avons pas trouvé de relation entre la résistance naturelle des lignées de SE et leur statut moléculaire ou leur taux d'expression de la FPPS. Il serait intéressant d'induire une résistance sur une lignée sensible de SE, pour déterminer si le mécanisme de résistance induite est le même que celui observé naturellement. Il est possible que cette résistance naturelle passe par d'autres voies (voie MDR multi-drug resistance, diminution du passage intracellulaire du ZOL), ou même par une adaptabilité des cellules au traitement. De plus, les études de résistance induite suggèrent la possibilité de clones de sensibilités différentes au sein d'une même lignée, puisque certaines cellules seront résistantes à certaines doses de ZOL et pas d'autres. En effet, le fait qu'une certaine concentration de ZOL inhibe la prolifération cellulaire à un certain degré indique que les cellules au sein d'une même boîte de Pétri ont des sensibilités différentes au ZOL. Si les cellules étaient identiques entre elles, l'atteinte d'une cellule par le ZOL à une certaine concentration entraînerait l'atteinte de toutes les autres cellules et on observerait une inhibition totale de la prolifération à partir d'une certaine concentration. Ceci peut expliquer l'hétérogénéité des résultats *in-vitro* d'une expérience à l'autre, ou d'une étude à l'autre utilisant les mêmes lignées cellulaires.

Dans la littérature, il a été décrit de nombreux effets synergiques du ZOL associé à d'autres agents de chimiothérapie sur différentes lignées cellulaires^{184,194,195}. D'autres études retrouvent un effet additif avec différents agents de chimiothérapie ou avec d'autres types de traitement¹⁹⁶. Dans cette étude, l'effet du ZOL sur les lignées *in-vitro* était additif avec un agent de chimiothérapie classique. Cet effet additif a été retrouvé pour toutes les lignées et indique donc l'intérêt d'associer le ZOL aux agents de chimiothérapie conventionnelle pour contourner les mécanismes de résistance aux agents de chimiothérapie classique.

Dans les modèles *in-vivo*, nous avons vu que le ZOL seul n'a pas d'effet sur le volume tumoral dans le modèle intramusculaire, mais il protège le tissu osseux de l'ostéolyse tumorale. Il possède cependant un effet lorsqu'il est utilisé en association à un agent de chimiothérapie classique. Plusieurs études ont montré un effet sensibilisateur du ZOL en association à la chimiothérapie et il semble que cet effet soit lié aux lymphocytes T V γ 9V δ 2¹⁹⁷. Cependant, dans notre étude, nous avons utilisé des souris Nudes athymiques qui ne possèdent pas de lymphocyte T, excluant cette possibilité. Lors de l'administration de ZOL, celui-ci va se fixer très rapidement à l'os et les cellules tumorales n'y sont que très brièvement exposées. Nous savons néanmoins que la concentration sérique de ZOL après injection est de 1 μ M¹⁹⁸, ce qui est inférieur aux IC50 indiquées pour les différentes lignées. Cependant, les cellules A673 exposées à 1 μ M de ZOL présentaient une inhibition de la prolifération cellulaire de 10% *in vitro*. Cette inhibition n'est probablement pas suffisante pour être significative cliniquement lorsque le ZOL est administré seul, mais peut le devenir par effet additif en association avec l'Ifosfamide. De plus, d'autres études ont montré un effet du ZOL sur des tumeurs extraosseuses^{167,199}. Ceci montre que le ZOL peut avoir un effet direct *in-vivo* sur le développement tumoral, effet qui ne passe pas par l'inhibition de l'ostéolyse tumorale. Ainsi, le ZOL semble avoir un intérêt en association avec la chimiothérapie conventionnelle, même en cas d'atteinte des parties molles, en cas de tumeur sensible.

Dans le modèle intraosseux, le ZOL inhibe la croissance tumorale en cas de lignée sensible et protège également le tissu osseux. Cette inhibition de la progression tumorale en milieu osseux est probablement en rapport avec une concentration plus importante de ZOL en milieu osseux. La concentration atteinte en milieu osseux n'est pas connue, mais pourrait être plus élevée dans les zones d'ostéolyse. Une étude utilisant le Pamidronate (Aredia), estimait la concentration atteinte à l'interface os-ostéoclaste de 800 μ M. Cependant, il n'est pas certain que cette concentration persiste en dehors de cet interface et la concentration à laquelle les cellules hors ostéoclastes sont exposées est inconnue. Il est envisageable cependant que l'apoptose de l'ostéoclaste induite par

l'internalisation du ZOL entraîne un relargage local du ZOL à forte concentration, suffisamment pour avoir les effets directs recherchés sur les cellules tumorales. L'effet direct *in-vivo* nécessiterait donc le passage du ZOL par les ostéoclastes pour qu'il soit libéré à fortes concentrations. Chez des souris présentant des ostéoclastes non fonctionnels, il a été montré un effet direct du ZOL *in-vivo* avec inhibition de plus de 80% du développement de tumeurs des parties molles dans l'os²⁰⁰. Ainsi, cette sensibilité tumorale *in-vivo* en milieu osseux ne semble pas nécessiter des ostéoclastes fonctionnels. De plus, en cas de lignée résistante, il n'y a pas d'inhibition de la croissance tumorale malgré une inhibition de l'ostéolyse tumorale. Ainsi, il semble que l'ostéolyse ne soit pas un événement causal, ni même un facteur favorisant du développement de la tumeur dans le SE dans ce modèle, et que l'effet *in-vivo* du ZOL est uniquement expliqué par un effet direct.

La modulation des doses et de leur fréquence n'a pas permis de mettre en évidence un régime supérieur aux autres même si l'injection de fortes doses occasionnellement semblait plus efficace que l'injection de faibles doses quotidiennement. Ceci est en contradiction avec certaines études précliniques menées dans le cadre du cancer du sein où il a été retrouvé un effet bénéfique de l'injection de petites doses fréquemment plutôt que de fortes doses occasionnellement^{201,202}. Cependant, dans ces études, les groupes ayant une injection quotidienne et une injection hebdomadaire présentaient les mêmes résultats sur l'inhibition de la progression tumorale. Seul le groupe recevant une dose unique de ZOL pour tout traitement présentait un résultat inférieur aux 2 autres groupes. Il semble donc intéressant de répéter les doses de ZOL, que celles-ci soient quotidiennes ou hebdomadaires.

Dans un article récent, il a été montré que le ZOL lié à l'os inhibe la croissance des cellules adjacentes²⁰³. Les cellules tumorales peuvent donc être atteintes par le ZOL à 2 moments : de manière intermittente lors des injections du ZOL, avec atteinte de l'ensemble des cellules proches des vaisseaux, et de manière continue pour les cellules tumorales proches du tissu osseux lors du

relargage local. Dans notre étude, le ZOL était injecté en sous cutané. Ceci entraîne la création d'une poche de liquide sous cutanées avec diffusion progressive du ZOL dans la circulation sanguine avant de se fixer à l'os. Il s'agit cependant d'une libération lente à partir de la poche d'injection sous cutanée, ce qui est très différent des injections thérapeutiques intraveineuses directes effectuées chez l'homme. Le pic de concentration plasmatique de ZOL dans notre modèle est donc probablement beaucoup plus faible, limitant l'effet direct sur les cellules tumorales en dehors de celles à proximité de la matrice osseuse. Nous observons cet effet sur l'analyse des phases précoce du développement tumoral en milieu osseux. Ainsi l'os traité semble être une barrière difficile à franchir pour les cellules tumorales sensibles, alors que ces mêmes cellules franchissent rapidement l'os cortical en l'absence de traitement.

De plus, il a été montré dans d'autres études un effet inhibiteur du ZOL sur l'angiogenèse à des concentrations plus faibles, une inhibition de l'adhésion cellulaire dès $1\mu M^{204}$ et de l'invasion pour des concentrations nanomolaires²⁰⁵. Ainsi, il existe un avantage à utiliser le ZOL dans le modèle intraosseux sous forme de fortes doses répétées car des effets sont observables même pour des concentrations circulantes faibles, soit sur les cellules tumorales, soit sur d'autres mécanismes impliqués dans le développement tumoral.

D'autres études évoquent un processus indirect pour expliquer l'effet du ZOL sur le développement tumoral en milieu osseux²⁰⁶. Cette étude montre un effet comparable sur la diminution de la progression tumorale de cellules de cancer prostatique en milieu osseux du ZOL et d'un anticorp anti-Osteoprotegerin dépourvu d'effet direct sur les cellules tumorales et ne ciblant que l'ostéoclaste. Dans notre modèle cependant, nous n'avons pas observé d'effet lié à l'inhibition de l'ostéolyse tumorale puisque les modèles induits par l'injection des lignées les moins sensibles présentaient des cinétiques de croissance identiques qu'elles soient traitées ou non. Cependant, il se peut qu'il y ait une dissociation entre la résorption osseuse et la prolifération tumorale dans notre

modèle car il s'agit de cellules tumorales humaines injectées dans un environnement murin. Ainsi, les cellules humaines injectées ne sont peut être pas sensibles aux facteurs de croissance murins libérés par l'ostéolyse tumorale. On pourrait donc s'attendre à un effet combiné direct et indirect du ZOL sur les patients porteurs de SE, supérieur à celui observé dans notre modèle préclinique. On peut également émettre l'hypothèse que les lignées tumorales ont des niveaux de dépendances différents à l'ostéolyse tumorale pour leur développement intraosseux. Ainsi, dans nos résultats, on peut penser que la lignée A673 est plus dépendante de l'ostéolyse que la lignée TC71 pour son développement. Cependant, la croissance rapide des tumeurs dans le modèle intramusculaire dans les deux cas montre une certaine indépendance de ces lignées vis-à-vis du tissu dans lequel elles se développent.

Partie II

Effets de l'acide Zolédonique sur le développement de métastases pulmonaires

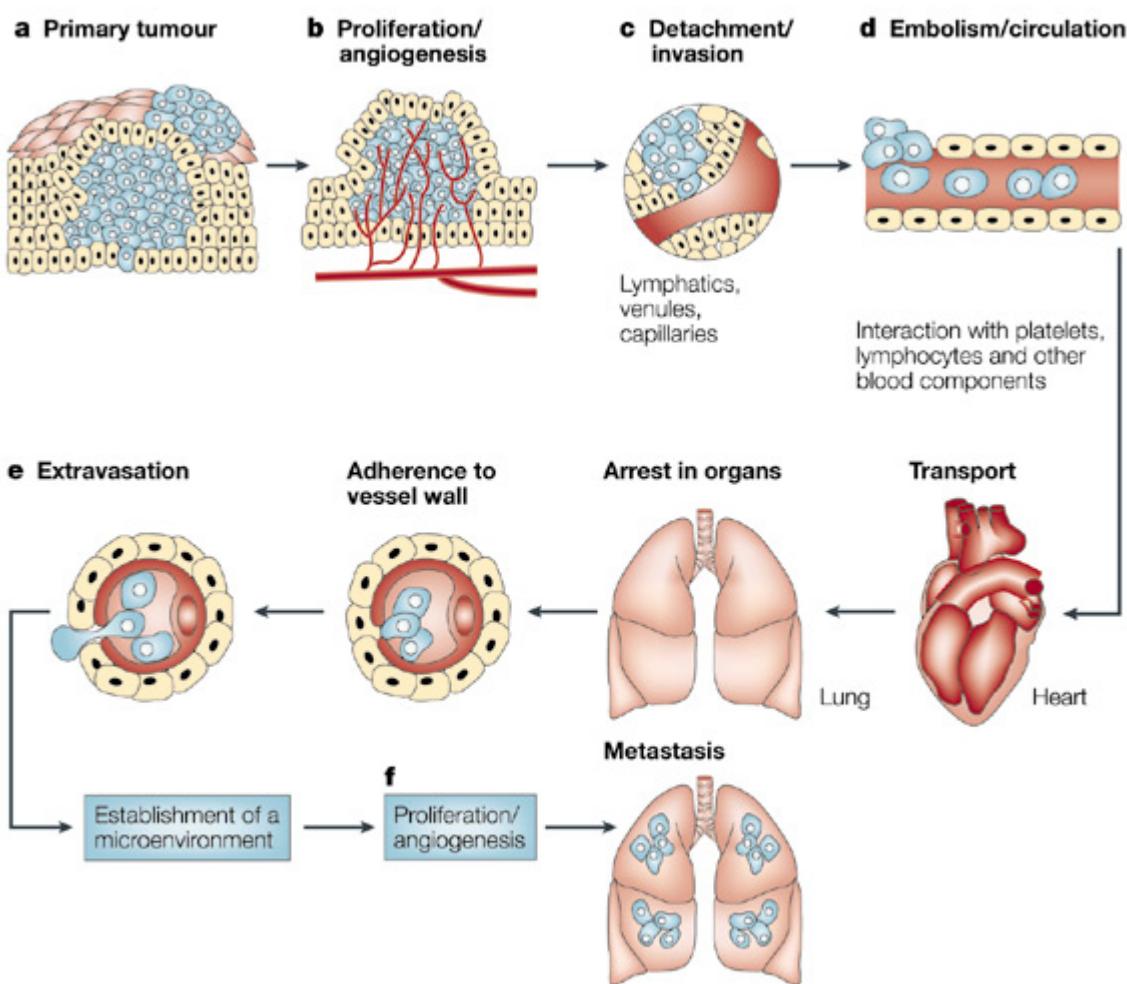
I- Introduction

Les métastases sont un facteur de mauvais pronostic dans l'évolution de la pathologie tumorale puisqu'elles représentent 90% des causes de décès par cancer²⁰⁷. Le processus métastatique se caractérise par la diffusion de cellules tumorales dans l'organisme avec atteinte à distance d'autres organes et il est spécifique des tumeurs malignes. Il s'agit d'un phénomène multi-étapes complexe nécessitant 1) le développement local de la tumeur dans les tissus environnants, 2) la migration des cellules cancéreuses au sein des vaisseaux (intravasation), 3) la survie des cellules dans le système circulatoire, 4) l'extravasation des cellules dans un tissu hôte, et 5) la prolifération dans le tissu hôte²⁰⁸ (figure 30). La complexité liée à la coordination de tous ces événements rend le processus métastatique très inefficace : sur une tumeur de 1 cm comprenant 1.10^9 cellules, environ 1 million de cellules vont partir dans la circulation et moins de 0.1% de ces cellules vont pourvoir se développer dans un tissu hôte^{209,210}. Un grand nombre de ces cellules peuvent devenir quiescentes et se réveiller des années après le traitement pour développer une nouvelle métastase²¹¹.

Le délai d'apparition de ces cellules métastatiques est toujours aujourd'hui en débat. Deux modèles existent : le premier décrit un développement linéaire et séquentiel dans le temps, nécessitant dans un premier temps le développement important de la tumeur primitive, de manière à permettre l'apparition d'un certain nombre de mutations nécessaires au processus métastatique, avec apparition de métastases secondairement. Le deuxième décrit un développement parallèle, avec un processus métastatique précoce lié à une tumeur de petite taille et un développement concomitant des lésions métastatiques qui doivent néanmoins acquérir certaines caractéristiques pour se développer dans un autre tissu expliquant l'apparition plus tardive des métastases²¹². De nombreuses études dans différentes tumeurs rapportent l'identification de cellules tumorales disséminées précocement dans la moelle osseuse ou dans les ganglions lymphatiques, ou de cellules tumorales circulantes dans la circulation sanguine, en faveur du deuxième modèle.

Un phénomène important est la préférence de certains types tumoraux pour certains organes.

Stephen Paget décrivait dès 1889 la théorie de la graine et du sol, la cellule tumorale (la graine) étant dépendante du tissu hôte (le sol) pour se développer. Ce tropisme de certains cancers pour certains tissus est expliqué par des facteurs biologiques cellulaires et tissulaires, mais aussi par des facteurs mécaniques²¹³.



Nature Reviews | Cancer

Figure 30. Le processus métastatique²¹⁴. Il s'agit d'un processus complexe qui nécessite de multiples étapes incluant l'angiogenèse, la migration et l'invasion dans un tissu hôte.

Dans le SE, 30% des patients se présentent d'emblée avec des métastases cliniques au diagnostic. Le taux de survie de ces patients ne dépasse pas 30% à 5 ans dans les meilleures études, mais se rapproche de 10% en incluant les métastases osseuses. Avant l'avènement des chimiothérapies dans les années 1970, et malgré un traitement chirurgical radical emportant la totalité de la tumeur primitive, 90% des patients décédaient de métastases. Ainsi, il existe un phénomène métastatique précoce dans le SE. Aujourd'hui, les patients présentant une tumeur localisée et recevant un traitement adéquat ont un pronostic à 5 ans de 60 à 70%. Ainsi, 30 à 40% des patients ayant une tumeur localisée et traitée à temps développent des métastases secondaires et la chimiothérapie ne permet pas d'éliminer les cellules tumorales disséminées chez tous les patients. En effet, 20% des patients atteint d'un SE localisé présentent des cellules tumorales disséminées au moment du diagnostic, et leur présence est un facteur de mauvais pronostic²¹⁵. La mutation EWS/FLI1 est suffisante pour induire une inhibition de l'adhésion cellulaire et une résistance à l'anoikis, phénomène de mort cellulaire par perte d'adhésion²¹⁶. Ceci pourrait expliquer le caractère précoce des cellules tumorales circulantes dans le SE.

In vitro, le ZOL inhibe les étapes initiales du processus métastatique que sont la migration et l'invasion dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales^{119,140,186,217}. Il n'a pas d'effet sur la migration de lignées non tumorales tels que les kératinocytes et les fibroblastes²¹⁸. Durant les premières étapes du phénomène métastatique, les MMP 2 et 9 (ou gélatinases A et B), sont responsables de la dégradation du collagène de type IV, élément essentiel des membranes basales, et elles sont les actrices principales de la dissémination métastatique. La MMP1 dégrade le collagène de type I, et ce dernier devient alors un substrat pour la MMP2. Sur des cellules de myélome in vitro, le ZOL inhibe la production de MMP 1 mais augmente la production de MMP 2²¹⁹. Dans une autre étude, il a été observé une inhibition de l'adhésion et de la migration de cellules tumorales de cancer du sein et de prostate à l'os sans diminution de la production des MMP mais par altération de leur fonction, probablement par chélation du Zinc²⁰⁴. Il a aussi été montré que le ZOL avait un effet

inhibiteur sur l'angiogenèse dans les processus tumoraux, phénomène précoce important dans le processus métastatique¹⁴⁰.

In-vivo, il a été observé avec d'autres BP de 3^{ème} génération (Risédronate et Ibandronate) qu'il pouvait y avoir une augmentation des métastases tissulaires dans un modèle d'injection intracardiaque de cellules tumorales de cancer du sein^{220,221}. Dans cette étude il était néanmoins retrouvé une efficacité très importante de l'association d'un bisphosphonate avec un inhibiteur de la MMP2²²¹. Dans un modèle d'ostéosarcome, le ZOL a permis de diminuer la fréquence des métastases pulmonaires et de prolonger la survie des souris¹¹⁰.

Dans une étude clinique récente, l'utilisation de ZOL en association à une hormonothérapie dans le cancer du sein diminuait les récidives tumorales osseuses et extraosseuses¹⁵⁴. Diel et al a montré que le Clodronate en association à la chimiothérapie classique chez des patientes porteuses de cancer du sein diminuait non seulement la fréquence des métastases osseuses, mais aussi des métastases viscérales, et augmentait la survie des patientes comparé au groupe ne recevant pas de Clodronate¹⁵². Cependant quelques années plus tard, Saarto et al montraient qu'il n'y avait que peu d'effet sur les métastases osseuses et une augmentation des métastases viscérales avec le clodronate²²². Toujours dans le cancer du sein, Powles et al ont observé une diminution des métastases osseuses sans modification des métastases viscérales²²³.

II- Article 2

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet du ZOL sur le processus métastatique pulmonaire dans un modèle murin de SE. Deux questions ont alors été soulevées : 1) le ZOL peut-il avoir un effet sur des métastases pulmonaires pré-existantes, et 2) le ZOL peut-il prévenir l'apparition de nouvelles métastases pulmonaires ?

Nous avons commencé par réaliser des expériences *in-vitro* pour déterminer l'action du ZOL sur la migration et l'invasion des cellules de SE. Ensuite, nous avons utilisé des modèles murins en utilisant des souris Nudes comme décrit précédemment. Nous avions remarqué que les souris ayant eu une injection intraosseuse présentaient pour la plupart des métastases pulmonaires macroscopiques, alors que les souris ayant eu une injection intramusculaire n'en avaient jamais. De plus, dans le modèle intraosseux certaines souris mourraient dans les secondes suivant l'injection par détresse respiratoire, mais jamais dans le modèle intramusculaire. Nous avons alors émis l'hypothèse que ces souris mourraient d'emboles tumoraux massifs au moment de l'injection des cellules tumorales en intraosseux. Ainsi, les souris non mortes recevaient probablement des microemboles pouvant être responsables de métastases pulmonaires expérimentales précoces. Pour étudier cette hypothèse, nous avons réalisé un protocole dans lequel les souris recevaient l'injection de cellules tumorales en intraosseux dans le tibia, et étaient amputées de la patte ayant reçu l'injection à J1. Ainsi, en cas de développement de métastases pulmonaires, nous étions en présence de métastases expérimentales induites par l'injection et non pas en présence de métastases spontanées issues de la tumeur primitive.

Nous avons également analysé les poumons des souris utilisées dans le protocole d'étude du développement précoce de SE en intraosseux décrit précédemment dans la partie I, à la recherche de métastases pulmonaires précoces visualisables par immunomarquage au CD99 et d'un possible effet du ZOL sur ces phases précoces, ainsi que les poumons des souris utilisées dans les protocoles étudiant l'effet du ZOL sur le développement tumoral dans un modèle intraosseux (figure 21) pour déterminer s'il existait une différence dans le nombre et dans la taille des métastases pour les souris traitées avec du ZOL en comparaison avec les souris non traitées, et pour rechercher une différence entre le modèle utilisant une lignée sensible et le modèle utilisant une lignée résistante.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Zoledronic acid inhibits pulmonary metastasis dissemination in a preclinical model of Ewing's sarcoma via inhibition of cell migration

Guillaume Odri^{1,2,3}, Pui-Pui Kim^{1,2}, François Lamoureux^{1,2}, Céline Charrier^{1,2}, Séverine Battaglia^{1,2}, Jérôme Amiaud^{1,2}, Dominique Heymann^{1,2}, François Gouin^{1,2,3} and Françoise Redini^{1,2,4*}

Abstract

Background: Ewing's sarcoma (ES) is the second most frequent primitive malignant bone tumor in adolescents with a very poor prognosis for high risk patients, mainly when lung metastases are detected (overall survival <15% at 5 years). Zoledronic acid (ZA) is a potent inhibitor of bone resorption which induces osteoclast apoptosis. Our previous studies showed a strong therapeutic potential of ZA as it inhibits ES cell growth in vitro and ES primary tumor growth in vivo in a mouse model developed in bone site. However, no data are available on lung metastasis. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of ZA on ES cell invasion and metastatic properties.

Methods: Invasion assays were performed in vitro in Boyden's chambers covered with Matrigel. Matrix Metalloproteinase (MMP) activity was analyzed by zymography in ES cell culture supernatant. In vivo, a relevant model of spontaneous lung metastases which disseminate from primary ES tumor was induced by the orthotopic injection of 10^6 human ES cells in the tibia medullar cavity of nude mice. The effect of ZA (50 µg/kg, 3x/week) was studied over a 4-week period. Lung metastases were observed macroscopically at autopsy and analysed by histology.

Results: ZA induced a strong inhibition of ES cell invasion, probably due to down regulation of MMP-2 and -9 activities as analyzed by zymography. In vivo, ZA inhibits the dissemination of spontaneous lung metastases from a primary ES tumor but had no effect on the growth of established lung metastases.

Conclusion: These results suggest that ZA could be used early in the treatment of ES to inhibit bone tumor growth but also to prevent the early metastatic events to the lungs.

Keywords: Ewing's sarcoma, Zoledronic acid, Lung metastases, Animal models

Background

Ewing sarcoma (ES) is the second most frequent primary bone malignancy in adolescents and young adults with a reported annual incidence rate of 2.93 cases/ 10^6 in the interval from 1973 to 2004 [1]. ES is defined by a chromosomal translocation involving the EWS gene on chromosome 22 with a gene of the ETS family located on different chromosomes [2], leading in 85% of cases to the EWS-FLI1

translocation t(11;22)(q24;q12), whereas the EWS-ERG gene occurs in the majority of the remaining 15% of EFTs. Detection of the translocations allows a specific molecular diagnosis. Despite the impressive improvement of survival in the last decades using multimodal approaches, 5-year overall survival (OS) of ES patients with localized disease remains at 70% [3], dropping down to <15% in patients with multifocal primary disease or with early relapse [4]. At diagnosis, metastases are detected in 15% to 33% of patients [5,6], with survival rates from 9% to 41% [7,8]. Patients with primary pulmonary metastases fare better than patients with primary bone and/or bone marrow (BM) involvement [9]. In the absence of chemotherapy, approximately 90% of patients die from disease following definitive surgery,

* Correspondence: francoise.redini@univ-nantes.fr

¹INSERM, Equipe Ligue Contre le Cancer 2012, UMR-957, Nantes F-44035, France

²Faculté de Médecine, Laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives, Université de Nantes, EA3822, Nantes F-44035, France

Full list of author information is available at the end of the article

suggesting that the vast majority of patients have micro-metastatic disease at presentation [10,11]. Therefore, new therapies have to be developed to inhibit metastasis dissemination in ES.

Bisphosphonates (BPs) are pyrophosphate derived molecules which selectively concentrate at the bone resorption surface [12], induce osteoclast apoptosis resulting in inhibition of bone resorption [13]. In addition, they inhibit adhesion, invasion and proliferation, and induce apoptosis in a variety of human tumor cell lines in vitro such as breast, myeloma, pancreas, melanoma, prostate cancer and osteosarcoma [14]. Among all BPs tested, Zoledronic Acid (ZA), one of the third generation nitrogen containing BPs, shows the greatest inhibitory effects on both osteoclast activity and tumor cell proliferation. Used since several years for the treatment and prevention of osteoporosis, its application is now extended to reduce skeletal morbidity in patients with malignant bone disorders [15]. It is increasingly used alongside anticancer treatments to prevent skeletal complications and relieve bone pain. Concerning primary bone tumors, ZA has been associated to conventional chemotherapy and surgery in the French OS2006 phase III clinical trial for osteosarcoma treatment, after promising preclinical results had been found on survival and tumor growth [14,16]. ZA has also been found to inhibit bone and visceral metastases development in several types of cancer [17].

In Ewing's sarcoma, ZA has been shown to inhibit proliferation on ES cell lines in vitro and to slow the tumor growth in a mouse ES model in bone [18]. Because ES patients harbor micrometastases very early in the disease, we thought that ZA could have an effect to cure or prevent these metastases. The aim of this study was to determine the effect of ZA on ES cell migration and metastatic properties in vitro through migration and invasion assays and gelatin zymography, and in vivo in a mouse ES model of spontaneous pulmonary metastases.

Methods

Cell lines and culture

The human Ewing's sarcoma A-673 cell line was provided by Dr S. Burchill (Children Hospital, Leeds, UK) and the TC-71 cell line by Dr. O. Delattre (INSERM U830, Institut Curie, Paris, France). These two cell lines were chosen as they respond differentially to ZA: A-673 is sensitive ($IC_{50} = 3 \mu M$) and TC-71 more resistant ($IC_{50} = 100 \mu M$). A-673 and TC-71 cell lines were cultured respectively in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biowhittaker) and RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Biowhittaker) medium both with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, France). All cultures were performed under laminar flow hood (PSM Securiplus, Astec France) in controlled mycoplasma free environment. The cells, initially seeded at the concentration

of 10^4 cells/mm², were incubated at 37°C with humidity saturated controlled atmosphere and 5% CO₂. At confluence, cells were detached with trypsin-EDTA [Biowhittaker, Trypsine: 0.5 g/L; EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid): 0.2 g/L]. Trypsine was neutralized by adding FBS-containing medium and cells were collected after centrifugation at 1600 rpm.

Invasion assay

A-673 Ewing's sarcoma cells were treated by 20 $\mu mol/L$ ZA [1-hydroxy-2-(1H-imidazole-1-yl) ethylidene-bisphosphonic acid supplied as the disodium salt by Novartis Pharma AG] during 24 h. Invasion of cultured cells was analyzed using Boyden's chambers (8 μm pores, Becton Dickinson Labware) covered by polyethylene terephthalate membrane with Matrigel® coating (2 $\mu g/100 \mu L$ /well in cold PBS) in 24-wells plate (Multiwell™ 24, FALCON®). At the end of the 24 h-period, viable cells were counted (by trypan blue exclusion) and the same number of ZA treated and non treated viable cells ($4 \cdot 10^4$) were seeded in the upper compartment of 500 μL cups in 1% FBS medium. The chamber was immersed in 700 μL of 10% FBS medium and left 48 h for incubation at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere. Non invasive cells were removed and invading cells present on the inferior surface of the membrane were fixed by 3% PFA (ParaFormAldehyde) and stained by methylene blue. After drying, the invasive cells were counted with 10 \times microscope in 5 microscopic fields using DP controller, DP manager software (Olympus). All experiments were repeated 3 times in duplicates and invasion is expressed by mean number of cells / field.

Gelatin zymography

Metalloproteinase activity was analyzed by gelatin zymography. A-673 and TC-71 cells were cultured and treated for the last 24 h of culture (at subconfluent state) with increasing concentrations of ZA (5 to 100 μM) in serum free medium. This treatment period did not alter final cell number as determined by trypan blue exclusion (not shown). Then same supernatant volume was electrophoresed in 10% SDS polyacrylamide gels containing 1 mg/ml gelatin. Gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 to remove SDS, washed briefly in distilled water and then incubated in 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ (pH 7.5) overnight at 37°C. The gels were then stained with 0.25% (w/v) Coomassie brilliant blue and destained with 10% isopropanol in 10% acetic acid. The gelatinolytic activity was identified as transparent bands in the Coomassie brilliant blue-stained background.

In vivo experiments

Animal ethics

All procedures involving animals were conducted in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European

Parliament and the Council of the 22/09/2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The protocols presented in this study were approved by the French ethics committee (CEEA PdL. 06) with the protocol number 2010.34.

Mouse models of ES

To study the effect of ZA on the metastatic ability of ES, an intra-osseous (IO) model was developed as described previously [18]. Four-week-old female athymic mice were purchased from Janvier breeding (St Genest, France). Mice were anesthetized by inhalation of a combination isoflurane/air (1.5%, 1 L/min) and they received buprenorphine after the tumor cell injection (0.05 mg/kg; Temgesic®, Schering-Plough). Mice were randomly assigned to treatment groups 1 day after the tumor cell injection. The tumor volume was calculated by using the formula $L \times (l^2)/2$, where L and l represent respectively the longest and the smallest perpendicular diameter.

Lung metastases experiments

First experiment: 30 mice were injected with 1 million A-673 cells in the right tibia (intra-osseous injection: IO) at day 1 and were amputated at day 2. Amputation was realized under anesthesia, by disarticulation of the hip joint. The mice received 0.05 mg/kg buprenorphine all along the experiment. They stayed individually until day 45, when they were sacrificed and lungs were collected for histological analysis.

Second set of experiments (24 mice): After IO injection of 1 million A-673 or TC-71 cells in the right tibia, half of mice were randomly assigned to the control group ($n = 12$), which received subcutaneous PBS injections (3×/week), or to the treated group ($n = 12$) which received subcutaneous ZA 50 µg/kg (3×/week) starting day 2 after tumor cell inoculation. Mice were euthanized when tumor volume exceeded 2500 mm³ or when mice showed signs of lung metastases development (respiratory distress, weakness, weight loss, dorsal kyphosis). Lungs were collected for histological and macroscopic analysis: the lungs were categorized according to the size (big or small) of the metastases. Mice were excluded from analysis when no tumor developed in the tibia or when the IO injection failed or was performed intramuscularly.

Third experiment (30 mice): Mice were injected with A-673 ES cells at day 1 and 3 were sacrificed at early time points before primary tumor could be detected (day 3, 7, 10, 13 and 17 after tumor cell injection). A group of 15 mice was treated by subcutaneous injection of ZA 50 µg/kg 3×/week starting at day 2. A control group of 15 mice received subcutaneous PBS injections. Three mice were euthanized in each group at each endpoint and lungs were collected for histological analysis.

Immuno-histochemical analysis

Immuno-staining with anti-human CD99 antibody was performed on collected lungs from ZA treated and non treated mice. All samples were included in paraffin and 2–4 µm cuts were performed with a microtome (Leica RM 2255, Leica microsystème SAS, France). The samples were automatically deparaffined (HMS740 automatic: 3 × 5 mn OTTIX PLUS, 3 × 5 mn Ethanol 100°, 1 × 5 mn Ethanol 95°, 1 × 5 min Ethanol 80°, 3 × 5 mn in distilled water), and rinsed in TBS 1× pH = 7.6 Tween 0.05% at room temperature. Endogenous peroxidases were blocked by H₂O₂ 3% 15 min at room temperature and nonspecific sites were blocked by Goat serum 5%, BSA1% diluted in TBS 1× pH = 7.6 Tween 0.05%. Samples were incubated with the primary mouse anti CD99 antibody (diluted at 1:50) at room temperature and rinsed in TBS 1× pH = 7.6 Tween 0.05%. Secondary biotinylated goat anti mouse antibody (Dako, E0433) diluted at 1:200 was applied 30 min at 37°C and rinsed in TBS 1× pH = 7.6 Tween 0.05%. The samples were then incubated in streptavidine/peroxidase (Dako, P0397) diluted at 1:200 in TBS. The substrate was applied 1–10 min in obscurity and rinsed. The samples were counterstained in HMS740 with hematoxylin Gill. Slides were then mounted and ready for observation.

Statistical analysis

All in vitro experiment were realized 3 times. Numbers of cells per field mean counts were compared by a non parametrical Wilcoxon test. In vivo, mean tumor volumes were compared using Kruskal-Wallis test. The size of lung metastases categorical variable was analyzed by Fisher's exact test. The difference was considered significant at $p < 0.05$.

Results

Zoledronic acid inhibits Ewing's sarcoma cell invasion in vitro

To determine whether ZA could affect tumor cell invasion, assays were realized in Boyden's chambers covered with Matrigel. Because ZA affects tumor cell proliferation, only the surviving cells (determined by trypan blue exclusion test) after 24 h ZA 20 µmol/L treatment were used and compared to non treated cells. The same number of treated and non treated viable cells (4.10^4) was thus seeded in the top of Boyden's chambers and left for 24 hours. On the bottom side of the membrane an average of 130.75 cells/ field was counted for the non treated cells versus 22.9 cells/ field for the ZA treated cells (Figure 1A and B), the difference being statistically significant ($p < 0.001$). Therefore, ZA 20 µmol/L significantly inhibits A-673 ES cell line invasion through a Matrigel membrane in vitro.

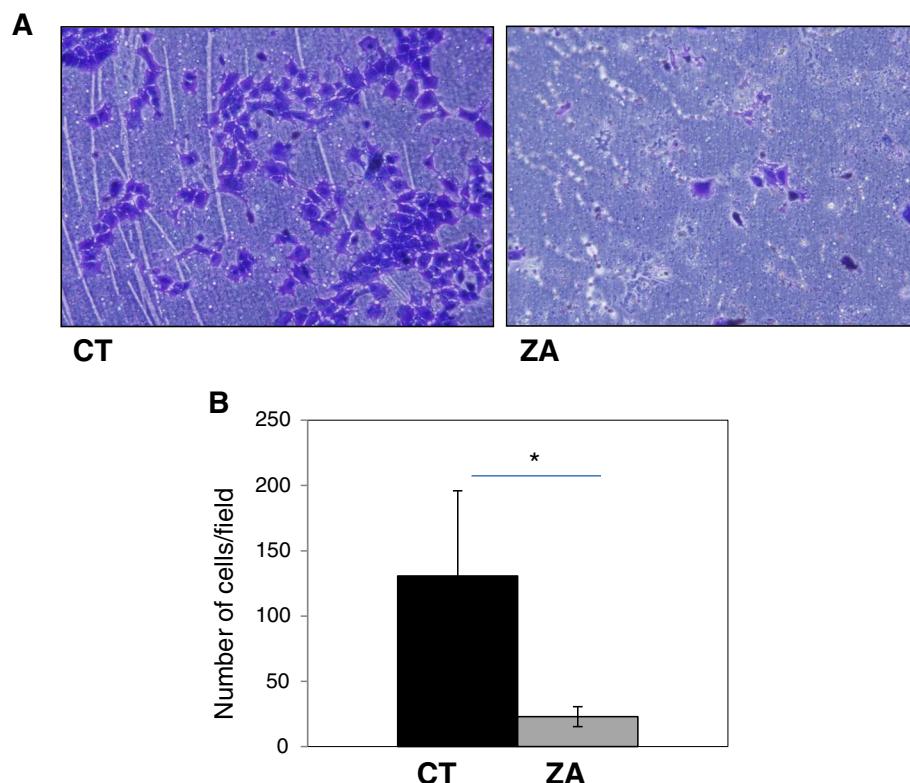


Figure 1 Effect of zoledronic acid (ZA) on Ewing's sarcoma cell invasion through Matrigel. Human A-673 ES cells were seeded and cultured for 24 hours in the presence of ZA. Then 4.10^4 cells were placed on the top of the Boyden's chamber and left to invade the Matrigel 48 h without ZA. **A.** Microscopic observation ($\times 10$) of ES cells on the bottom of the Boyden's chamber at the end of the 24 h. **B.** mean number of cells /field after invasion assay in Boyden's chamber recovered by Matrigel. (*: $p < 0.05$).

Zoledronic acid inhibits matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 activity

In order to determine whether ZA-induced inhibition of ES invasion was due to impaired MMP-2 and -9 activities, zymography assay was performed on culture supernatants of Ewing's sarcoma cells treated or not with ZA. At sub-confluent state, TC-71 and A-673 cells were cultured for the last 24 h with or without ZA in serum free conditions. At the end of this period, cell cultures were confluent, and no differences in cell number could be determined. Same volume of culture medium was collected and analyzed by gelatin zymography. Zymographs presented in Figure 2 showed that ZA inhibits MMP9 and MMP2 activity in both ES cell lines studied. This inhibition is ZA dose-dependent especially for the A-673 cell line, and is more significant when considering MMP-2 than MMP-9 activity.

These interesting results prompted us to complete this study by an *in vivo* approach, in order to determine whether ZA could inhibit pulmonary metastasis dissemination in relevant ES models of metastases. Indeed, we previously demonstrated that ZA was able to inhibit Ewing's sarcoma tumor progression in bone, and the present encouraging results on Ewing's sarcoma cell migration

suggest that ZA could also influence metastasis formation *in vivo*.

Development of an ES model of pulmonary metastasis dissemination

To develop such *in vivo* studies, a relevant model of spontaneous lung metastases was needed. From previous work showing that pulmonary metastases could only be observed in models induced by intra-tibia tumor cell injection, this model was chosen in the present study (no pulmonary metastases could be observed when the ES cells were injected in soft tissue). However, because very early lung metastases could be observed in this intra-osseous model, we hypothesized they could result from direct tumor cell emboli during the injection. Indeed, 0 to 50% of the mice died of pulmonary distress within minutes after the injection, possibly due to massive pulmonary embolism. To demonstrate this hypothesis, a first experiment was realized in which mice were amputated at day 1 after intraosseous injection of 1.10^6 A-673 ES cells in the medullar cavity of the tibia and left to live until day 45, at which time they were sacrificed. In this experiment, none of the mice died

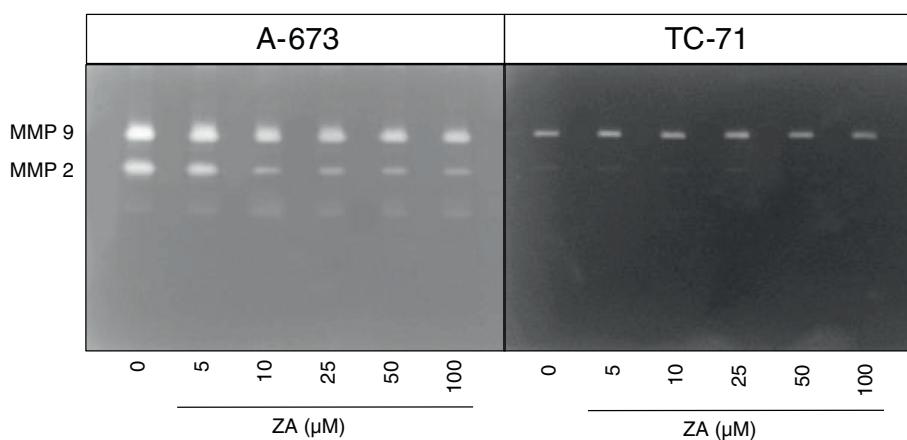


Figure 2 Effect of zoledronic acid (ZA) on MMP activity analyzed by gelatin zymography. MMP-2 and MMP-9 activities were evidenced at the corresponding molecular weight. Subconfluent A-673 and TC-71 human ES cell lines were cultured in the presence or absence of zoledronic acid at increasing concentrations (5 to 100 μM) for the last 24 h of culture. The supernatant was then harvested and the same volume submitted to electrophoresis in a gel containing gelatin (see Methods section).

immediately after the injection. Three mice out of 30 developed lung metastases, and all of these were "big" (one diameter > 5 mm determined by histology; data not shown). No small metastases were found. Thus, we must be aware that intraosseous injection alone can induce experimental metastases, determined as "big" metastases at sacrifice (i.e. when primitive tumor volume reaches 2500 mm³, approx. 45–50 days after tumor cell injection) that are not representative of spontaneous metastases disseminating from an established primary tumor.

Effect of zoledronic acid on spontaneous lung metastasis dissemination

The dose and time schedule used in the present study reproduce those used in the OS2006 clinical trial for pediatric patients (50 μg/kg, every 4 weeks). We first confirmed that this protocol also induces a significant inhibition of primary Ewing's sarcoma progression in bone at day 29 ($p < 0.05$, Figure 3A) as it has been published with the previous protocol used (100 μg/kg, twice a week, [18]). To determine whether ZA could affect spontaneous pulmonary metastasis formation, mice received intra-tibia injection of 1.10^6 A-673 or TC-71 ES cells and divided into 2 groups ($n = 12/\text{group}$): the control group treated with PBS and the other treated with ZA 50 μg/kg 3 times a week. Mice were sacrificed when the primary tumor reached 2500 mm³ (around day 45–50 after tumor cell injection) and the lungs were collected for histology analysis. Lungs from control mice exhibit both "big" (defined nodules with one diameter > 5 mm) and "small" (defined as < 5 mm) metastases within the same lungs (Figure 3B, left: arrows: big metastases and stars: small metastases), big metastases reflecting "false" experimental metastases due to the initial tumor cell injection, and the smaller ones corresponding to newer spontaneous

metastases disseminating from the primary tumor. ZA-treated mice showed also big metastases but very few or no small ones (Figure 3B, right). The macroscopic analysis results of the different experiments are summarized in Table 1a (A-673 Ewing's sarcoma model) and 1b (TC-71 Ewing's sarcoma model): ZA treated mice had significantly less small metastases than the untreated ones ($p < 0.05$), although no significant change was observed in the amount of large metastases. These results suggest that ZA limits metastases arising spontaneously from the primary bone tumor (small metastases).

Effect of Zoledronic acid on experimental lung metastases

We also studied the effects of ZA on early development of experimental lung metastases. Thirty mice received injection of 1.10^6 A-673 ES cells in the medullar cavity of the tibia, 15 being treated with ZA 50 μg/kg three times a week and the others with PBS (controls). Three mice were euthanized at different endpoints early before tumor detection at the primary site (3, 7, 10, 13 and 17 days after tumor cell injection), to determine whether ZA could act on early metastasis development, corresponding to direct dissemination in the blood circulation after injection ("false" experimental metastases). Metastases could be observed in this intra-osseous injection model in both groups, with no significant difference in the size, the number and the delay of appearance, suggesting that ZA has no effect on early experimental lung metastases development (Figure 4).

Discussion and conclusions

The objective of this study was to characterize the effect of zoledronic acid on Ewing's sarcoma cell invasion and pulmonary metastasis dissemination by both *in vitro* and *in vivo* approaches.

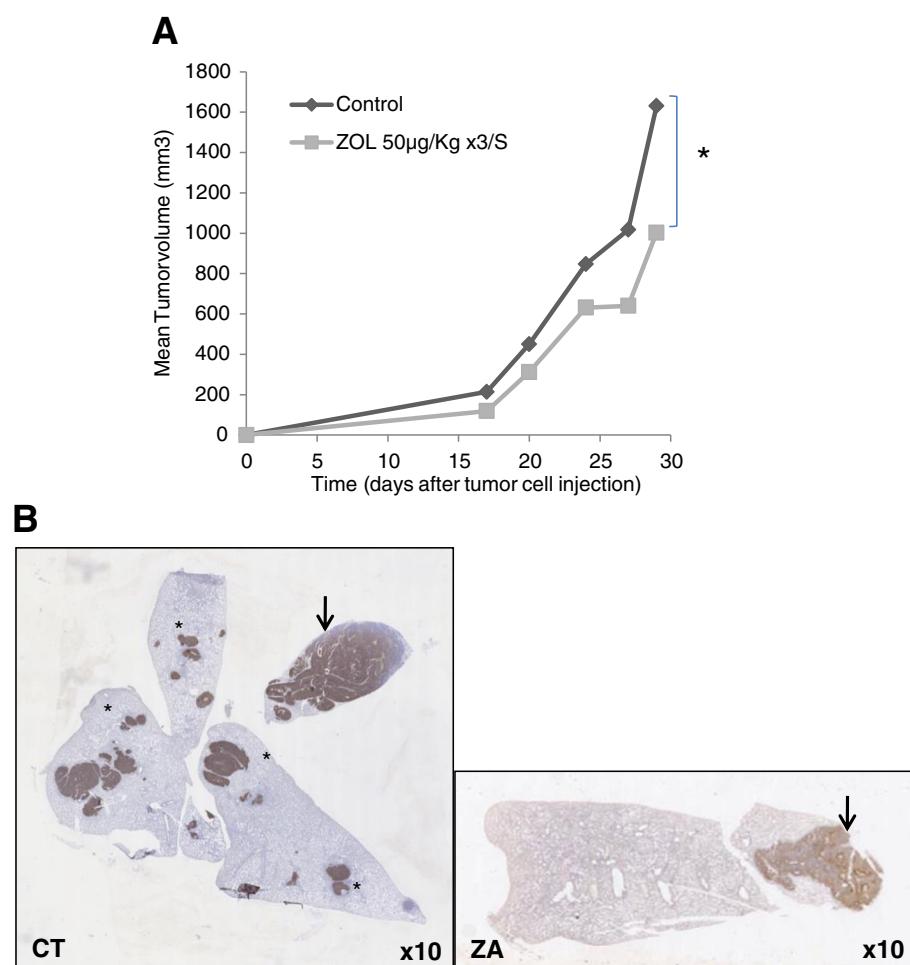


Figure 3 Effect of ZA on tumor progression and metastasis dissemination. **A:** Comparison of tumor volume evolution between ZA (50 µg/kg, 3 times a week during 4 weeks) treated and non treated (PBS) nude mice in the A-673 Ewing's sarcoma model; **B:** Histological comparison of lung metastases in mice 30 days after A-673 ES tumor cell injection in the medullar cavity of the tibia. ES cells were revealed by positive CD99 immunostaining. (left: Control mice, magnitude $\times 10$; right: ZA treated mice, magnitude $\times 10$). Both small (spontaneous, stars) and big (experimental, arrow) metastases can be seen in control mice whereas only a big one (arrow) is seen in ZA treated mice. These histology analyses are representative data of at least 6 mice/group.

An inhibitory effect of ZA was observed on ES cell invasion in vitro, as well as an inhibition of MMP-2 and -9 activities. ZA has been previously reported to decrease cell migration and invasion for tumor cells in prostate cancer, pancreatic carcinoma [19], osteosarcoma [20], and breast cancer cells [21], but also for non neoplastic cell types such as osteoclasts, osteoblasts, fibroblasts [22], endothelial progenitor cells, oral epithelial cells, or vascular smooth muscle cells [23]. Because MMP-2 and -9 are considered as the proteinases mostly involved in the invasion process, several studies provide evidence for an effect of BPs in preventing tumor cell invasion through MMP decreased expression and activity, but also by a direct inhibitory effect on MMP proteolytic activity through zinc chelation [21]. In our experiments, we carefully distinguished between ZA effect on ES cell proliferation and on cell invasion. For that

purpose, ES cells were treated during 24 hours with ZA, and only the same number of surviving cells was used in the invasion assay. In addition, ZA being not present during the invasion assay, the observed inhibition of cell invasion could not be due to ZA-induced cell death or to the inhibition of MMP activity through zinc chelation.

The second part of our work focused on the potential in vivo effect of ZA on pulmonary metastasis formation. We first needed to develop a relevant model of spontaneous pulmonary metastases. Only one study reported an experimental model of bone metastases in Ewing's sarcoma induced by intra-venous injection of TC-71 cells, in which lung metastases were also observed [24]. In our laboratory, two main approaches have been used to develop primary ES tumors in mice: tumor cell injection in soft tissue or inside the medullar cavity [18]. From

Table 1 Comparison of the number and percentage of mice in each group according to the size of the metastases found in the A-673 (a) and the TC-71 (b) models

a	N	%
Total number of mice	24	
Dead mice at injection	3	12.5
Randomized mice	21	
Control group		
Total number of mice in group	10	
Intra-muscular injection	0	0
Mice with no metastasis	1	10
Mice with big metastasis	4	40
Mice with small metastasis	8	80
Mice with big and small metastasis	3	30
ZA treated group		
Total number of mice in group	11	
Intra-muscular injection	1	9
Mice with no metastasis	2	18
Mice with big metastasis	8	73
Mice with small metastasis	2	18
Mice with big and small metastasis	2	18
b	N	%
Total number of mice	24	
Dead mice at injection	5	21
Randomized mice	19	
Control group		
Total number of mice in group	9	
Intra-muscular injection	0	0
Mice with no metastasis	2	22
Mice with big metastasis	3	33
Mice with small metastasis	7	78
Mice with big and small metastasis	3	33
ZA treated group		
Total number of mice in group	10	
Intra-muscular injection	1	10
Mice excluded because no tumor	1	10
Mice with no metastasis	4	40
Mice with big metastasis	2	20
Mice with small metastasis	2	20
Mice with big and small metastasis	0	0

these previous experiments, no metastasis formation could be observed in the soft tissue model whereas many lung metastases were detected in the intra-osseous induced model. However, intra-tibial injection of ES cells in nude mice was shown to induce early experimental metastases in 10% of cases, likely as if the cells were injected directly into the bloodstream. In some cases, mice immediately died from respiratory distress,

probably due to a massive tumor cell embolism into the pulmonary veins. This is in accordance with the presence of very early lung metastases found in the mice as early as day 3 after tumor cell injection in the present study. It is also in accordance with the presence of lung metastases in mice which were amputated at day 1, which make it impossible that these metastases arise from disseminating metastatic cells from a well implanted primary tumor. Thus, during intra-tibial injection of the ES cells, cell embolisms may directly go to the lungs, creating "false" experimental metastases. This has to be taken into account while studying lung metastases using this intra-osseous model.

Two ES models were compared in this study: one induced by a sensitive (A-673) and one by a resistant (TC-71) cell line. The aim was to determine whether the ZA effects on invasion, migration and metastasis formation was dependent or not on its effect on tumor cell proliferation. Results showed that in both models, ZA diminished the formation of "small" spontaneous metastases, suggesting that ZA may exert direct effect on invasion independent of tumor cell proliferation.

Two recent studies reported that ZA could increase lung metastases of osteosarcoma after intra-tibial injection in nude mice, but none of those studies explain the difference between experimental and spontaneous metastases that is a real limitation of this approach [25,26]. In the present study, ZA prevents spontaneous lung metastases spreading from the initial tumor as shown in the second set of experiments, but had no effect on the "false" experimental metastases. Histological analysis found very few to no small metastases in lungs from ZA treated mice. These small metastases, because not present in the amputation model, arise later during the tumor development and represent spontaneous metastases, needing cell migration and invasion to develop. Several studies in mouse models have shown that BPs treatment can inhibit bone metastasis development *in vivo*. Indeed, BPs are now commonly given to prevent bone metastases in many epithelial cancer types (breast, prostate). Preclinical studies reported that BPs may prevent visceral metastases of breast cancer [27] and lung metastases of osteosarcoma [16]. However, no studies have reported a direct effect of ZA on established lung or other visceral metastases. This is probably due to the fact that serum concentrations of ZA are very low, as ZA immediately binds to the bone matrix after injection. Therefore, we can hypothesized that ZA may prevent the metastatic process by itself, but has no effect on the metastases themselves when they are established.

Overt metastases are associated with a poor prognosis in Ewing's sarcoma, but patients without overt metastases frequently harbor micrometastatic disease at presentation. Circulating tumor cells can often be identified in

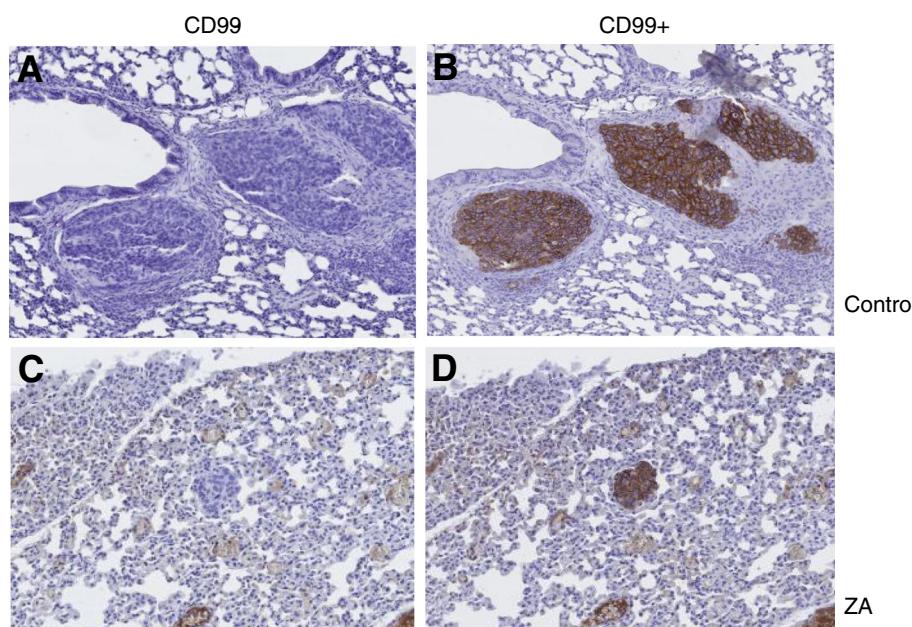


Figure 4 Histological observation of early metastases after intra-tibial injection of A-673 ES cells. **A-B:** control mice treated with PBS; observation 7 days after tumor cell injection (A: CD99-, B: CD99+). **C-D:** ZA treated group: observation 7 days after tumor cell injection (C: CD99-, B: CD99+). The metastatic ES cells appear in brown on the CD99+ staining panels (**B and D**) (all magnitude: $\times 130$).

patients using RT-PCR or flow-cytometry techniques. This suggests that the metastatic potential of Ewing's sarcoma exists at an early stage during tumor development [11] and that a very early event such as the initiating oncogenic event might influence cell proliferation and capacity for metastasis. Ewing's sarcomas are characterized by a specific translocation between the EWS gene and a gene from the ETS family. It appears that the loss of cell adhesion needed to promote tumor cell dissemination might be induced by the EWS/FLI1 oncogene itself rather than via an accumulation of stepwise mutations [28]. Furthermore, cell migration is similarly inhibited by EWS/FLI expression, suggesting that dissemination occurs via a "passive" rather than via an active process that can be observed in epithelial tumors undergoing epithelial to mesenchymal transition [28]. Several studies have also reported that ES cells exhibit an anoikis resistant phenotype [29]. Therefore, it is probably through their exposure to ZA in bone that ES cells invasion potential is altered, even though they continue to disseminate through the loss of adhesion, resulting in a reduction of spontaneous lung metastases.

In conclusion, associated with previous results showing that ZA is able to inhibit primary tumor growth in a bone model of ES, the present results strengthen the therapeutic interest of ZA in Ewing's sarcoma, as ZA could be associated early to chemotherapy for ES patients to prevent ongoing spontaneous metastases dissemination from the existing primary bone tumor.

Abbreviations

BP: Bisphosphonate; ZA: Zoledronic acid; ES: Ewing's sarcoma; MMP: Matrix metalloproteinase.

Competing interests

The authors declare that they have no financial and non-financial competing interests.

Authors' contributions

GAO and P-PK carried out the in vivo studies, the migration and zymography studies, FL participated to the in vivo studies, CC and JA participated to the histology studies, SB participated to the in vivo studies. FG and DH have been involved in revising critically the manuscript for important intellectual content. FR had made substantial contribution to the study conception and design, had been involved in drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Novartis Pharma (Rueil-Malmaison, France), and by the "Liddy Shriver Sarcoma Initiative". The authors wish to thank G. Hamery and Y. Allain for their kind assistance at the animal facility care platform (UTE, Faculté de Médecine, Nantes, France).

This study describes for the first time the therapeutic interest of zoledronic acid as inhibitor of lung metastases in a relevant orthotopic model of Ewing's sarcoma. Complementary *in vitro* assays demonstrate that zoledronic acid inhibits Ewing's sarcoma cell migration. The present results strengthen the therapeutic interest of zoledronic acid in Ewing's sarcoma, as it could be associated early to chemotherapy to prevent ongoing spontaneous metastases dissemination from the existing primary bone tumor.

Author details

¹INSERM, Equipe Ligue Contre le Cancer 2012, UMR-957, Nantes F-44035, France. ²Faculté de Médecine, Laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives, Université de Nantes, EA3822, Nantes F-44035, France. ³Service d'orthopédie, CHU Hôtel Dieu, Nantes F-44035, France. ⁴INSERM UMR957, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44 035, Nantes Cedex 1, France.

Received: 28 June 2013 Accepted: 27 February 2014
Published: 10 March 2014

References

1. Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB Jr: Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: surveillance epidemiology and End results data. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008, 30(6):425–430.
2. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir G: [Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma]. *C R Seances Acad Sci III* 1983, 296(23):1101–1103.
3. Donaldson SS, Torrey M, Link MP, Glicksman A, Gilula L, Laurie F, Manning J, Neff J, Reinus W, Shuster JJ TE: A multidisciplinary study investigating radiotherapy in Ewing's sarcoma: end results of POG #8346. *Pediatric Oncology Group. Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998, 42(1):125–135.
4. Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jurgens HF, Voute PA, Gadner H, Craft AW: Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 2000, 18(17):3108–3114.
5. Craft AW, Cotterill SJ, Bullimore JA, Pearson D: Long-term results from the first UKCCSG Ewing's Tumour Study (ET-1). United Kingdom Children's Cancer Study Group (UKCCSG) and the Medical Research Council Bone Sarcoma Working Party. *Eur J Cancer* 1997, 33(7):1061–1069.
6. Jenkin RD, Al-Fawaz I, Al-Shabanah MO, Allam A, Ayas M, Memon M, Rifai S, Schultz HP: Metastatic Ewing sarcoma/PNET of bone at diagnosis: prognostic factors—a report from Saudi Arabia. *Med Pediatr Oncol* 2001, 37(4):383–389.
7. Meyers PA, Kralo MD, Ladanyi M, Chan KW, Sailer SL, Dickman PS, Baker DL, Davis JH, Gerbing RB, Grovas A, Herzog CE, Lindsley KL, Liu-Mares W, Nachman JB, Sieger L, Wadman J, Gorlick RG: High-dose melphalan, etoposide, total-body irradiation, and autologous stem-cell reconstitution as consolidation therapy for high-risk Ewing's sarcoma does not improve prognosis. *J Clin Oncol* 2001, 19(11):2812–2820.
8. Paulussen M, Ahrens S, Burdach S, Craft A, Dockhorn-Dworniczak B, Dunst J, Frohlich B, Winkelmann W, Zoubek A, Jurgens H: Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies. *Ann Oncol* 1998, 9(3):275–281.
9. Kushner BH, Meyers PA, Gerald WL, Healey JH, La Quaglia MP, Boland P, Wollner N, Casper ES, Aledo A, Heller G, Schwartz GK, Bonilla MA, Lindsley KL, Merchant TE, Rosenfield NS, Abramson SJ, Cheung N-KV: Very-high-dose short-term chemotherapy for poor-risk peripheral primitive neuroectodermal tumors, including Ewing's sarcoma, in children and young adults. *J Clin Oncol* 1995, 13(11):2796–2804.
10. Dahlin DC, Coventry MB, Scanlon PW: Ewing's Sarcoma : a critical analysis of 165 cases. *J Bone Joint Surg Am* 1961, 43(2):185–192.
11. Schleiermacher G, Peter M, Oberlin O, Philip T, Rubie H, Mechinaud F, Sommelet-Olive D, Landman-Parker J, Bouris D, Michon J, Delattre O, Société Française d'Oncologie Pédiatrique: Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized ewing tumor. *J Clin Oncol* 2003, 21(1):85–91.
12. Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA: Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone* 1996, 19(3):281–290.
13. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, Golub E, Rodan GA: Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991, 88(6):2095–2105.
14. Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann MF, Coipeau P, Charrier C, Couillaud S, Thiery JP, Gouin F, Redini F: Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 2005, 37(1):74–86.
15. Coleman RE: Risks and benefits of bisphosphonates. *Br J Cancer* 2008, 98(11):1736–1740.
16. Ory B, Heymann MF, Kamijo A, Gouin F, Heymann D, Redini F: Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* 2005, 104(11):2522–2529.
17. Heymann D, Ory B, Gouin F, Green JR, Redini F: Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors. *Trends Mol Med* 2004, 10(7):337–343.
18. Odri GA, Dumoucel S, Picarda G, Battaglia S, Lamoureux F, Corradini N, Rousseau J, Tirode F, Laud K, Delattre O, Gouin F, Heymann D, Redini F: Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. *Cancer Res* 2010, 70(19):7610–7619.
19. Marten A, Lilienfeld-Toal M, Buchler MW, Schmidt J: Zoledronic acid has direct antiproliferative and antimetastatic effect on pancreatic carcinoma cells and acts as an antigen for delta2 gamma/delta T cells. *J Immunother* 2007, 30(4):370–377.
20. Kubista B, Trieb K, Sevelda F, Toma C, Arrich F, Heffeter P, Elbling L, Sutterlüty H, Scotlandi K, Kotz R, Micksche M, Berger W: Anticancer effects of zoledronic acid against human osteosarcoma cells. *J Orthop Res* 2006, 24(6):1145–1152.
21. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaisse JM, Clezardin P: Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* 2000, 60(11):2949–2954.
22. Walter C, Pabst A, Ziebart T, Klein M, Al-Nawas B: Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral Dis* 2011, 17(2):194–199.
23. Wu L, Zhu L, Shi WH, Zhang J, Ma D, Yu B: Zoledronate inhibits the proliferation, adhesion and migration of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2009, 602(1):124–131.
24. Scotlandi K, Benini S, Manara MC, Serra M, Nanni P, Lollini PL, Nicoletti G, Landuzzi L, Chano T, Picci P, Baldini N: Murine model for skeletal metastases of Ewing's sarcoma. *J Orthop Res* 2000, 18(6):959–966.
25. Wolfe TD, Pillai SP, Hildreth BE 3rd, Lanigan LG, Martin CK, Werbeck JL, Rosol TJ: Effect of zoledronic acid and amputation on bone invasion and lung metastasis of canine osteosarcoma in nude mice. *Clin Exp Metastasis* 2011, 28(4):377–389.
26. Endo-Munoz L, Cumming A, Rickwood D, Wilson D, Cueva C, Ng C, Strutton G, Cassidy Al, Evdokiou A, Sommerville S, Dickinson I, Guminski A, Saunders NA: Loss of osteoclasts contributes to development of osteosarcoma pulmonary metastases. *Cancer Res* 2010, 70(18):7063–7072.
27. Hiraga T, Williams PJ, Ueda A, Tamura D, Yoneda T: Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. *Clin Cancer Res* 2004, 10(13):4559–4567.
28. Chaturvedi A, Hoffman LM, Welm AL, Lessnick SL, Beckerle MC: The EWS/FLI oncogene drives changes in cellular morphology, adhesion, and migration in Ewing sarcoma. *Genes Cancer* 2012, 3(2):102–116.
29. Strauss SJ, Ng T, Mendoza-Naranjo A, Whelan J, Sorensen PH: Understanding micrometastatic disease and Anoikis resistance in ewing family of tumors and osteosarcoma. *Oncologist* 2010, 15(6):627–635.

doi:10.1186/1471-2407-14-169

Cite this article as: Odri et al.: Zoledronic acid inhibits pulmonary metastasis dissemination in a preclinical model of Ewing's sarcoma via inhibition of cell migration. *BMC Cancer* 2014 14:169.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



III- Complément de discussion de l'article 2

Dans cette étude, nous avons observé une inhibition de l'invasion des cellules de SE par le ZOL, par inhibition de l'activité des MMP. Il n'a pas été déterminé s'il s'agissait d'une inhibition de la production de l'enzyme ou d'une altération de leur fonction, soit par modification post transcriptionnelle, soit par chélation du zinc comme décrit précédemment²⁰⁴. Dans notre étude, les expériences sur l'invasion cellulaire étaient réalisées en l'absence de ZOL dans le milieu, excluant la possibilité d'une chélation du zinc²⁰⁴. Les cellules tumorales traitées présentaient une inhibition de l'invasion même en l'absence de ZOL, ce qui exclut également un effet cytotoxique sur les cellules au moment du test d'invasion. Ainsi, soit le ZOL était toujours présent dans les cellules et continuait à exercer son action au moment du test d'invasion, soit l'action du ZOL était durable dans le temps et se maintenait même en l'absence de ZOL. Cependant, comme décrit précédemment, les cellules au sein d'une même lignée peuvent avoir des sensibilités différentes au ZOL, et lors du prétraitement par le ZOL, une partie des cellules étaient éliminées par effet cytotoxique et les cellules restantes, utilisées pour le test d'invasion, étaient soit des cellules ne pouvant effectuer la migration car bloquées dans le cycle cellulaire par effet cytostatique du ZOL, soit des cellules n'ayant pas eu d'effet du ZOL et accomplissant l'invasion. La zymographie étudiant l'activité des MMP permet cependant d'observer une diminution de l'activité de ces enzymes essentielles à l'invasion prouvant un effet du ZOL sur l'invasion cellulaire ne passant pas par un effet cytotoxique ou cytostatique.

In-vivo, nous n'avons pas observé d'effet du ZOL sur des métastases expérimentales déjà installées. Ceci est en accord avec l'absence d'effet du ZOL sur les modèles intramusculaires de SE décrit dans la partie I. Ainsi, dans ce modèle de SE, le ZOL n'a pas d'effet cytotoxique sur les cellules tumorales en dehors de l'os. Le pic de concentration plasmatique était cependant probablement plus faible dans notre modèle comme décrit dans la partie 1 en raison de l'injection sous cutanée du ZOL, limitant ainsi l'effet direct potentiel dans les tissus non osseux.

Nous avons observé une inhibition du développement de métastases spontanées dans un modèle sensible et dans un modèle résistant. Il est difficile cependant de déterminer le mécanisme en cause car il peut s'agir de l'inhibition directe de la prolifération ou de l'invasion des cellules tumorales, ou de phénomènes indirects passant par l'inhibition de l'angiogenèse, de la résorption osseuse ou par modulation de l'immunité. Dans d'autres études portant sur l'inhibition de la migration et de l'invasion par le ZOL, il était observé un effet direct sur les cellules tumorales *in-vitro* pour des doses très faibles bien en dessous des doses cytotoxiques. Il est donc possible que toutes les lignées utilisées dans cette étude soient sensibles *in-vivo* concernant l'inhibition de l'invasion aux doses testées, même si la concentration obtenue n'est pas suffisante pour être cytotoxique. Il peut également s'agir d'un mécanisme indirect, par exemple par chélation du zinc dans le tissu intéressé comme décrit par Boissier et al²⁰⁴. De même, l'inhibition de l'ostéolyse peut diminuer les espaces libres entre les travées pour le développement de vaisseaux sanguins, et s'associer à l'inhibition de l'angiogenèse induite par le ZOL pour empêcher le phénomène métastatique.

Un certain nombre de patients se présentent avec des métastases osseuses d'emblée et leur pronostic est de moins 10% à 5 ans. La présence de métastases osseuses peut être un phénomène métastatique secondaire aux métastases pulmonaires, mais aussi un phénomène synchrone car certains patients atteints de SE se présentent d'emblée avec des cellules tumorales disséminées dans les poumons et dans l'os alors que la tumeur primitive est encore de faible volume. Dans certaines études précliniques et cliniques s'intéressant à d'autres pathologies tumorales, le ZOL inhibe l'apparition de métastases osseuses. On pourrait ainsi s'attendre à observer le même effet dans le SE. Cependant, nous n'avons pas étudié l'effet du ZOL sur d'autres sites métastatiques dans le SE en l'absence de modèle fiable. Nous avons développé un modèle par injection de cellules tumorales en intracardiaque, mais la proportion de souris développant des métastases osseuses était trop faible pour que ce modèle puisse être utilisé dans un essai comparatif avec le ZOL. De même, nous avons tenté de développer d'autres modèles en réalisant des injections rétro-orbitaires ou dans la veine de

la queue, mais ces modèles présentaient l'inconvénient de développer une tumeur au site d'injection, dont la croissance rapide ne permettait pas une survie suffisante de la souris pour observer les métastases osseuses.

En conclusion, le phénomène métastatique est un phénomène précoce dans le SE et l'utilisation du ZOL dès le diagnostic pourrait permettre de limiter la présence de cellules tumorales circulantes et donc des métastases, pulmonaires, osseuses ou autres, quelle que soit la sensibilité de la tumeur au ZOL.

Conclusions et perspectives

Le SE est la deuxième tumeur osseuse primitive par ordre de fréquence chez l'enfant et l'adolescent avec un pic d'incidence autour de 15 ans. Nous avons vu que les protocoles de chimiothérapie récents (Euro Ewing 99), permettent une survie sans maladie à 3 ans de 75 à 80% en cas de bon pronostic, et de moins de 30% en cas de métastases multiples. Le pronostic reste donc relativement stable depuis les premiers essais de chimiothérapie dans les années 1970²²⁴. Les différents protocoles qui ont suivi ont permis d'optimiser la chimiothérapie en fonction des facteurs pronostics et de limiter les effets secondaires^{225,226}. Les molécules utilisées dans ces chimiothérapies sont des agents classiques utilisés dans de nombreux types tumoraux en raison de leur toxicité cellulaire universelle, à l'origine d'effets secondaires parfois extrêmes pouvant conduire au décès du patient. L'objectif de ces 2 dernières décennies, porté par les progrès de la biologie moléculaire et de la génétique, a été de développer des traitements ciblant des mécanismes clés du développement tumoral. L'étude de ces mécanismes a permis de déterminer des protéines cibles, mais aussi de comprendre l'importance que joue l'environnement tissulaire de la tumeur pour son développement, notamment dans le processus métastatique. Ainsi, bien que la plupart des nouvelles molécules tentent de cibler la cellule tumorale directement, d'autres ciblent l'environnement dans lequel se développe la tumeur. Le SE osseux possède 2 particularités : il présente toujours une translocation chromosomique à l'origine d'un facteur de transcription aberrant conférant à lui seul le phénotype tumoral, et il s'agit d'une tumeur osseuse primitive. Ainsi, la modification de l'environnement osseux des tumeurs, en utilisant des molécules développées pour traiter d'autres pathologies osseuses telle que l'ostéoporose tels que les BP, a été beaucoup étudiée dans le cadre des métastases osseuses des cancers solides ou dans le myélome multiple, notamment pour limiter la morbidité liée à ces lésions. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'utilisation du BP le

plus puissant à ce jour, le ZOL, pour modifier l'environnement tumoral du SE et influer sur son développement.

En raison de nombreuses études décrivant un effet direct du ZOL sur des lignées de cellules tumorales, nous avons commencé par déterminer s'il pouvait avoir, en plus de l'effet recherché sur l'environnement osseux, un effet direct sur les cellules de SE. Nous avons trouvé un effet direct *in-vitro* du ZOL sur différentes lignées de SE. Cet effet est dose dépendant et variable d'une lignée à l'autre, certaines lignées étant plus sensibles que d'autres. Ainsi le ZOL inhibe la prolifération cellulaire, avec accumulation de cellules à la transition S-G2/M et une augmentation de l'apoptose. Le ZOL diminuait également la capacité d'invasion des cellules de SE *in-vitro* en diminuant l'activité des MMP.

Ainsi, nous avons trouvé les mêmes effets que ceux décrits dans d'autres lignées dans la littérature. Nous connaissons les limites des expériences *in-vitro* et la difficulté d'extrapoler les résultats dans un modèle *in-vivo* en raison de nombreuses interactions possibles. En effet, il est difficile de déterminer si les cellules sont exposées à une concentration suffisante *in-vivo* pour obtenir un effet sur la prolifération cellulaire. De plus, les lignées utilisées sont des lignées parfois anciennes (années 70 pour A673), extraites de patients présentant une pathologie souvent évoluée et métastatique, ayant pu progressivement dévier génétiquement de la tumeur, ou même ayant adapté leur phénotype à la prolifération *in-vitro*. Il est donc difficile de déterminer exactement le comportement d'une cellule tumorale au sein de la tumeur *in-vivo* à partir de données *in-vitro*. Ainsi, il a été observé de nombreux écarts entre les effets *in-vitro* et *in-vivo* (modèles animaux ou études cliniques) du ZOL dans de nombreuses autres pathologies tumorales, la plupart des lignées étant sensibles *in-vitro*, mais avec un effet variable *in-vivo*. Cependant, l'absence d'effet *in-vitro* observé du ZOL sur des lignées non tumorales en dehors des ostéoclastes permet d'émettre l'hypothèse que le

ZOL peut cibler spécifiquement les cellules tumorales sans atteinte des tissus sains *in-vivo*, ce que ne permettent pas les agents de chimiothérapie classique.

Pour déterminer l'effet potentiel du ZOL sur le développement de SE *in-vivo*, nous avons développé des modèles murins consistant en l'injection de cellules tumorales humaines dans des souris Nude athymiques, soit en intramusculaire, soit en intraosseux. Nous n'avons pas observé d'effet du ZOL seul sur un modèle intramusculaire, mais son association avec un agent de chimiothérapie classique a permis d'améliorer l'efficacité de celle-ci. Dans le modèle intraosseux, le ZOL a permis un ralentissement de la progression tumorale dans un modèle sensible, mais pas dans un modèle résistant, évoquant ainsi un mécanisme direct du ZOL *in-vivo* sur les cellules tumorales. Les différents protocoles utilisés n'ont pas permis de déterminer une dose optimale, mais il semble que l'injection de doses répétées présente des effets supérieurs à une seule dose, comme rapporté dans la littérature dans d'autres pathologies tumorales.

L'analyse des étapes précoces du développement de la tumeur dans l'os a permis d'observer les étapes du développement initial intraosseux de la tumeur, la chronologie de l'ostéolyse, et des mécanismes d'extensions aux parties molles adjacentes. L'utilisation du ZOL permet de protéger de l'ostéolyse tumorale et ralentir la propagation des cellules tumorales dans les parties molles adjacentes dans un modèle sensible. Malgré l'inhibition de l'ostéolyse, le ZOL n'a pas permis de ralentir l'extension des cellules tumorales aux parties molles adjacentes dans un modèle résistant, soit parce que le ZOL n'a pas d'effet direct sur ces cellules, soit parce que ces cellules ne sont pas dépendantes de l'ostéolyse tumorale. Les différents modèles utilisés, intramusculaires, intraosseux mais également rétro-orbitaires, intracardiaques, sous cutanés, par injection dans la veine de la queue ainsi que le développement de métastases pulmonaires, montrent que ces lignées peuvent se développer très rapidement dans tous les tissus, et que leur développement ne nécessite pas d'ostéolyse associée. Les limites déjà évoquées, concernant le type de cellules utilisées et le modèle

peuvent expliquer cette dissociation entre ostéolyse et développement tumoral. De nombreuses études observent une interdépendance entre l'ostéolyse et le développement tumoral dans différentes pathologies, et surtout dans les processus métastatiques osseux. Cette dépendance n'a jamais été démontrée dans le SE, et l'existence de SE extraosseux, présentant les mêmes caractéristiques chromosomiques que le SE intraosseux tend à montrer que cette ostéolyse n'est pas fondamentale pour le développement de la tumeur.

En ce qui concerne le développement des métastases pulmonaires, le ZOL ne présentait pas d'effet sur les métastases pulmonaires déjà installées. Ainsi, cela est en accord avec l'absence d'efficacité observée dans le modèle intramusculaire, le ZOL n'ayant pas d'effet en dehors du tissu osseux. Par contre il présentait un effet sur l'apparition de nouvelles métastases dans les modèles sensible et résistant. Dans la littérature, les effets directs du ZOL sur la migration et l'invasion de nombreuses lignées tumorales ont été observés pour des concentrations très faibles, très inférieures à celles nécessaires pour observer un effet cytostatique ou cytotoxique. De même, l'inhibition de l'ostéolyse et de l'angiogenèse a pu contribuer à cette inhibition de l'apparition de nouvelles métastases.

Une des difficultés rencontrées dans l'ensemble de ces expériences est la variabilité des résultats observés d'une expérience à l'autre malgré leur standardisation. Bien que le type d'effet observé était toujours le même, leur intensité pouvait changer malgré la standardisation des protocoles. Comme décrit précédemment, dans les études *in-vitro*, cette variabilité peut être le reflet de clones présentant des sensibilités variables au ZOL au sein d'une même lignée. Dans les expériences *in-vivo*, la cinétique de croissance tumorale dépendait de deux facteurs : 1) au nombre de cellules initialement injectées et 2) au fond génétique des souris utilisées, celles-ci n'étant pas des clones génétiquement identiques. Une expérience portant sur la modulation du nombre de cellules injectées en intraosseux a permis d'observer un ralentissement de la cinétique de développement

tumoral par diminution du nombre de cellules injectées. En dessous d'un certain seuil (100 000 cellules), aucune souris ne développait de tumeur, indiquant que l'ensemble des cellules étaient mortes. Ainsi, sur 1 million de cellules injectées initialement, il est difficile de dire le nombre de cellules vivantes et actives présentent dans l'os au départ puisqu'une partie de ces cellules meurent, une autre partie part sous forme d'emboles dans la circulation. Pour standardiser le nombre de cellules injectées dans le modèle intraosseux, plusieurs étapes ont été identifiées pouvant expliquer la variabilité observée. La qualité du geste technique était essentielle, car comme nous l'avons vu, l'injection intraosseuse pouvait en fait être extraosseuse et induire le développement d'une tumeur extraosseuse. Nous avons ensuite cherché à diminuer le phénomène d'embolisation. Ces emboles étaient liés au niveau d'anesthésie des souris lors de l'injection, celles étant plus anesthésierées présentaient plus de risque de mort par embolie pulmonaire, probablement en raison d'une vasodilatation accrue par l'anesthésie, mais aussi au volume et donc à la quantité de cellules injectées, le souris recevant un plus gros volume ayant plus de risque de mourir d'embolie. Cependant, certains facteurs n'étaient pas contrôlables, tels que la qualité des cellules injectées et la quantité de cellules partant dans la circulation sous formes d'emboles.

Ainsi, malgré les limites décrites et les variabilités observées inhérentes aux modèles utilisés, nous avons constaté des effets concordants d'une expérience à l'autre du ZOL sur le SE, *in-vitro* et *in-vivo*, sans pouvoir les quantifier précisément. Ces résultats précliniques favorables posent donc la question de l'intérêt de l'utilisation clinique du ZOL comme nouvel agent thérapeutique dans le SE.

Le ZOL est un traitement déjà administré dans d'autres pathologies tumorales avec des effets variables selon le type de tumeur. Dans toutes les études cliniques, le ZOL permet de diminuer la morbidité osseuse (douleurs et fractures) liée à l'ostéolyse dans les métastases de tumeurs solides et dans le myélome¹⁴¹⁻¹⁴⁸, mais aussi lié à la chimiothérapie et à l'hormonothérapie¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Le traitement par ZOL a également permis de diminuer l'apparition de nouvelles métastases osseuses et viscérales

de cancers du sein métastatique ou non, de myélome et même dans d'autres tumeurs solides¹⁵²⁻¹⁵⁵. Cet effet n'était pas retrouvé pour le cancer de la prostate¹⁵⁶. Les effets sur la survie sont variables, permettant une amélioration dans certaines études sur le cancer du sein, le myélome et de cancer du rein^{154,160,163,165}, n'apportant aucun bénéfice dans d'autres études sur le cancer du sein ou du poumon^{157-159,164}. L'ensemble de ces études cliniques ont été précédées d'études précliniques montrant une efficacité du ZOL *in-vitro* et *in-vivo*.

Ces études cliniques ont également permis de déterminer la tolérance et la toxicité du ZOL. Les effets secondaires les plus sévères liés à l'utilisation du ZOL sont de 3 types : l'hypocalcémie, l'ostéonécrose mandibulaire et la toxicité rénale. L'hypocalcémie transitoire est observée chez 6% des patients traités par le ZOL. Celle-ci peut être évitée par supplémentation en calcium et en vitamine D des patients traités²²⁷. L'ostéonécrose mandibulaire liée au ZOL a été décrite en 2003 et survient dans environ 1,3% des patients traités²²⁸. Des facteurs de risques ont été identifiés et des stratégies efficaces ont été élaborées pour en diminuer l'incidence^{229,230}. La toxicité rénale peut aller d'une simple altération de la fonction rénale (chez 15% des patients), à la détérioration aboutissant à une insuffisance rénale terminale. Ainsi, le ZOL n'est pas recommandé en dessous d'une clearance de la créatinine inférieure à 30ml/mn, et un suivi biologique doit être effectué en cas de clearance entre 30 et 60ml/mn. Ceci peut constituer un problème chez les patients recevant d'autres agents de chimiothérapie pouvant également altérer la fonction rénale.

Ainsi, le ZOL est une molécule déjà bien connue, utilisée avec efficacité pour réduire la morbidité osseuse liée aux métastases, pour diminuer l'apparition de nouvelles métastases osseuses et viscérales et améliorer la survie dans certains types de cancer. Les effets indésirables liés à son utilisation sont connus et peuvent être prévenus par des mesures adéquates et il est donc disponible immédiatement pour réaliser un essai clinique de phase III dans le SE. L'ensemble des résultats précliniques exposés dans cette étude permettent d'espérer un effet sur la morbidité osseuse

(douleurs et fractures pathologiques) et sur l'apparition de métastases pulmonaires. Les effets attendus sur la tumeur primitive et la survie sont incertains car il semble que la sensibilité des cellules tumorales soit déterminante pour observer un effet cytotoxique sur la tumeur primitive. D'autres effets non observés en raison des limites décrites des modèles utilisés peuvent être attendus chez les patients, notamment un effet direct supérieur sur la tumeur primitive lié à l'injection intraveineuse du ZOL chez les patients, permettant ainsi une plus forte concentration plasmatique que celle obtenue dans notre étude, de même qu'une stimulation de l'immunité, décrite dans d'autres tumeurs mais non testable dans notre modèle en raison de l'absence d'immunité cellulaire chez les souris utilisées. L'ensemble des patients présentant un SE pourrait ainsi bénéficier du ZOL pour diminuer la morbidité osseuse, mais il semble qu'une introduction la plus précoce possible chez des patients porteurs d'une tumeur non métastatique permettrait de limiter le processus métastatique. La dose nécessaire est difficile à évaluer, mais une dose de 100µg/kg toute les 4 semaines est la dose la plus souvent utilisée dans les différents protocoles. Dans le protocole OS2006, la dose est de 50µg/kg en dessous de 18 ans, et de 4mg après 25 ans, 4 injections préopératoires et 6 en postopératoire. Ainsi, en accord avec les résultats observés, une administration répétée de fortes doses semble supérieure à une seule administration. Le protocole OS2006 a été débuté en avril 2007 avec un total de 470 patients prévus et a pour but d'évaluer l'efficacité de l'adjonction du ZOL au traitement classique, associant chimiothérapie et chirurgie. Cet essai vient tout juste d'être arrêté récemment pour absence d'efficacité. Dans les études précliniques s'intéressant au ZOL dans l'ostéosarcome, il avait été montré des effets prometteurs in-vitro sur les lignées cellulaires d'ostéosarcome, et in-vivo sur le développement tumoral, l'incidence des métastases pulmonaires et la survie des souris. L'ostéosarcome est une tumeur qui produit de l'os dans la plupart des cas, alors que le SE est ostéolytique, ce qui permet d'émettre l'hypothèse d'une efficacité accrue du ZOL dans le SE. Fin 2013 a débuté le protocole EuroEWING 2012 dans lequel le ZOL a été inclus dans la randomisation en postopératoire. Cet essai doit inclure 600 patients jusqu'en 2025.

La meilleure compréhension des mécanismes d'action du ZOL *in-vitro* permettra de définir les étapes clés limitantes à son passage intracellulaire et à sa toxicité, et d'élaborer de nouvelles molécules pouvant contourner ces étapes ou d'associer des molécules sensibilisatrices au traitement par le ZOL. Ainsi, l'étude de la résistance spontanée observée n'a pas permis d'identifier les mécanismes impliqués. Il serait intéressant d'induire une résistance dans des lignées de SE pour déterminer si elle est dépendante de la FPPS. L'internalisation du ZOL et son passage intracytoplasmique peuvent aussi être limitants. Il a été évoqué qu'une possible interaction avec les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ permettait son passage intracellulaire. Ainsi la résistance spontanée observée peut être le fait d'une internalisation diminuée, ou d'un rejet du ZOL par un phénomène de résistance multiple aux drogues (MDR).

Les résultats des études *in-vivo* indiquent la nécessité d'une meilleure compréhension des relations entre cellules tumorales et ostéolyse dans notre modèle. Il serait intéressant de tester l'effet sur la progression tumorale dans un modèle sensible d'un bisphosphonate dénué d'effet direct sur les cellules de SE mais conservant ses capacités anti-ostéoclastiques. Ainsi, en cas de disparition de l'effet inhibiteur, cela indiquerait un effet direct du ZOL *in vivo* et une dissociation entre ostéolyse et progression tumorale. En cas de persistance de l'effet, cela indiquerait une variabilité des différentes lignées dans leurs sensibilités à l'ostéolyse tumorale.

En dehors de la tumeur primitive et de sa morbidité locale, c'est le processus métastatique qui conduit dans plus de 90% des cas au décès du patient. Dans cette étude, l'effet du ZOL sur le processus métastatique était présent dans les modèles sensibles et résistants et des essais précliniques de thérapies combinées anti-métastatiques (antiangiogéniques, inhibiteurs des métalloprotéinases) permettrait d'étudier la possibilité d'un effet additif voir synergique sur le développement de métastases pulmonaires.

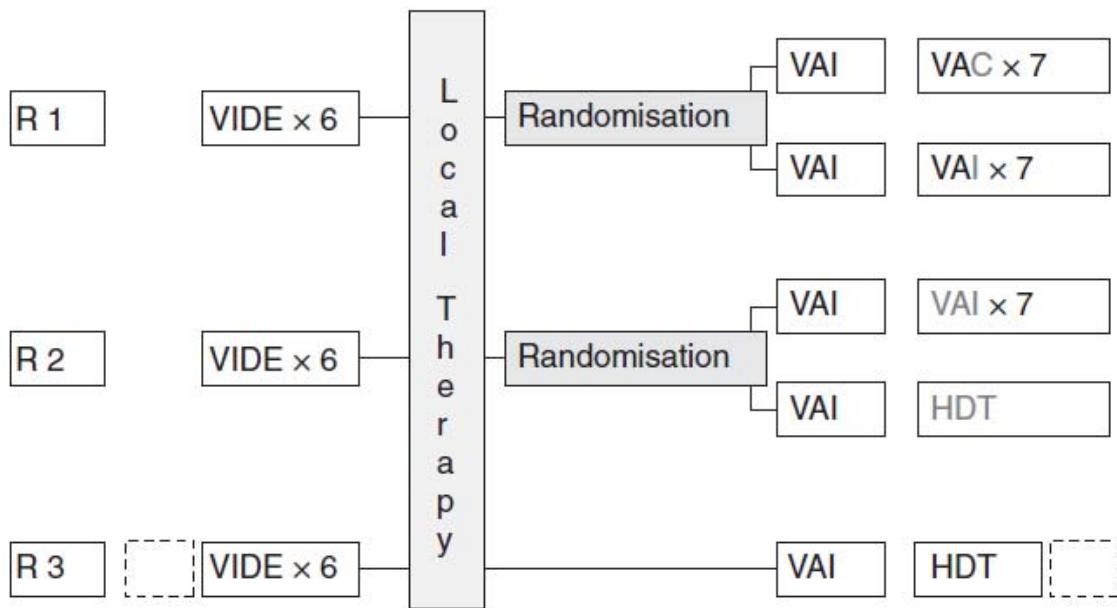
D'autres thérapeutiques antirésorptives ont été développées récemment, et les résultats des premières études comparatives avec le ZOL ont été publiés. Ainsi, pour inhiber la résorption

osseuse, un anticorps monoclonal (IgG2) humain ciblant spécifiquement le RANKL a été développée : le Dénosumab. Le RANKL est une protéine produite par les ostéoblastes pour stimuler la différenciation et l'activation ostéoclastique (figure 11). Le Dénosumab s'est révélé être supérieur au ZOL pour diminuer la morbidité osseuse dans le cancer du sein²³¹, de la prostate²³², dans le myélome et dans d'autres tumeurs solides²³³. Dans une méta-analyse récente, par rapport au ZOL, le Dénosumab permettait un allongement significatif du délai d'apparition de la morbidité osseuse (27,7 mois vs 19,5 mois), sans présenter de différence sur la progression tumorale²³⁴. De plus, il n'y avait pas de différence concernant l'incidence d'ostéonécrose de la mandibule, une absence d'atteinte rénale permettant de s'affranchir d'une surveillance de la fonction glomérulaire et une diminution des réactions aigues lors de l'administration. Il était cependant observé une augmentation des incidences d'hypocalcémies sévères. En analysant le sous groupe de patients atteints de cancers du poumon, l'utilisation du Dénosumab était associé à une amélioration significative de la survie de 1,2 mois dans tous les sous types histologiques, de même que chez les patients présentant des métastases viscérales²³⁵. Des études précliniques observent des effets directs du Dénosumab sur les cellules tumorales in-vitro, montrant une autre fonction possible du couple RANK/RANKL²³⁶. Cependant, il ne semble pas avoir d'effet antiangiogénique comme décrit avec le ZOL²³⁷. Aucune étude n'a été effectuée sur sa capacité à inhiber la migration et l'invasion. Ainsi, le Dénosumab est supérieur au ZOL pour diminuer la morbidité osseuse dans tous les types tumoraux étudiés et semble améliorer la survie dans le cancer du poumon. Aucune étude n'a été publiée à ce jour évaluant l'effet *in-vitro* et *in-vivo* du Dénosumab dans le SE.

Une étude permettant une meilleure compréhension des mécanismes d'action et de résistance du ZOL in-vitro, et de la relation entre développement tumoral et ostéolyse doit être engagée afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le SE. Des essais précliniques portant sur l'association de thérapies ciblées sur le processus métastatique, et sur le Dénosumab permettront d'établir un rationnel pour d'éventuels essais cliniques ultérieurs.

Annexes

Annexe 1 : protocole Euro Ewing 99



Annexe 2: article de synthèse sur les nouvelles options thérapeutiques dans le SE et l'intérêt de cibler l'ostéolyse tumorale.

EXPERT OPINION

1. Background
2. Medical need
3. Existing treatments
4. Market review for chemotherapy and targeted therapy in cancer
5. Current research goals
6. Scientific rationale for targeting bone microenvironment
7. Conclusion
8. Expert opinion

Drugs targeting the bone microenvironment: new therapeutic tools in Ewing's sarcoma?

Francoise Redini[†], Guillaume A Odri, Gaëlle Picarda, Nathalie Gaspar, Marie-Françoise Heymann, Nadege Corradini & Dominique Heymann

[†]INSERM, UMR957, Equipe Ligue Contre le Cancer, Nantes, France

Introduction: Ewing's sarcoma (ES) is the second most frequent malignant primary bone tumour in children, adolescents and young adults. The overall survival is 60 – 70% at 5 years but still very poor for patients with metastases, disease relapse or for those not responding to chemotherapy. For these high risk patients, new therapeutic approaches are needed beyond conventional therapies (chemotherapy, surgery and radiation) such as targeted therapies.

Areas covered: Transcriptomic and genomic analyses in ES have revealed alterations in genes that control signalling pathways involved in many other cancer types. To set up more specific approaches, it is reasonable to think that the particular microenvironment of these bone tumours is essential for their initiation and progression, including in ES. To support this hypothesis, preclinical studies using drugs targeting bone cells (bisphosphonate zoledronate, anti-receptor activator of NF-κB ligand strategies) showed promising results in animal models. This review will discuss the new targeted therapeutic options in ES, focusing more particularly on the ones modulating the bone microenvironment.

Expert opinion: Targeting the microenvironment represents a new option for patients with ES. The proof-of-concept has been demonstrated in preclinical studies using relevant animal models, especially for zoledronate, which induced a strong inhibition of tumour progression in an orthotopic bone model.

Keywords: bisphosphonates, bone resorption, Ewing's sarcoma, receptor activator of NF-κB ligand, tumour microenvironment

Expert Opin. Emerging Drugs (2013) 18(3):339-352

1. Background

Ewing's sarcoma (ES), first described by James Ewing, is a high-grade neoplasm and represents the second most common primary bone malignancy in both children and adults [1]. With a peak incidence at 15 years, this disease accounts for 2% of childhood cancers [2]. ES is defined as a bone tumour which may occur at any site within the skeleton but preferentially affects the trunk and the diaphysis of long bones [3]. Less commonly, it arises in extraskeletal soft tissues (15%). It is characterised by a rapid tumour growth and extensive bone destruction that can result in bone pain and pathological fracture [4]. At histological level, ES appears as small, poorly differentiated, round tumour cells (Figure 1) positive for CD99 staining [5].

Ewing's tumours are characterised by the occurrence of a typical chromosomal translocation arising in cells from mesenchymal origin [6] that fuses the EWS gene on chromosome 22q12 to a member of the erythroblast transformation sequence (ETS) transcription gene family, most commonly Fli-1, on 11q24 in 85% of cases [7,8]. This translocation leads to the production of the oncogenic fusion gene

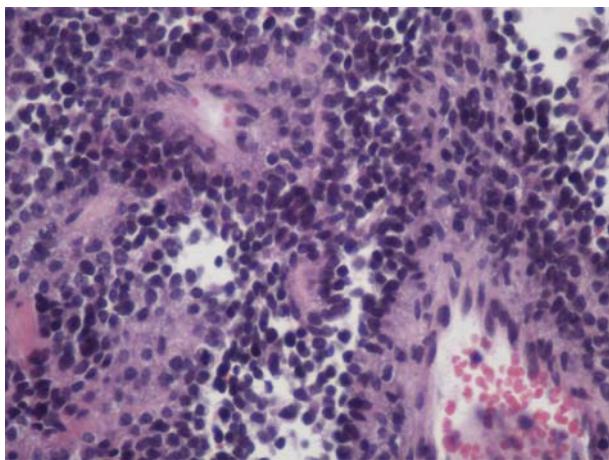


Figure 1. Classical histology of ES tumours (haematoxylin and eosin staining) characterised by small round cells (magnitude: $\times 40$).

EWS-FLI1, an aberrant transcription factor that promotes tumourigenicity [9–11]. Recently, a new fusion was observed between BCOR (encoding the BCL6 co-receptor) and CCNB3 (encoding the testis-specific cyclin B3) on the X chromosome in individuals diagnosed with small round cell tumours of bone, possibly ES, but which lack the canonical EWSR1-ETS translocation [12]. Numerous biological pathways such as those involving insulin-like growth factor receptor, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), Sonic Hedgehog (SHH) pathway activation, Wnt, transforming growth factor- β (TGF) receptor II pathway inhibition are modulated by *EWS-FLI1* activity leading to proliferation, angiogenesis, immune system escape, metastatic potential and treatment resistance that contribute to the ES malignant phenotype [13].

2. Medical need

The existing treatments for ES patients are not effective enough especially for patients with disease relapse because they are resistant to conventional chemotherapy or for patients with metastatic disease. Moreover, the current survival rate (around 70% at 5 years for localised disease and < 30% for high risk patients) have not evolved since three decades. In addition, even for the good responders, the current treatments induce much adverse side effects. For all these reasons, there is an urgent need to define new therapeutic targets for ES patients, and besides the tumour cells themselves, targeting the bone tumour microenvironment appears to be promising.

3. Existing treatments

Before the 1980s, amputation was the only therapeutic option with a 5 years survival of < 20%. Introduction of chemotherapy in the 1970s has incredibly modified their prognostic

with the 5 years event-free survival (EFS) rate of localised tumours being around 65% and overall survival rate close to 75%. However, the survival rates decrease to 15 – 25% when metastases are detected at diagnosis or for patients presenting resistance to treatment or relapsed disease. Moreover, a survival plateau seems to have been reached for the past three decades with conventional therapies [14].

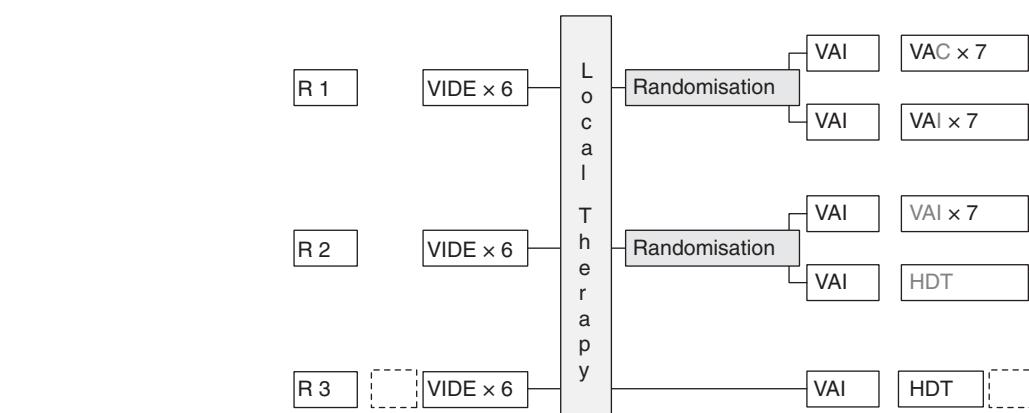
The improvement of poly-chemotherapy allowed more limited surgery with limb salvage, but in about 20% of cases, bone sarcomas have already disseminated at the time of diagnosis. The site of distant metastases is most often lungs, then the skeleton. Although ES patients with lung metastases have an overall survival of 45% at 5 years, those with bone or bone marrow metastases have very poor prognosis with < 25% overall survival at 5 years. In the past, when therapy was limited to local control (surgery), nearly all those patients who initially appeared to have a localised tumour developed distant metastases. ES thus has to be considered as a systemic disease, requiring systemic treatment, that is, combination chemotherapy, as a rule. However, systemic therapy can never replace definitive local control by surgery and/or radiotherapy. The therapy of ES, therefore, requires a combination of surgery, high-intensity chemotherapy and radiotherapy. The currently active protocol for Ewing's tumours is the European Ewing Tumour Working Initiative of National Groups 99 protocol (EuroEWING99). It consists in combination of chemotherapy with or without peripheral stem cell transplantation, radiation therapy and/or surgery (Figure 2).

3.1 Surgery

In Ewing's tumours, radical local treatment is also associated with a favourable prognosis. Appropriate surgical excision with tumour-free margins has been shown to be an important prognostic factor (Table 1) [15]. However, response to chemotherapy is also of considerable prognostic relevance, and tumours which cannot be completely removed may receive additional radiotherapy for better satisfactory local control [15]. Definitive surgery ought to be given following neoadjuvant chemotherapy for two main reasons: i) tumour resection will be better when following pre-operative chemotherapy which limits tumour development and allows the surgeons to remove the primary tumour without mutilating surgery; ii) the relevant histological response can thus be assessed to set up the optimal post-operative treatment strategy (Table 2). To date, this histological response to neoadjuvant chemotherapy has proven to be the most important prognostic factor for ES patients. Owing to neoadjuvant chemotherapy and advanced surgical procedures, > 80% of patients can have limb-sparing surgery.

3.2 Radiotherapy

Whenever surgery is marginal or intralesional and whenever histological response is found to be poor (> 10% of viable tumour cells), post-operative radiotherapy is indicated as Ewing's tumours respond well to radiotherapy [16]. Dose recommendations for post-operative radiotherapy are based

**Figure 2.** Current EuroEWING99 protocol proposed for ES patients in Europe.

R1: Localised disease; R2: Pulmonary metastases; R3: Bone and/or bone marrow metastases; VAC: Vincristine–actinomycin D–cyclophosphamide; VAI: Vincristine–actinomycin D–ifosfamide; VIDE: Vincristine–ifosfamide–doxorubicin–etoposide.

Table 1. ES: classification of histological response to pre-operative chemotherapy according to Salzer-Kuntzschik grading.

Enneking grading	Definition
Radical/wide	Tumour completely removed; tumour remained intact under surgery; macroscopically and microscopically completely surrounded by intact, healthy tissue or 'capsule'; bioptic channel removed en bloc with the surgical material with sufficient safety margin.
Marginal	Tumour completely removed; tumour remained intact under surgery; possible microscopic evidence of tumour tissue at the surgical margins; no evidence of tumour residues at tumour site.
Intralesional	Tumour incompletely removed or opened under surgery or evidence of tumour tissue at the surgical margins; macroscopic evidence of tumour residue.

Table 2. ES: classification of surgical procedures according to Enneking grading.

Grading	Definition
Grade 1	No evidence of viable tumour cells
Grade 2	Single viable tumour cell island (< 0.5 cm)
Grade 3	< 10% viable tumour cells
Grade 4	10 – 50% viable tumour cells
Grade 5	> 50% viable tumour cells
Grade 6	No effect of chemotherapy

on histological response and surgical margins. They range from 45 Gy in case of good response and tumour-free surgical margins to 55 Gy for poor response and contaminated margins.

3.3 Chemotherapy

Patients with ES have to be treated in experienced centres within controlled clinical trials. Ewing's tumours are sensitive to cytotoxic agents, especially alkylating substances such as ifosfamide and cyclophosphamide, anthracyclines (doxorubicin) and other agents such as vincristine, actinomycin D and the topoisomerase II inhibitor etoposide. Combining cytotoxic substances with complementary mechanisms of action has made a significant contribution to improve the disease-free survival rate. The EuroEWING99 protocol used in many European countries provides for a 6-cycle of VIDE (vincristine, ifosfamide, doxorubicin and etoposide) as induction chemotherapy for all patients (Figure 2). The response of patients to initial chemotherapy is determined at surgery on the resection piece (Table 1). This is followed by surgery and/or radiotherapy for local control. Following local therapy, the patients receive risk-adapted consolidation treatment. The risk groups are determined based on several criteria: histological response, tumour size and dissemination status at diagnosis. Characteristics of standard risk are a localised tumour, good clinical and histological response to pre-operative chemotherapy and/or initial volume < 200 ml. These patients will be randomised to receive either an ifosfamide-containing three-agent combination (VAI: vincristine–actinomycin D–ifosfamide) or a cyclophosphamide-containing three-agent combination (VAC: vincristine–actinomycin D–cyclophosphamide). On the contrary, characteristics qualifying for high risk are poor clinical/histological response to induction chemotherapy, large initial tumour volume (> 200 ml) when not operated and/or pulmonary metastasis at diagnosis. Such patients will be randomised to receive either consolidation of standard chemotherapy (VAI), combined with radiation to lung metastases as needed, or busulfan/melphalan-containing high dose therapy and autologous stem cell re-infusion. Patients with bone metastases or multiple metastases at diagnosis receive high dose

therapy and/or experimental treatment following induction (Figure 2).

3.4 Relapse treatment

The majority occurs within 1.5 years following diagnosis. In ES, the prognosis in case of an early relapse within 2 years from diagnosis and in multi-focal relapse is poor (< 10%). Prognosis is more favourable in focal late relapse. Successful relapse therapy requires good tumour response to relapse chemotherapy and radical local treatment [2].

The main problems of these treatments are side effects and late sequelae. For surgery and radiotherapy (local therapies), acute side effects include pain and a high risk of secondary wound infection, especially in patients who are unusually immunocompromised from the preceding chemotherapy. Surgery may be associated with considerable late sequelae depending on the extent of surgery. Radiotherapy regularly induces skin and mucosal irritation and possibly gastrointestinal problems. Late sequelae may also concern growth or development impairment, development of fibroses, impaired lymph flow and pigmentation changes in the affected region.

Chemotherapy could induce acute haematological toxicity, such as leukocytopenia, followed by immunosuppression and an increased risk of infection, thrombocytopenia and anaemia. Other side effects such as nausea, vomiting and mucositis could also be observed. Alkylating agents such as cyclophosphamide and ifosfamide can also induce nephrotoxicity and fertility impairment, especially in men. Another side effect is the development of peripheral neuropathy due to high cumulative doses of Vinca alkaloids. In addition, actinomycin D may induce hepatotoxicity.

However, secondary malignancies occurring 10 years or later after completion of therapy represent the most serious side effect of chemotherapy and radiotherapy, especially with the use of chemotherapeutic agents acting on transcription [17].

4. Market review for chemotherapy and targeted therapy in cancer

In France, the number of patients treated by chemotherapy is increasing: > 260,000 patients received a chemotherapy protocol in 2010 (+ 20 % as compared to 2005). The number of patients treated with chemotherapy grows faster than the number of new cancer cases: indications of chemotherapy concern an increasing proportion of cancers. From January 2004 to April 2012, 38 new anticancer drugs that obtained European Medicines Agency's approval in oncology became available in France. Targeted therapies represent 42% of these molecules. In 2010, cancer accounted for 54% of total costs reimbursed with an expenditure amounting to €1,060,145,178. In 2010, 61% of the costs were focused on targeted therapies, showing that over the years, the proportion of conventional cytotoxic molecules has decreased in favour of targeted therapies. This change of cancer use is due to increased knowledge

on the biology of cancer cells and development through active research for new molecules.

These new therapeutic approaches are actively explored given the main side effects observed with current therapies (chemotherapy and radiotherapy). In addition, these new options should especially benefit high-risk patients, to increase long-term survival by decreasing metastases development and preventing drug resistance.

5. Current research goals

Several strategies are currently under development [18], targeting the fusion protein EWS-FLI1 specific to ES or its downstream activated pathways, or more common target therapies used for other cancers, nonspecific to ES.

5.1 EWS-FLI1 inhibition in ES

The fusion protein EWS-FLI1, exclusively expressed in ES tumour cells, represents an ideal target to specifically treat ES without affecting normal cells. Inhibition of cell proliferation and tumour growth in ES xenografts can be achieved by decreased EWS-FLI1 expression induced by antisense oligonucleotides [19] or RNA [20], or small interference RNA (siRNA) administered with nanoparticles [21]. However, pharmacological delivery of these large molecules remains problematic in patients. An alternative strategy is to target the interaction between EWS-FLI1 and its partner proteins in the transcriptional complexes in order to inhibit EWS-FLI1 function. For example, YK-4-279 inhibits EWS-FLI1–RNA helicase A (RHA) interaction and induces apoptosis and tumour regression in ES models [22]. Recently, mithramycin was found to be the top candidate to inhibit EWS-FLI1 activity after high-throughput analysis of 50,000 compounds and to demonstrate Ewing's Sarcoma Family of Tumours (ESFT) antitumour activity both *in vitro* and *in vivo* [23].

Trabectedin is an alkylating agent, which inhibits EWS-FLI1, that demonstrates an increased efficacy in ES as compared to other paediatric sarcomas (e.g., osteosarcoma (OS), rhabdomyosarcoma) [24]. In children and adolescents, trabectedin used in compassionate Phases I/II trials shows one 6 months complete response (CR) and stable diseases (SD) in ES [25] with an acceptable tolerance in paediatric Phases I/II (thrombopaenia, reversible hepatic toxicity) [26]. This antitumour effect can be increased by combining EWS-FLI1 inhibition with antisense oligonucleotide and EWS-FLI1-modulated pathways (e.g., the mammalian target of rapamycin [mTOR] pathway) as revealed by apoptosis analysis and by *in vivo* tumour regression [27].

5.2 Ongoing targeted therapies for ES

5.2.1 Inhibition of growth factor signalling pathways
Most of the signalling pathways are involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis resistance. They are mediated by proteins with kinase activity (tyrosine kinase [TK] or serine kinase), present at the tumour cell surface, in the cytoplasm or

in the nucleus. These proteins may be inhibited by monoclonal antibodies directed against extra-membrane receptor or by small molecules which inhibit the intracellular kinase domain.

- *IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR pathway:* the IGF-1R pathway plays an important role in paediatric cancers, including ES [28]. This tumour has a peak incidence at puberty, suggesting a role of growth hormone and IGF-1. As others, IGF-1R pathway activates the downstream PI3K/Akt/mTOR pathways, stimulates ES cell survival and angiogenesis through hypoxia-inducing factor (HIF)-1 α and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion. With different anti-IGF-1R monoclonal antibodies, children and adolescents suffering of relapsed or refractory ES had SD in Phase I trials [29] and 10 – 15% of objective responses in paediatric/adult Phase II trials [30]. Predictive factors of the therapeutic response to IGF-1R antibodies remain mostly unknown. The reduced activity of the IGF system might associate with tumour progression and poor response to treatment [31]. As a consequence, high expression levels of IGF-1R, insulin receptor and IGF-1 mRNAs are associated with increased survival and high circulating IGF-1 levels with low progression risk [32]. Unfortunately, the median duration of ES response was only 5 – 7 months [30], probably because tumour cells escape IGF-1R inhibition, through AKT or other signalling pathway activation such as mTOR or TK receptors. These observations lead us to consider either combination of mono-targeted inhibitors or multi-targeted ones.
- mTOR is an intra-cytoplasmic serine/threonine kinase regulated by AKT. In paediatric ES, mTOR represents a promising target as the overexpression of the phosphorylated form of mTOR is correlated with survival [32]. The mTOR inhibitor rapamycin was first used in children to prevent graft rejection. Paediatric Phase I trials using the two mTOR inhibitors everolimus and temsirolimus have shown a good tolerance profile [33,34]. A double-blind Phase III study comparing ridaforolimus against placebo (SUCCEED trial) in sarcoma treatment maintenance after stabilisation or regression under chemotherapy have included 50 bone sarcomas and showed an increased progression-free survival (PFS) with mTOR inhibitor [35]. Concerning combination of mono-targeted inhibitors, strategies simultaneously targeting the IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR pathway at several levels are currently evaluated. For example, a Phase I/II trial using ridaforolimus combined with the anti-IGF-1R antibody dalotuzumab is ongoing in children in Europe and United States (NCT01431547). Dual PI3K/mTOR inhibitors are also studied in adult Phase I trial and dual mTOR/DNA-PK inhibitor (CC-115) in adolescent/adult Phase I trial (NCT01353625).
- *Multi-target inhibitors:* imatinib mesylate inhibiting PDGFR, c-KIT and BCR-ABL is a good candidate for

ES therapy. Indeed, high expression of c-KIT and PDGFR is observed in ES and is associated with low EFS but not with poor response to chemotherapy [36]. Imatinib appeared to exert an anti-ES activity *in vitro* and in xenograft models [37]. However, expression of imatinib targets is not sufficient to confer drug sensitivity [38]. Several Phase II trials have shown stabilisation of bone sarcomas and among them 3 of 20 ES with a median PFS were inferior to 2 months [39]. In a paediatric Phase II trial from the Children's Oncology Group (COG), only one ES patient out of 24 had partial response [40]. Preclinical data showed increased anti-tumour activity of imatinib when combined with doxorubicin and vincristine in ES [41]. Dasatinib inhibits Src and BCR-ABL and shows *in vitro* cytostatic and anti-migration effect but no apoptosis in ES [42]. Dasatinib was tested in a paediatric Phase I trial showing that its pharmacokinetic is similar in children and adults [43]. The efficacy of sunitinib, an inhibitor of Flt3, c-KIT, PDGFR and VEGF, was observed in *in vivo* models of most paediatric tumours, including 4 of 5 ES xenografts [44]. In a paediatric Phase I trial, haematological and cardiac toxicities were observed with sunitinib in children previously treated with anthracyclines [45]. Pazopanib, an inhibitor of VEGFR1-3, PDGFR α/β and c-KIT used in monotherapy is active in paediatric *in vivo* ES models, considering EFS [46]. A Phase II study of pazopanib in bone sarcoma is ready to begin in Europe.

5.2.2 Cell growth inhibition

Aurora A plays a crucial role during mitosis. The Aurora A inhibitor MLN8237 is associated with prolonged CR in *in vivo* ES models [47]. In paediatric Phase I trials, two Aurora A inhibitors are in development: MLN8237 (NCT01154816) and AT9283 (NCT00985868 and NCT01431664).

MDM2, an oncoprotein that negatively regulates p53, is overexpressed in p53 wild-type cancers. The MDM2 inhibitor nutlin-3 activates p53 signalisation pathway leading to important tumour regressions in p53 wild-type ES through apoptosis. This effect can be increased by either NF- κ B inhibition [48] using tumour necrosis factor α (TNF- α) [49] or histone deacetylase inhibitors [50]. An adult Phase I study using the oral MDM2 inhibitor RO5503781 is ongoing in solid cancers (NCT01462175).

5.2.3 Resistance to cell death

Resistance to apoptosis is a key element in tumour progression and chemoresistance. The mechanisms involve increased survival signals (growth factors/TK receptors and downstream pathways), anti-apoptotic molecule overexpression (Bcl-2, Bcl-XL and FAK in osteosarcoma), pro-apoptotic molecule underexpression or resistance to cell death receptors involving the systems Fas/FasL (Fas ligand) or TRAIL (TNF-related

Apoptosis Inducing Ligand). The BCL2 inhibitor navitoclax is developed in adult refractory tumours in combination with docetaxel, with acceptable toxicity and few responses (two partial responses and five SD) [51]. TRAIL induces tumour cell apoptosis in ES mice models, decreases osteolysis and prolongs survival [52]. Combination with imatinib further increased TRAIL effect on tumour growth and metastases in *in vivo* ES models [53]. Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) inhibit caspase-dependent apoptosis. X-linked IAP antisense oligonucleotide (XIAP ASO-AEG35156) decreases XIAP in paediatric tumour cell lines including ES [54].

Resistance to cell death may also be induced by replicative immortality through restoration of telomerase activity in cancer cells. Telomerase activity is present in 100% of ES metastases, but only in 12% of primary ES tumours and associates with shortened telomeres and decreased patient survival [55]. It is interesting to note that telomerase activity is induced by EWS-FLI [56]. The telomerase inhibitor TMPyP4 decreases telomerase enzyme activity, but its effect on cell growth inhibition depends on the cellular context [57]. Telomerase activity is inhibited by imatinib, doxorubicin or radiation in ES [58-60].

5.2.4 Inhibition of the metastatic phenotype

Each step of the metastatic process might be targeted by different therapeutic classes. For example, invasion of the host extracellular matrix is mediated by the Notch/Hes1 pathway [61]. In ES, Notch is involved in neural differentiation, proliferation and apoptosis, but its inhibition in established tumour models had poor anti-tumour effect [62].

In addition, the loss of intercellular and cell/extracellular matrix contacts may lead to anoikis, an apoptotic cell death linked to the Src/PI3K/AKT and Wnt/β-catenin/NF-κB pathways. Tumour cell survival in bloodstream is associated to resistance to anoikis and ability to escape the immune system. A Phase I of LY2090314 (GSK3 inhibitor)/pemetrexed/carboplatin combination is ongoing in adults with progressive solid tumours, with good tolerance and restoration of β-catenin expression [63].

In the case of primary bone tumours, lungs represent the preferential site for metastases dissemination. Chemokines and adhesion molecules are key factors for circulating tumour cells to form metastases, the extravasation process toward the target tissue depending on MMP-2 and MMP-9 production and activity. CXCR4 is one of the most important chemokine involved in dissemination mechanisms. CXCR4 inhibitors are used in patients to treat HIV infection and to mobilise haematopoietic stem cells (AMD3100). Adhesion and survival to the novel microenvironment depends on Erzin/β4-integrin/PI3K pathway and Fas/FasL-mediated resistance to apoptosis [64].

Isolated cells or micrometastases can enter in a prolonged survival state called 'dormancy' that might be responsible for late metastatic recurrences or resistance to cytotoxicity. Dormancy depends on αVβ1 integrin activation of NF-κB, on the anti-apoptotic molecule Bcl-XL and on the

ERK:p38-MAPK ratio [65]. Cilengitide is the unique integrin inhibitor that has been currently developed in children with high affinity for αvβ3/αvβ5. It disorganises the cytoskeleton and the tight junctions inducing the detachment of endothelial and tumour cells, and also induces apoptosis and inhibits angiogenesis [66]. A paediatric Phase I trial in brain tumours showed similar pharmacokinetic as compared to adult and no dose-limiting toxicity [66]. A paediatric Phase I trial in combination with irradiation is ongoing for children and adolescents with diffuse brainstem high grade gliomas (CILENT-0902, Trial NCT01165333).

5.3 Modulation of the anti-tumour immune response

Interferon (IFN) present in the pro-inflammatory microenvironment of ES is more often detected in metastasis than in primary tumours. It participates in neoangiogenesis by the secretion of VEGFR and to the metastatic potential by MMP-9 secretion [67]. The preclinical association of IFN with ifosfamide decreases both VEGFR and MMP-9 and inhibits tumour growth, but at doses that cannot be reached in humans [68]. The increase in pro-inflammatory type I cytokines or chemokines in the tumour correlates with cytotoxic CD8(+) T-lymphocyte infiltration in the tumour which is associated with tumour progression [69]. *In vivo*, an elevated rate of C-reactive protein, white blood cell count and an important vascularisation are associated with tumour macrophages infiltration and decreased survival in ES patients [70]. In ES patients, fever can also be considered as a prognostic factor, whatever the metastatic status. Celecoxib, a COX2 inhibitor prevents pulmonary metastases in a murine model of ES without effect on the primary tumour and its vascularisation [71].

Another target concerns the ganglioside GD2 which is expressed at the cell surface of ES [72]. This neuroectoderm marker can be targeted by an anti-GD2 monoclonal antibody which when combined with interleukin-2 (IL-2) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor significantly increases metastatic neuroblastoma survival [73].

Beyond these non-specific targeted therapies, new drugs targeting the bone tumour microenvironment require special attention and could be proposed as an adjuvant to conventional therapy: chemotherapy and surgery.

6. Scientific rationale for targeting bone microenvironment

Recently, interest has dramatically increased on the importance of the microenvironment, also called 'the bone niche' in the progression of bone sarcoma and establishment of resistance processes to conventional therapies. Therefore, new therapeutic options targeting hypoxia, angiogenesis or bone microenvironment have been extensively studied at the preclinical level, the more promising being now proposed in clinical trials. This review will describe the most recent developments in such therapeutic options for ES patients.

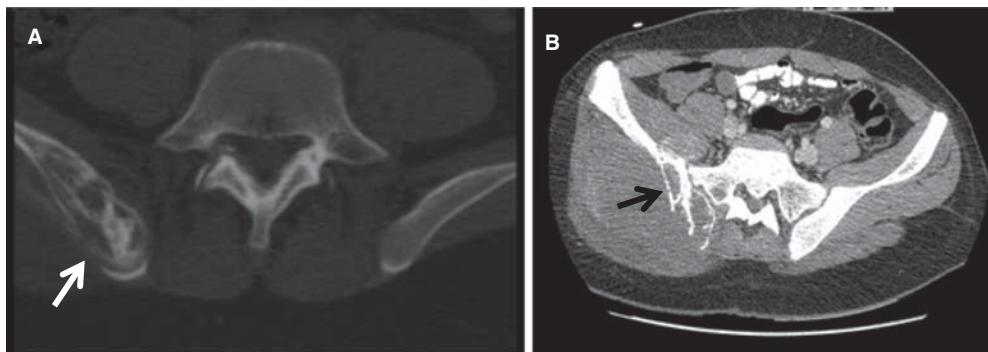


Figure 3. Illustration of characteristic X-ray film radiographs (A) and MRI (B) of ES in the pelvis with associated bone lesions (arrows).

ES is characterised by extensive bone destruction, mainly due to osteolysis (Figure 3). ES cells are unable to degrade the bone matrix and accordingly, osteoclast activation and subsequent bone resorption might be responsible for the clinical features of bone destruction [4]. Bone degradation is under the control of osteoclasts whose differentiation and activation is mainly mediated by receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), a member of the TNF superfamily (TNFSF11) after its binding to its receptor RANK expressed at the surface of mature osteoclasts and osteoclast precursors [74]. Osteoprotegerin (OPG) acts as a decoy receptor inhibiting osteoclast formation, function and survival by preventing the binding of RANKL to its receptor RANK [75].

Interaction between tumour cells, tumour-derived humoral factors and the bone marrow in the bone niche has been shown to be essential for bone tumour initiation and promotion. Therefore, targeting the bone microenvironment and particularly osteoclast activation may represent a promising adjuvant strategy for the treatment of bone tumours including ES. Indeed, a vicious cycle between osteoclasts, bone stromal cells/osteoblasts and cancer cells has been hypothesised during the progression of primary bone tumours (Figure 4) [76]. Tumour cells produce osteoclast-activating factors such as IL-6, TNF- α or parathyroid hormone-related peptide (PTH-rP) which induce osteoclast differentiation and activation. When they resorb bone, osteoclasts enable the release of growth factors stored in the bone matrix (TGF- β , IGF-1, PDGF, etc.) that in turn activate tumour cell proliferation [76]. Accordingly, inhibition of osteoclast activity represents a promising approach to block the vicious cycle, thereby indirectly limiting local cancer growth.

Two main approaches can be proposed to target bone resorption in ES: i) inhibition of osteoclast functions by using bisphosphonates or ii) direct inhibition of RANKL. Bisphosphonates (BPs) such as pamidronate [77] and minodronate [78] had been shown to have a direct effect on ES cells, therefore, combining an indirect effect through inhibition of bone resorption and a direct cytotoxic effect. Zoledronate (or zoledronic acid, Zometa[®] from Novartis Pharma), a

nitrogen-containing BP of the third generation with heterocycle is one of the most potent inhibitor of bone resorption [79]. Based on promising effects observed in preclinical studies in osteosarcoma, zoledronate has been proposed for therapeutic use in ES. Moreover, zoledronate combination to first-line OS chemotherapy (methotrexate or adriamycin/platinum/ifosfamide-based chemotherapy) is currently tested in the French randomised Phase III trial (OS2006, NCT00470223). In *in vivo* ES models, zoledronate alone induces inhibition of tumour progression in the bone environment – an effect on tumour induced in soft tissue being only obtained when combined with ifosfamide [80,81]. However, it must be noted that in juvenile murine models, zoledronate decreases enchondral bone growth in a reversible manner [82].

Among the factors involved in the regulation of bone remodelling, attention mainly focuses on the molecular triad OPG/RANK/RANKL [75]. Concerning the inhibition of RANKL, very little is known in ES. If we compare with osteosarcoma, RANKL tumour expression in OS patients associates with poor response to pre-operative chemotherapy, high expression with decreased survival and high TRACP5b plasma levels (osteoclast activity marker) with metastases occurrence [83,84]. The naturally occurring RANKL decoy receptor, OPG, offers considerable promises as a new modality for treating osteolysis associated with bone tumours [85-87]. Indeed, increased expression of RANKL has been observed in osteolytic malignancies such as breast cancer and multiple myeloma [88,89]. Concerning primary bone tumours, the inhibition of RANKL activity by OPG induced a significant therapeutic effect on bone lesion and tumour development in two preclinical models of osteosarcoma in mice (POS-1) and in rats (OSRGa) [90]. This effect was also confirmed by using the soluble form of the RANKL receptor, RANK-Fc [91] or by the RNA interference strategy targeting RANKL [92]. Less data are available in ES, but the presence of RANKL has been reported in patient biopsies by two independent studies [93,94] thus, suggesting that it may represent interesting therapeutic target (Figure 5). However, RANKL inhibition has no effect in ES cells *in vitro* suggesting that

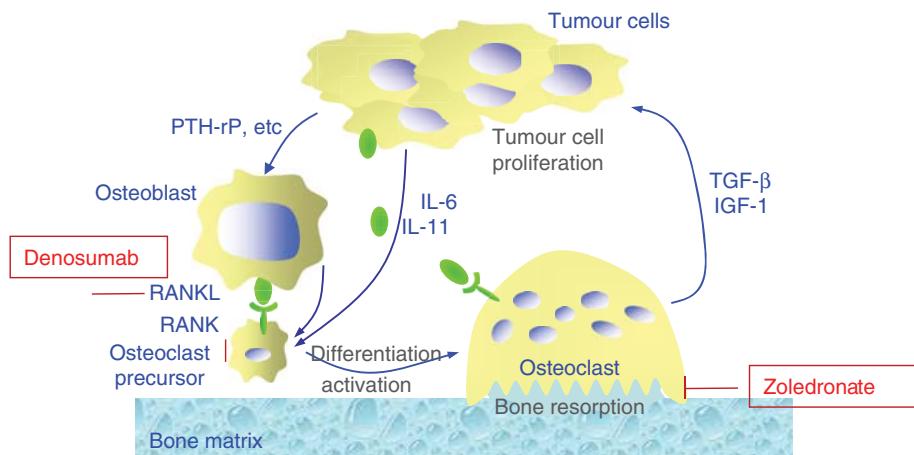


Figure 4. The vicious cycle between tumour cell proliferation and bone cells (osteoclasts and osteoblasts) is illustrated. Tumour cells produce osteoclast-activating factors such as IL-1, IL-6, TNF- α , TNF- β , TGF- β , PTH-rP, which mediate RANKL production (directly or via osteoblasts). RANKL binds to its receptor RANK which is present at the surface of osteoclasts or precursors, inducing their differentiation and activation in mature cells that can degrade bone. When they resorb bone, osteoclasts allow the release of growth factors such as TGF- β or IGF-1 stored in the bone matrix that in turn activates tumour cell proliferation. OPG can block this cycle by inhibiting the RANKL-RANK interaction.

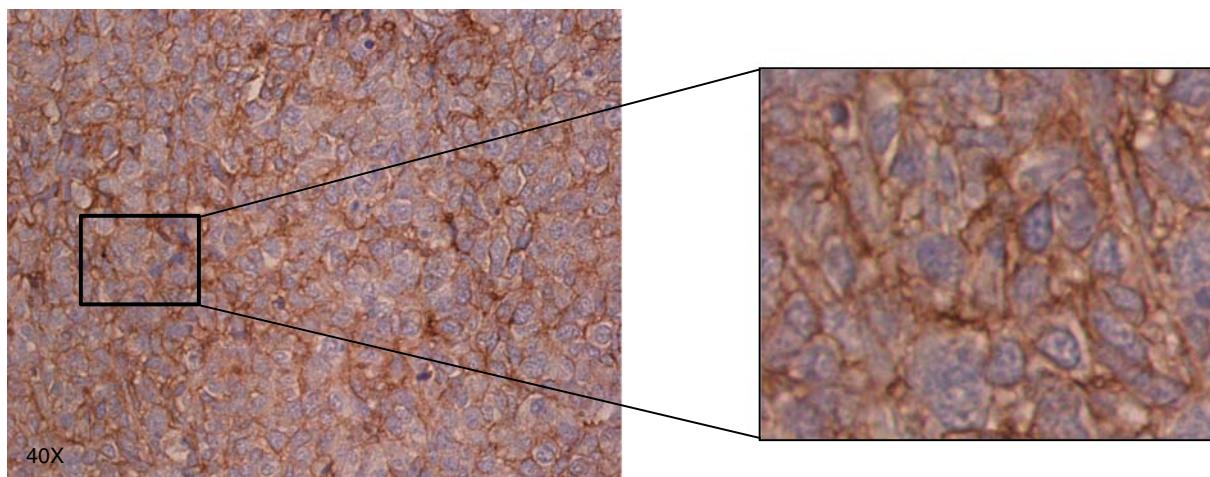


Figure 5. Immunohistochemical analysis of RANKL production in human biopsy of ES patient (magnitude: $\times 40$ and $\times 100$).

the decrease in primary bone tumour progression seen in pre-clinical models is due to indirect effect through inhibition of bone resorption, limiting the release of pro-tumoural growth factors stored in the bone matrix. In addition, modulation of RANKL by VEGF165 may be one of the mechanisms responsible for the osteolytic process induced by ES cells [95]. VEGF165 may, therefore, play an important role in modulating RANKL gene expression in the bone marrow microenvironment during the metastatic process, thereby contributing to tumour-induced bone lysis. At the clinical level, the use of denosumab, a humanised monoclonal antibody (IgG2) with high affinity and specificity against RANKL [96], is

promising for primary bone tumour patients including ES, as it shows interesting results in several cancers with bone metastases [97]. A Phase II safety study of denosumab in subjects ≥ 12 years with recurrent and unresectable bone giant cell tumour is ongoing (NCT00680992) [98].

DDK1 inhibitors interfere with the Wnt pathway and bone metabolism. Monoclonal antibody BHQ880 anti-DKK1 might restore bone formation but without direct anti-tumour effect. BHQ880 is currently in adult Phase I/II trials for multiple myeloma, alone (NCT01302886; NCT01337752) or associated with zoledronate (NCT00741377). Preliminary data on ES xenograft model show significant decreased tumour progression

likely due to indirect effect on the bone microenvironment cells (personal observations).

The ES microenvironment not only includes bone cells but also includes angiogenesis and hypoxia.

6.1 Angiogenesis and vasculogenesis inhibition

Angiogenesis is defined as formation of new capillaries from pre-existing vessels and vasculogenesis as new vessels from bone marrow-derived progenitor cells [99]. PDGFR, VEGF, VEGF receptor (VEGFR) and their downstream pathways (PI3K/AKT) are implicated in angiogenesis, VEGFR and Notch (DLL4) in vasculogenesis. PDGFR and VEGFR are overexpressed in ES and associated with poor prognosis [100,101]. After cytotoxic chemotherapy, bone marrow progenitor cell number increases, favouring expansion of residual tumour cell or micrometastases. Hypoxia increases these phenomena, especially through induction of HIF1 α expression, a factor associated with increased resistance to treatment in ES [102]. HIF1 α expression is also induced by PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK pathways and calcium signalling. HIF1 α plays additional specific role in ES as it modulates EWS-FLI expression in ES [103] and modulates bone sarcoma cell proliferation and apoptosis [104].

Bevacizumab is an anti-VEGF IgG1 monoclonal antibody which inhibits VEGF/VEGFR-1 and VEGFR-2 interactions and VEGF-dependant angiogenesis. A good tolerance has been observed in children/adolescent with few side effects (proteinuria and thrombotic risk). A Phase II trial (COG-AEWS0521, NCT00516295) of bevacizumab combined with vincristine/topotecan/cyclophosphamide in first recurrent ES showed good tolerance. Cediranib is another VEGFR inhibitor which delays tumour growth in all *in vivo* ES models studied [105], its effect being further increased when combined with mTOR inhibitor (rapamycin) but not with chemotherapy (vincristine, cyclophosphamide and cisplatin) [105].

6.2 Hypoxia

Concerning hypoxia, mTOR and topoisomerase I inhibitors decrease HIF1 α accumulation leading to an important anti-tumour effect when combined [106]. A combination of rapamycin with irinotecan is ongoing in a paediatric Phase I trial in France (RAPIRI, NCT01282697, sponsored by the SFCE [Société Française des Cancers de l'Enfant]).

6.3 Competitive environment

In view of the previous data on bone tumour environment, two main drugs could be proposed to target bone microenvironment in ES: zoledronate, a bisphosphonate of the third generation and denosumab, a fully humanised anti-RANKL antibody (Amgen Inc.) (Table 3). These drugs are already tested in clinical trials but in other indications: bone metastases (both), multiple myeloma (both), giant cell tumours (denosumab), osteosarcoma (zoledronate). Even if they target different levels of bone resorption in the bone microenvironment (at cellular level for zoledronate and molecular level

for denosumab), they both induce strong inhibition of bone degradation, a relevant target for bone tumours. They could, therefore, be used as adjuvant treatment in combination with chemotherapy, to prevent not only tumour development in primary bone site but also bone metastases formation – the worst prognosis factor for ES patients.

6.4 Potential development issues

Both zoledronate and denosumab are, therefore, potentially interesting tools for therapeutic application in ES. However, they both induce adverse side effects that must be considered. Because zoledronate is a potent inhibitor of bone resorption, it may induce adverse side effects on bone and craniofacial growth during childhood and adolescence – the time of ES development. Recent preclinical studies in young mice have reported an irreversible delay of long bone growth [82], and reversible delay in tooth eruption (submitted). Intravenous bisphosphonates used in oncology including zoledronate have been associated with acute phase response, hypocalcaemia and secondary hyperparathyroidism, musculoskeletal pain, osteonecrosis of the jaw and ocular events. Moreover, pamidronate and zoledronate have been associated with renal complications [107]. Association of bisphosphonates with atrial fibrillation and atypical fractures of the femoral diaphysis remains uncertain. There are a few case reports relating bisphosphonates to cutaneous reactions, oral ulcerations, hepatitis and oesophageal cancer. Generally, intravenous are more potent than oral bisphosphonates and the frequency and severity of some of the bisphosphonate-associated adverse events are dose- and potency-dependent. The risk of osteonecrosis of the jaw for high cumulative doses of zoledronate in patients with preceding dental defects has been widely reported [108]. For example, in myeloma patients, manufacturer-sponsored epidemiological studies reported the first estimates of the incidence of this toxic effect, ranging from 0.1 to 1.8%. By contrast, independent epidemiological efforts from clinicians and the International Myeloma Foundation reported incidence estimates between 5 and 10%. Between 2003 and 2005, warnings about the risks of bisphosphonate-associated osteonecrosis were disseminated by national regulatory agencies, the manufacturers of bisphosphonates and the International Myeloma Foundation.

The second therapeutic option concerns denosumab, the fully humanised anti-RANKL antibody. It also induces failure of osteoclast activity and final inhibition of bone resorption, as observed with bisphosphonates. Three double-blind randomised trials including a total of about 6000 patients with bone metastases from solid tumours showed no tangible differences between denosumab and zoledronate in terms of mortality, disease progression, quality of life or pain [109-111]. Overall, toxicity was similar with denosumab and zoledronate in the three trials. Adverse effects which were more frequent with denosumab than with zoledronate included osteonecrosis of the jaw (1.8 vs 1.3%) and hypocalcaemia (9.3 vs 4.7%). However, renal failure was less frequent (2.6 vs 3.7%). Denosumab

Table 3. Competitive environment table.

Compound	Company	Structure	Mechanism of action	Known indications	Trials in ES	Stage of development
Denosumab	Amgen/GSK	Fully human monoclonal antibody	RANKL inhibitor	Osteoporosis, bone metastases, giant cell tumours of bone		
Zoledronic acid	Novartis	Nitrogen containing bisphosphonate	Osteoclasts inhibitor	Osteoporosis, bone complications of cancer, hypercalcaemia of malignancies, multiple myeloma and bone metastases of solid tumor, Paget's disease	NCT00987636	III

is administered subcutaneously and zoledronate by intravenous infusion. It is not known whether local and systemic reactions to administration are different. In practice, there is no tangible reason to choose denosumab rather than a bisphosphonate. Therefore, both drugs should be proposed as adjuvant therapy to ES patients.

7. Conclusion

ES patients are currently treated by adjuvant and neoadjuvant poly-chemotherapy associated with surgery and radiotherapy in some cases. This therapeutic multi-disciplinary approach only give rise to < 25% overall survival for high risk patients, especially those with bone or bone marrow metastases. That is why new therapeutic options are urgently needed for high risk ES patients. The development of therapies which target the downstream signalling pathways activated by the fusion gene EWS-FLI1 are particularly attractive. However beside these targets, increasing number of data highlighted the role played by the tumour microenvironment which must be also considered as an interesting therapeutic option in the near future. Several pathways can, thus, be targeted such as hypoxia, angiogenesis or the bone cells. In addition, interactions between tumour cells, tumour-derived humoral factors and the bone marrow in the bone niche have been shown to be essential for bone tumour initiation and promotion. Among the cells that constitute this particular microenvironment, osteoclast appear to be interesting targets as they participate in the vicious cycle that takes place during the progression of primary bone tumours. Osteoclast differentiation, activation and functions can be inhibited by two classes of molecules: bisphosphonates or antibodies directed against the cytokine RANKL. Two main drugs, zoledronate and denosumab, respectively, have been developed and are currently used in pathologies with high bone resorption activities. Both drugs give interesting results in preclinical studies that encourage their transfer in clinic for ES patients.

8. Expert opinion

Targeting the cells present in the microenvironment, and the osteoclasts in particular indeed represent a new therapeutic

option that must be deepened for patients with primary bone tumours such as ES in the future. The proof-of-concept has been demonstrated in preclinical studies using relevant animal models of ES, especially zoledronate, which induced a strong inhibition of tumour progression in an orthotopic model of ES induced by injection of tumour cells in the medullar cavity of mouse tibia, which closely reproduce the clinical features observed in humans [81]. Because the drugs that target osteoclast differentiation and activation are already developed and used in other bone diseases where bone resorption is elevated (osteoporosis, bone metastases, multiple myeloma, etc.), it is easy to propose their use as adjuvant therapy for patients with primary bone tumours including ES. Because ES can be considered as a rare disease, clinical trials must enrol large number of patients and therefore must be proposed in large countries (United States or Europe). The bisphosphonate zoledronate (a member of the third-generation of BP, the most potent inhibitor of bone resorption) is already proposed in the EWING2008 randomised Phase III study in Germany and is planned to be also tested in the next future in the EWING2012 protocol in England, Italy and France. Although the anti-RANKL antibody denosumab represents the second most promising drug that may be used as adjuvant anti-bone resorption therapy in ES, no clinical trial plans to use it in ES patients in the next future. It must be noted that adverse side effects have been already reported with the use of bisphosphonates (such as osteonecrosis of the jaw, renal deficiency or alteration of growth); hence, denosumab may represent an interesting alternative.

Targeting the osteoclast activation represent a clever intuitive therapeutic option as these cells clearly participate in filling the vicious cycle between bone resorption and tumour progression. This concept has been already validated on other bone pathologies in which bone resorption is involved, leading to clear therapeutic benefit. It is, therefore, tempting to suggest that the same effect could be obtained in patients with primary bone tumours, such as ES, as the same biological mechanisms have been described. The importance of tumour microenvironment is already accepted in other types of cancer and the concept of its target must be more developed. It could also allow the patients to circumvent all the resistance mechanisms that are observed with the use of chemotherapy

providing less adverse side effects than conventional drugs. One other possibility is the development of 'bi-functional' molecules which could target the bone matrix in one hand (by the presence of a phosphonate residue) and target the tumour cells on the other hand (by the presence of an anti-tumour activity). This concept has been patented (WO/2009/083614 PCT/EP2009/050027), Nantes University/Nantes Hospital/INSERM/CNRS, 'Hydroxy-bisphosphonic acid derivatives as vector for targeting bone tissue')

and is currently under development for primary bone tumours in preclinical studies [112]. This family of molecules can provide better targeting of anti-tumour activity in bone site, with limiting systemic side effects.

Declaration of interest

The authors state no conflict of interest and have received no payment in preparation of this manuscript.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (●) or of considerable interest (●●) to readers.

1. Ewing J. Classics in oncology. Diffuse endothelioma of bone. James Ewing. Proceedings of the New York Pathological Society, 1921. CA Cancer J Clin 1972;22:95-8
2. Paulussen M, Fröhlich B, Jürgens H. Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options. Paediatr Drugs 2001;3:899-913
3. Raggi N, Stamenkovic I. The biology of Ewing sarcoma. Cancer Lett 2007;254:1-10
- Good review to understand ES biology.
4. Lau YS, Adamopoulos IE, Sabokbar A, et al. Cellular and humoral mechanisms of osteoclast formation in Ewing's sarcoma. Br J Cancer 2007;96:1716-22
5. Kovar H, Dworzak M, Strehl S, et al. Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. Oncogene 1990;5:1067-70
6. Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, et al. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. Cancer Cell 2007;11:421-9
7. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, et al. Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma. CR Seances Acad Sci III 1983;296:1101-3
8. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. Nature 1992;359:162-5
- A classical article.
9. Arvand A, Denny CT. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. Oncogene 2001;20:5747-54
10. Folpe AL, Chand EM, Goldblum JR, Weiss SW. Expression of Fli-1, a nuclear transcription factor, distinguishes vascular neoplasms from potential mimics. Am J Surg Pathol 2001;25:1061-6
11. May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, et al. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:5752-6
12. Pierron G, Tirode F, Lucchesi C, et al. A new subtype of bone sarcoma defined by BCOR-CCNB3 gene fusion. Nat Genet 2012;44:461-6
13. Erkizan HV, Uversky VN, Toretsky JA. Oncogenic partnerships: EWS-FLI1 protein interactions initiate key pathways of Ewing's sarcoma. Clin Cancer Res 2010;16:4077-83
14. Potratz J, Jürgens H, Craft A, Dirksen U. Ewing sarcoma: biology-based therapeutic perspectives. Pediatr Hematol Oncol 2012;29:12-27
15. Bacci G, Longhi A, Briccoli A, et al. The role of surgical margins in treatment of Ewing's sarcoma family tumors: experience of a single institution with 512 patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006;65(3):766-72
16. Schuck A, Ahrens S, Paulussen M, et al. Local therapy in localized Ewing tumors: results of 1058 patients treated in the CESS 81, CESS 86, and EICESS 92 trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003;55:168-77
17. Ginsberg JP, Goodman P, Leisenring W, et al. Long-term survivors of childhood Ewing sarcoma: report from the childhood cancer survivor study. J Natl Cancer Inst 2010;102(16):1272-83
18. Balamuth NJ, Womer RB. Ewing's sarcoma. Lancet Oncol 2010;11(2):184-92; Review
- Good review on ES.
19. Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, et al. EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. J Clin Invest 1997;99:239-47
20. Maksimenko A, Lambert G, Bertrand JR, et al. Therapeutic potentialities of EWS-Fli-1 mRNA-targeted vectorized antisense oligonucleotides. Ann NY Acad Sci 2003;1002:72-7
21. Hu-Liesková S, Heidel JD, Bartlett DW, et al. 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;65:8984-92
- Important study showing the effect of siRNA targeted against EWS/FLI1 on a murine model.
22. Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nat Med 2009;15:750-6
- Study demonstrating the efficiency of screening to find a small molecule (YK-4-279) that inhibit EWS/FLI1 binding to RHA, and its effect *in vivo* and *in vitro*.
23. Grohar PJ, Woldemichael GM, Griffin LB, et al. Identification of an inhibitor of the EWS-FLI1 oncogenic transcription factor by high-throughput screening. J Natl Cancer Inst 2011;103(12):962-78
24. Baruchel S, Pappo A, Kralio M, et al. A phase 2 trial of trabectedin in children with recurrent rhabdomyosarcoma, Ewing sarcoma and non-rhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas: a report from the Children's Oncology Group. Eur J Cancer 2012;48:579-85
25. Le Cesne A, Yovine A, Blay JY, et al. A retrospective pooled analysis of trabectedin safety in 1,132 patients with solid tumors treated in phase II clinical

- trials. *Invest New Drugs* 2012;30:1193-202
26. Lau L, Supko JG, Blaney S, et al. A phase I and pharmacokinetic study of ecteinascidin-743 (Yondelis) in children with refractory solid tumors. A Children's Oncology Group study. *Clin Cancer Res* 2005;11:672-7
 27. Mateo-Lozano S, Gokhale PC, Soldatenkov VA, et al. Combined transcriptional and translational targeting of EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:6781-90
 28. Olmos D, Postel-Vinay S, Molife LR, et al. Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study. *Lancet Oncol* 2010;11:129-35
 29. Malempati S, Weigel B, Ingle AM, et al. Phase I/II trial and pharmacokinetic study of cixutumumab in pediatric patients with refractory solid tumors and Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2012;30:256-62
 30. Ho AL, Schwartz GK. Targeting of insulin-like growth factor type 1 receptor in Ewing sarcoma: unfulfilled promise or a promising beginning? *J Clin Oncol* 2011;29:4581-3
 31. Scotland K, Manara MC, Serra M, et al. Expression of insulin-like growth factor system components in Ewing's sarcoma and their association with survival. *Eur J Cancer* 2011;47:1258-66
 32. Mora J, Rodriguez E, de Torres C, et al. Activated growth signaling pathway expression in Ewing sarcoma and clinical outcome. *Pediatr Blood Cancer* 2012;58:532-8
 33. Fouladi M, Laningham F, Wu J, et al. Phase I study of everolimus in pediatric patients with refractory solid tumors. *J Clin Oncol* 2007;25:4806-12
 34. Spunt SL, Grupp SA, Vik TA, et al. Phase I study of temsirolimus in pediatric patients with recurrent/refractory solid tumors. *J Clin Oncol* 2011;29:2933-40
 35. Chawla SP, Blay J, Ray-Coquard IL, et al. Results of the phase III, placebo-controlled trial (SUCCEED) evaluating the mTOR inhibitor ridaforolimus (R) as maintenance therapy in advanced sarcoma patients (pts)
 36. Kubo T, Piperdi S, Rosenblum J, et al. Platelet-derived growth factor receptor as a prognostic marker and a therapeutic target for imatinib mesylate therapy in osteosarcoma. *Cancer* 2008;112:2119-29
 37. Merchant MS, Woo CW, Mackall CL, Thiele CJ. Potential use of imatinib in Ewing's Sarcoma: evidence for in vitro and in vivo activity. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1673-9
 38. Horfilder M, Lanvers C, Jurgens H, et al. c-KIT-expressing Ewing tumour cells are insensitive to imatinib mesylate (ST1571). *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;50:167-9
 39. Chao J, Budd GT, Chu P, et al. Phase II clinical trial of imatinib mesylate in therapy of KIT and/or PDGFRalpha-expressing Ewing sarcoma family of tumors and desmoplastic small round cell tumors. *Anticancer Res* 2010;30:547-52
 40. Martins AS, Mackintosh C, Martín DH, et al. Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor. *Clin Cancer Res* 2006;12:3532-40
 41. Gonzalez I, Andreu EJ, Panizo A, et al. Imatinib inhibits proliferation of Ewing tumor cells mediated by the stem cell factor/KIT receptor pathway, and sensitizes cells to vincristine and doxorubicin-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:751-61
 42. Timeus F, Crescenzi N, Fandi A, et al. In vitro antiproliferative and antimigratory activity of dasatinib in neuroblastoma and Ewing sarcoma cell lines. *Oncol Rep* 2008;19:353-9
 43. Aplenc R, Blaney SM, Strauss LC, et al. Pediatric phase I trial and pharmacokinetic study of dasatinib: a report from the children's oncology group phase I consortium. *J Clin Oncol* 2011;29:839-44
 44. Maris JM, Courtright J, Houghton PJ, et al. Initial testing (stage 1) of sunitinib by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 2008;51:42-8
 45. Dubois SG, Shusterman S, Ingle AM, et al. Phase I and pharmacokinetic study of sunitinib in pediatric patients with refractory solid tumors: a children's oncology group study. *Clin Cancer Res* 2011;17:5113-22
 46. Keir ST, Morton CL, Wu J, et al. Initial testing of the multitargeted kinase inhibitor pazopanib by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59:586-8
 47. Maris JM, Morton CL, Gorlick R, et al. Initial testing of the aurora kinase A inhibitor MLN8237 by the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP). *Pediatr Blood Cancer* 2010;55:26-34
 48. Sonnemann J, Palani CD, Wittig S, et al. Anticancer effects of the p53 activator nutlin-3 in Ewing's sarcoma cells. *Eur J Cancer* 2011;47:1432-41
 49. Javelaud D, Besancon F. NF-kappa B activation results in rapid inactivation of JNK in TNF alpha-treated Ewing sarcoma cells: a mechanism for the anti-apoptotic effect of NF-kappa B. *Oncogene* 2001;20:4365-72
 50. Palani CD, Beck JF, Sonnemann J. Histone deacetylase inhibitors enhance the anticancer activity of nutlin-3 and induce p53 hyperacetylation and downregulation of MDM2 and MDM4 gene expression. *Invest New Drugs* 2012;30:25-36
 51. Puglisi M, van Doorn L, Blanco-Codesido M, et al. A phase I safety and pharmacokinetic (PK) study of navitoclax (N) in combination with docetaxel (D) in patients (pts) with solid tumors. *J Clin Oncol* 2011;29(Suppl):abstract 2518
 52. Picarda G, Lamoureux F, Geffroy L, et al. Preclinical evidence that use of TRAIL in Ewing's sarcoma and osteosarcoma therapy inhibits tumor growth, prevents osteolysis, and increases animal survival. *Clin Cancer Res* 2010;16:2363-74
 53. Wang Y, Mandal D, Wang S, et al. Platelet-derived growth factor receptor beta inhibition increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) sensitivity: imatinib and TRAIL dual therapy. *Cancer* 2010;116:3892-902
 54. Holt SV, Brookes KE, Dive C, Makin GW. Down-regulation of XIAP by AEG35156 in paediatric tumour cells induces apoptosis and sensitises cells to

- cytotoxic agents. *Oncol Rep* 2011;25:1177-81
55. Sotillo-Pineiro E, Sierrasumaga L, Patinno-Garcia A. Telomerase activity and telomere length in primary and metastatic tumors from pediatric bone cancer patients. *Pediatr Res* 2004;55:231-5
56. Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, et al. EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer Res* 2003;63:8338-44
57. Fujimori J, Matsuo T, Shimose S, et al. Antitumor effects of telomerase inhibitor TMPyP4 in osteosarcoma cell lines. *J Orthop Res* 2011;29:1707-11
58. Uziel O, Fenig E, Nordenberg J, et al. Imatinib mesylate (Gleevec) downregulates telomerase activity and inhibits proliferation in telomerase-expressing cell lines. *Br J Cancer* 2005;92:1881-91
59. Lanvers-Kaminsky C, Winter B, Koling S, et al. Doxorubicin modulates telomerase activity in Ewing's sarcoma in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 2005;14:751-8
60. Schuck A, Poremba C, Lanvers C, et al. Radiation-induced changes of telomerase activity in a human Ewing xenograft tumor. *Strahlenther Onkol* 2002;178:701-8
61. Hughes DP. How the NOTCH pathway contributes to the ability of osteosarcoma cells to metastasize. *Cancer Treat Res* 2009;152:479-96
62. Baliko F, Bright T, Poon R, et al. Inhibition of notch signaling induces neural differentiation in Ewing sarcoma. *Am J Pathol* 2007;170:1686-94
63. Brail LH, Gray JE, Burris H, et al. A phase I dose-escalation, pharmacokinetic (PK), and pharmacodynamic (PD) evaluation of intravenous LY2090314 a GSK3 inhibitor administered in combination with pemetrexed and carboplatin. *J Clin Oncol* 2011;29(15s Suppl):abstract 3030
64. Worth LL, Lafleur EA, Jia SF, et al. Fas expression inversely correlates with metastatic potential in osteosarcoma cells. *Oncol Rep* 2002;9:823-7
65. Krishnan K, Khanna C, Helman LJ. The biology of metastases in pediatric sarcomas. *Cancer J* 2005;11:306-13
66. MacDonald TJ, Stewart CF, Kocak M, et al. Phase I clinical trial of cilengitide in children with refractory brain tumors: pediatric Brain Tumor Consortium Study PBTC-012. *J Clin Oncol* 2008;26:919-24
67. Sanceau J, Poupon MF, Delattre O, et al. Strong inhibition of Ewing tumor xenograft growth by combination of human interferon-alpha or interferon-beta with ifosfamide. *Oncogene* 2002;21:7700-9
68. Sanceau J, Wietzerbin J. Downregulation of angiogenic factors in Ewing tumor xenografts by the combination of human interferon-alpha or interferon-beta with ifosfamide. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1030:170-8
69. Berghuis D, Santos SJ, Baelde HJ, et al. Pro-inflammatory chemokine-chemokine receptor interactions within the Ewing sarcoma microenvironment determine CD8(+) T-lymphocyte infiltration and affect tumour progression. *J Pathol* 2011;223:347-57
70. Fujiwara T, Fukushi J, Yamamoto S, et al. Macrophage infiltration predicts a poor prognosis for human Ewing sarcoma. *Am J Pathol* 2011;179:1157-70
71. Gendy AS, Lipskar A, Glick RD, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses metastatic disease without affecting primary tumor growth in a murine model of Ewing sarcoma. *J Pediatr Surg* 2011;46:108-14
72. Lipinski M, Braham K, Philip I, et al. Neuroectoderm-associated antigens on Ewing's sarcoma cell lines. *Cancer Res* 1987;47:183-7
73. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;363:1324-34
74. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76
75. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:457-75
76. Chirgwin JM, Guise TA. Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000;10:159-78
- A classical article to understand the vicious cycle between the bone microenvironment and the tumour cells.
77. Sonnemann J, Eckervogt V, Truckenbrod B, et al. The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of Ewing's sarcoma cell growth in vitro. *Anticancer Drugs* 2003;14(9):767-71
78. Kubo T, Shimose S, Matsuo T, et al. Inhibitory effects of a new bisphosphonate, minodronate, on proliferation and invasion of a variety of malignant bone tumor cells. *J Orthop Res* 2006;24(6):1138-44
79. Heymann D, Ory B, Gouin F, et al. Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors. *Trends Mol Med* 2004;10:337-43
80. Zhou Z, Guan H, Duan X, Kleinerman ES. Zoledronic acid inhibits primary bone tumor growth in Ewing sarcoma. *Cancer* 2005;104:1713-20
81. Odri GA, Dumoucel S, Picarda G, et al. Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. *Cancer Res* 2010;70:7610-19
- Important study showing the effect of zoledronate on *in vivo* models of ES.
82. Battaglia S, Dumoucel S, Chesneau J, et al. Impact of oncopediatric dosing regimen of zoledronic acid on bone growth: preclinical studies and case report of an osteosarcoma pediatric patient. *J Bone Miner Res* 2011;26:2439-51
83. Avnet S, Longhi A, Salerno M, et al. Increased osteoclast activity is associated with aggressiveness of osteosarcoma. *Int J Oncol* 2008;33:1231-8
84. Lee JA, Jung JS, Kim DH, et al. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2010;56:738-43
85. Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 2001;98:3534-40
86. Morony S, Capparelli C, Sarosi I, et al. Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res* 2001;61:4432-6

87. Wittrant Y, Theoleyre S, Chipoy C, et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1704:49-57
88. Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, et al. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology* 1999;140:4451-8
89. Kitazawa S, Kitazawa R. RANK ligand is a prerequisite for cancer-associated osteolytic lesions. *J Pathol* 2002;198:228-36
90. Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res* 2007;67:7308-18
91. Lamoureux F, Picarda G, Rousseau J, 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;7:3389-98
92. Rousseau J, Escriou V, Lamoureux F, et al. Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models. *J Bone Miner Res* 2011;26:2452-62
93. Taylor R, Knowles HJ, Athanasou NA. Ewing sarcoma cells express RANKL and support osteoclastogenesis. *J Pathol* 2011;225:195-202
94. Picarda G, Matous E, Amiaud J, et al. Osteoprotegerin inhibits bone resorption and prevents tumor development in a xenogenic model of Ewing's sarcoma by inhibiting RANKL. *J Bone Oncol* 2013; In press
95. Guan H, Zhou Z, Cao Y, et al. VEGF165 promotes the osteolytic bone destruction of ewing's sarcoma tumors by upregulating RANKL. *Oncol Res* 2009;18:117-25
96. Lipton A, Jun S. RANKL inhibition in the treatment of bone metastases. *Curr Opin Support Palliat Care* 2008;2:197-203
97. Fizazi K, Lipton A, Mariette X, et al. Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates. *J Clin Oncol* 2009;27:1564-71
98. Thomas D, Chawla SP, Skubitz K, et al. Denosumab treatment of giant cell tumor of bone: interim analysis of an open-label phase II study. *J Clin Oncol* 2008;26(Suppl):abstract 10500
99. Stewart KS, Kleinerman ES. Tumor vessel development and expansion in Ewing's Sarcoma: a review of the vasculogenesis process and clinical trials with vascular-targeting agents. *Sarcoma* 2011;2011:165837
100. Ikeda AK, Judelson DR, Federman N, et al. ABT-869 inhibits the proliferation of Ewing Sarcoma cells and suppresses platelet-derived growth factor receptor beta and c-KIT signaling pathways. *Mol Cancer Ther* 2010;9:653-60
101. Nagano A, Ohno T, Shimizu K, et al. EWS/Fli-1 chimeric fusion gene upregulates vascular endothelial growth factor-A. *Int J Cancer* 2010;126:2790-8
102. Kilic M, Kasperczyk H, Fulda S, Debatin KM. Role of hypoxia inducible factor-1 alpha in modulation of apoptosis resistance. *Oncogene* 2007;26:2027-38
103. Aryee DN, Niedan S, Kauer M, et al. Hypoxia modulates EWS-FLI1 transcriptional signature and enhances the malignant properties of Ewing's sarcoma cells in vitro. *Cancer Res* 2010;70:4015-23
104. Knowles HJ, Schaefer KL, Dirksen U, Athanasou NA. Hypoxia and hypoglycaemia in Ewing's sarcoma and osteosarcoma: regulation and phenotypic effects of Hypoxia-Inducible Factor. *BMC Cancer* 2010;10:372
105. Morton CL, Maris JM, Keir ST, et al. Combination testing of cediranib (AZD2171) against childhood cancer models by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 2012;58:566-71
106. Pencreach E, Guerin E, Nicolet C, et al. Marked activity of irinotecan and rapamycin combination toward colon cancer cells in vivo and in vitro is mediated through cooperative modulation of the mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1alpha axis. *Clin Cancer Res* 2009;15:1297-307
107. Hirschberg R. Renal complications from bisphosphonate treatment. *Curr Opin Support Palliat Care* 2012;6:342-7
108. Edwards BJ, Gounder M, McKoy JM, et al. Pharmacovigilance and reporting oversight in US FDA fast-track process: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *Lancet Oncol* 2008;9:1166-72
109. Dranitsaris G, Hatzimichael E. Interpreting results from oncology clinical trials: a comparison of denosumab to zoledronic acid for the prevention of skeletal-related events in cancer patients. *Support Care Cancer* 2012;20(7):1353-60
110. Scagliotti GV, Hirsh V, Siena S, et al. Overall survival improvement in patients with lung cancer and bone metastases treated with denosumab versus zoledronic acid: subgroup analysis from a randomized phase 3 study. *J Thorac Oncol* 2012;7:1823-9
111. Sun L, Yu S. Efficacy and Safety of Denosumab Versus Zoledronic Acid in Patients With Bone Metastases: a Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Clin Oncol* 2012. [Epub ahead of print]
- **Good meta-analysis comparing denosumab and zoledronate in bone metastasis.**
112. Available from: <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2009083614>

Affiliation

Francoise Redini^{†,2} PhD,
Guillaume A Odri^{1,2} MD, Gaëlle Picarda^{1,2} PhD,
Nathalie Gaspar³ MD PhD,

Marie-Françoise Heymann^{1,2,4} MD PhD,
Nadege Corradini^{1,2,5} MD &
Dominique Heymann^{1,2} PhD

[†]Author for correspondence

¹INSERM, UMR-957,
Equipe Ligue Contre le Cancer 2012,
Nantes, F-44035, France

Tel: +33 240 412 842;
Fax: +33 240 412 860;

E-mail: francoise.redini@univ-nantes.fr

²Université de Nantes,
EA 3822, Faculté de Médecine,
Laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives, Nantes, F-44035, France

³Département de Cancérologie de l'Enfant et de l'adolescent, Institut Gustave Roussy,
Villejuif F-94805, France

⁴Service d'anatomo-pathologie,
CHU Hôtel Dieu, F-44000 Nantes, France

⁵Service d'oncologie pédiatrique,
Hôpital Mère-Enfant, F-44000 Nantes, France

Annexe 3 : caractéristiques des lignées cellulaires utilisées.

		Sarcome Ewing population	Lignées Sarcome Ewing						
			A673	SK-N-MC	SK-ES-1	RD-ES	TC-32	TC-71	EW24/SIM
Origine	Age Classe	médiane 13	15	14 PNET	18 EWS	19 EWS	PNET	22 EWS	
Fusion	gènes impliqués type	EWSFLI1 90% 2: + altération	EWS-FLI1						
			1	1	2	2	1	1	
p53	gène fonctionnalité	10 % muté mauvais pronostic	mut	mut -	mut -	mut -	?	mut -	wild type +
p21 WAF1	gène inductibilité	perte expression fréquente	wild type +	+				+	
p16 INK4A	gène fonctionnalité	délétion 25% mauvais pronostic	délétion 2/2 -	wild type +	deletion1/2 +	délétion 1/2	délétion 2/2		
p14 ARF	gène fonctionnalité	délétion mutation 5-20%	délétion 2/2 -	wild type +	deletion1/2 +	délétion 1/2	délétion 1/2		
p15	gène fonctionnalité		délétion 2/2 -	wild type +	deletion1/2 +	délétion 1/2	délétion 1/2		
MDM2	expression	non amplifiée	non amplifié						
p27		perte expression fréquente							
caspase 8	expression		+	+	-	+			

Bibliographie

1. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3 Suppl 3:S131-9.
2. Buck DW, 2nd, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg* 2012;129-6:1314-20.
3. Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A. The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys* 2014.
4. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423-6937:337-42.
5. Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473-2:147-60.
6. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
7. Zhang C. Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. *J Orthop Surg Res* 2010;5:37.
8. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011;26-2:229-38.
9. Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham RC, Wu W, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H, Poole AR. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci* 2005;118 Pt 1:147-56.
10. Xiong J, O'Brien CA. Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 2012;27-3:499-505.
11. Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Lowik CW, Reeve J. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *Faseb J* 2005;19-13:1842-4.

- 12. Qing H, Bonewald LF.** Osteocyte remodeling of the perilacunar and pericanalicular matrix. *Int J Oral Sci* 2009;1-2:59-65.
- 13. Dobnig H, Turner RT.** Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 1995;136-8:3632-8.
- 14. Chambers TJ, Fuller K.** Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci* 1985;76:155-65.
- 15. Brodsky B, Persikov AV.** Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem* 2005;70:301-39.
- 16. Swaminathan R.** Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 2001;313-1-2:95-105.
- 17. Roodman GD.** Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999;27-8:1229-41.
- 18. Teitelbaum SL, Ross FP.** Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003;4-8:638-49.
- 19. Ross FP, Teitelbaum SL.** alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* 2005;208:88-105.
- 20. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM.** The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 3):377-81.
- 21. Blair HC, Athanasou NA.** Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. *Histol Histopathol* 2004;19-1:189-99.
- 22. Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ.** Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 1988;175-2:266-76.
- 23. Delaisse JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L.** Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* 2003;61-6:504-13.
- 24. Teitelbaum SL, Abu-Amer Y, Ross FP.** Molecular mechanisms of bone resorption. *J Cell Biochem* 1995;59-1:1-10.

- 25. Reddy SV.** Regulatory mechanisms operative in osteoclasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2004;14-4:255-70.
- 26. Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM.** Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology* 2003;144-12:5545-55.
- 27. Smit TH, Burger EH, Huyghe JM.** A case for strain-induced fluid flow as a regulator of BMU-coupling and osteonal alignment. *J Bone Miner Res* 2002;17-11:2021-9.
- 28. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Redini F, Heymann D.** RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci* 2007;64-18:2334-50.
- 29. Virk MS, Lieberman JR.** Tumor metastasis to bone. *Arthritis Res Ther* 2007;9 Suppl 1:S5.
- 30. Lee J, Weber M, Mejia S, Bone E, Watson P, Orr W.** A matrix metalloproteinase inhibitor, batimastat, retards the development of osteolytic bone metastases by MDA-MB-231 human breast cancer cells in Balb C nu/nu mice. *Eur J Cancer* 2001;37-1:106-13.
- 31. Clohisy DR, Perkins SL, Ramnaraine ML.** Review of cellular mechanisms of tumor osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 2000-373:104-14.
- 32. Pratap J, Lian JB, Stein GS.** Metastatic bone disease: role of transcription factors and future targets. *Bone* 2011;48-1:30-6.
- 33. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H.** Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* 2006;11-5:503-19.
- 34. Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB, Jr.** Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30-6:425-30.
- 35. Craft A, Cotterill S, Malcolm A, Spooner D, Grimer R, Souhami R, Imeson J, Lewis I.** Ifosfamide-containing chemotherapy in Ewing's sarcoma: The Second United Kingdom Children's Cancer Study Group and the Medical Research Council Ewing's Tumor Study. *J Clin Oncol* 1998;16-11:3628-33.

- 36. Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jurgens HF, Voute PA, Gadner H, Craft AW.** Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 2000;18-17:3108-14.
- 37. Craft AW, Cotterill SJ, Bullimore JA, Pearson D.** Long-term results from the first UKCCSG Ewing's Tumour Study (ET-1). United Kingdom Children's Cancer Study Group (UKCCSG) and the Medical Research Council Bone Sarcoma Working Party. *Eur J Cancer* 1997;33-7:1061-9.
- 38. Jenkin RD, Al-Fawaz I, Al-Shabanah MO, Allam A, Ayas M, Memon M, Rifai S, Schultz HP.** Metastatic Ewing sarcoma/PNET of bone at diagnosis: prognostic factors--a report from Saudi Arabia. *Med Pediatr Oncol* 2001;37-4:383-9.
- 39. Meyers PA, Kralio MD, Ladanyi M, Chan KW, Sailer SL, Dickman PS, Baker DL, Davis JH, Gerbing RB, Grovas A, Herzog CE, Lindsley KL, Liu-Mares W, Nachman JB, Sieger L, Wadman J, Gorlick RG.** High-dose melphalan, etoposide, total-body irradiation, and autologous stem-cell reconstitution as consolidation therapy for high-risk Ewing's sarcoma does not improve prognosis. *J Clin Oncol* 2001;19-11:2812-20.
- 40. Biswas B, Shukla NK, Deo SV, Agarwala S, Sharma DN, Vishnubhatla S, Bakhshi S.** Evaluation of outcome and prognostic factors in extraosseous Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61-11:1925-31.
- 41. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir G.** [Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma]. *C R Seances Acad Sci III* 1983;296-23:1101-3.
- 42. Kovar H, Aryee DN, Jug G, Henockl C, Schemper M, Delattre O, Thomas G, Gadner H.** EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ* 1996;7-4:429-37.
- 43. Janknecht R.** EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene* 2005;363:1-14.
- 44. Arvand A, Denny CT.** Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 2001;20-40:5747-54.

- 45. Odri GA, Dumoucel S, Picarda G, Battaglia S, Lamoureux F, Corradini N, Rousseau J, Tirode F, Laud K, Delattre O, Gouin F, Heymann D, Redini F.** Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. *Cancer Res* 2010;70-19:7610-9.
- 46. Toomey EC, Schiffman JD, Lessnick SL.** Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Oncogene* 2010;29-32:4504-16.
- 47. Sankar S, Bell R, Stephens B, Zhuo R, Sharma S, Bearss DJ, Lessnick SL.** Mechanism and relevance of EWS/FLI-mediated transcriptional repression in Ewing sarcoma. *Oncogene* 2013;32-42:5089-100.
- 48. Guise TA.** Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Cancer* 2000;88-12 Suppl:2892-8.
- 49. Le Deley MC, Paulussen M, Lewis I, Brennan B, Ranft A, Whelan J, Le Teuff G, Michon J, Ladenstein R, Marec-Berard P, van den Berg H, Hjorth L, Wheatley K, Judson I, Juergens H, Craft A, Oberlin O, Dirksen U.** Cyclophosphamide compared with ifosfamide in consolidation treatment of standard-risk Ewing sarcoma: results of the randomized noninferiority Euro-EWING99-R1 trial. *J Clin Oncol* 2014;32-23:2440-8.
- 50. Ladenstein R, Potschger U, Le Deley MC, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, van den Berg H, Dirksen U, Hjorth L, Michon J, Lewis I, Craft A, Jurgens H.** Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J Clin Oncol* 2010;28-20:3284-91.
- 51. Donaldson SS, Torrey M, Link MP, Glicksman A, Gilula L, Laurie F, Manning J, Neff J, Reinus W, Thompson E, Shuster JJ.** A multidisciplinary study investigating radiotherapy in Ewing's sarcoma: end results of POG #8346. Pediatric Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;42-1:125-35.
- 52. Grier HE.** The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. *Pediatr Clin North Am* 1997;44-4:991-1004.
- 53. Jurgens H, Exner U, Gadner H, Harms D, Michaelis J, Sauer R, Treuner J, Voute T, Winkelmann W, Winkler K, et al.** Multidisciplinary treatment of primary Ewing's sarcoma of bone. A 6-year experience of a European Cooperative Trial. *Cancer* 1988;61-1:23-32.

- 54. Blay JY, Bouhour D, Ray-Coquard I, Dumontet C, Philip T, Biron P.** High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell transplantation for advanced soft tissue sarcoma in adults. *J Clin Oncol* 2000;18-21:3643-50.
- 55. Cangir A, Vietti TJ, Gehan EA, Burgert EO, Jr., Thomas P, Tefft M, Nesbit ME, Kissane J, Pritchard D.** Ewing's sarcoma metastatic at diagnosis. Results and comparisons of two intergroup Ewing's sarcoma studies. *Cancer* 1990;66-5:887-93.
- 56. Paulussen M, Frohlich B, Jurgens H.** Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options. *Paediatr Drugs* 2001;3-12:899-913.
- 57. Oberlin O, Rey A, Desfachelles AS, Philip T, Plantaz D, Schmitt C, Plouvier E, Lejars O, Rubie H, Terrier P, Michon J.** Impact of high-dose busulfan plus melphalan as consolidation in metastatic Ewing tumors: a study by the Societe Francaise des Cancers de l'Enfant. *J Clin Oncol* 2006;24-24:3997-4002.
- 58. Paulussen M, Ahrens S, Lehnert M, Taeger D, Hense HW, Wagner A, Dunst J, Harms D, Reiter A, Henze G, Niemeyer C, Gobel U, Kremens B, Folsch UR, Aulitzky WE, Voute PA, Zoubek A, Jurgens H.** Second malignancies after ewing tumor treatment in 690 patients from a cooperative German/Austrian/Dutch study. *Ann Oncol* 2001;12-11:1619-30.
- 59. Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y.** EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 1997;99-2:239-47.
- 60. Toretsky JA, Connell Y, Neckers L, Bhat NK.** Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. *J Neurooncol* 1997;31-1-2:9-16.
- 61. Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN, Reddy ES.** Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene* 1995;11-6:1049-54.
- 62. Maksimenko A, Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Couvreur P, Malvy C.** Therapeutic potentialities of EWS-Fli-1 mRNA-targeted vectorized antisense oligonucleotides. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1002:72-7.

- 63. 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;65-19:8984-92.
- 64. Toub N, Bertrand JR, Tamaddon A, Elhamess H, Hillaireau H, Maksimenko A, Maccario J, Malvy C, Fattal E, Couvreur P.** Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Fli1 oncogene in Ewing sarcoma. *Pharm Res* 2006;23-5:892-900.
- 65. Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, Abaan OD, Chou TH, Dakshanamurthy S, Brown ML, Uren A, Toretsky JA.** A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. *Nat Med* 2009;15-7:750-6.
- 66. Hong SH, Youbi SE, Hong SP, Kallakury B, Monroe P, Erkizan HV, Barber-Rotenberg JS, Houghton P, Uren A, Toretsky JA.** Pharmacokinetic modeling optimizes inhibition of the 'undruggable' EWS-FLI1 transcription factor in Ewing Sarcoma. *Oncotarget* 2013.
- 67. Dagher R, Long LM, Read EJ, Leitman SF, Carter CS, Tsokos M, Goletz TJ, Avila N, Berzofsky JA, Helman LJ, Mackall CL.** Pilot trial of tumor-specific peptide vaccination and continuous infusion interleukin-2 in patients with recurrent Ewing sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma: an inter-institute NIH study. *Med Pediatr Oncol* 2002;38-3:158-64.
- 68. Olmos D, Tan DS, Jones RL, Judson IR.** Biological rationale and current clinical experience with anti-insulin-like growth factor 1 receptor monoclonal antibodies in treating sarcoma: twenty years from the bench to the bedside. *Cancer J* 2010;16-3:183-94.
- 69. Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O.** EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 2004;24-16:7275-83.
- 70. Sekyi-Otu A, Bell RS, Ohashi C, Pollak M, Andrulis IL.** Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors, IGF-1, and IGF-2 are expressed in primary human sarcomas. *Cancer Res* 1995;55-1:129-34.
- 71. Toretsky JA, Gorlick R.** IGF-1R targeted treatment of sarcoma. *Lancet Oncol* 2010;11-2:105-6.

- 72. McKian KP, Haluska P.** Cixutumumab. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18-7:1025-33.
- 73. Scartozzi M, Bianconi M, Maccaroni E, Giampieri R, Berardi R, Cascinu S.** Dalotuzumab, a recombinant humanized mAb targeted against IGFR1 for the treatment of cancer. *Curr Opin Mol Ther* 2010;12-3:361-71.
- 74. Subbiah V, Anderson P.** Targeted Therapy of Ewing's Sarcoma. *Sarcoma* 2011;2011:686985.
- 75. Hewish M, Chau I, Cunningham D.** Insulin-like growth factor 1 receptor targeted therapeutics: novel compounds and novel treatment strategies for cancer medicine. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2009;4-1:54-72.
- 76. Juergens H, Daw NC, Geoerger B, Ferrari S, Villarroel M, Aerts I, Whelan J, Dirksen U, Hixon ML, Yin D, Wang T, Green S, Paccagnella L, Gualberto A.** Preliminary efficacy of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody figitumumab in patients with refractory Ewing sarcoma. *J Clin Oncol* 2011;29-34:4534-40.
- 77. Pappo AS, Patel SR, Crowley J, Reinke DK, Kuenkele KP, Chawla SP, Toner GC, Maki RG, Meyers PA, Chugh R, Ganjoo KN, Schuetze SM, Juergens H, Leahy MG, Geoerger B, Benjamin RS, Helman LJ, Baker LH.** R1507, a monoclonal antibody to the insulin-like growth factor 1 receptor, in patients with recurrent or refractory Ewing sarcoma family of tumors: results of a phase II Sarcoma Alliance for Research through Collaboration study. *J Clin Oncol* 2011;29-34:4541-7.
- 78. Malempati S, Weigel B, Ingle AM, Ahern CH, Carroll JM, Roberts CT, Reid JM, Schmechel S, Voss SD, Cho SY, Chen HX, Kralio MD, Adamson PC, Blaney SM.** Phase I/II trial and pharmacokinetic study of cixutumumab in pediatric patients with refractory solid tumors and Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2012;30-3:256-62.
- 79. Mulvihill MJ, Cooke A, Rosenfeld-Franklin M, Buck E, Foreman K, Landfair D, O'Connor M, Pirritt C, Sun Y, Yao Y, Arnold LD, Gibson NW, Ji QS.** Discovery of OSI-906: a selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor. *Future Med Chem* 2009;1-6:1153-71.
- 80. Schenone S, Brullo C, Musumeci F, Botta M.** Novel dual Src/Abl inhibitors for hematologic and solid malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19-8:931-45.

- 81.** Carboni JM, Wittman M, Yang Z, Lee F, Greer A, Hurlburt W, Hillerman S, Cao C, Cantor GH, Dell-John J, Chen C, Discenza L, Menard K, Li A, Trainor G, Vyas D, Kramer R, Attar RM, Gottardis MM. BMS-754807, a small molecule inhibitor of insulin-like growth factor-1R/IR. *Mol Cancer Ther* 2009;8-12:3341-9.
- 82.** Sabbatini P, Rowand JL, Groy A, Korenchuk S, Liu Q, Atkins C, Dumble M, Yang J, Anderson K, Wilson BJ, Emmitte KA, Rabindran SK, Kumar R. Antitumor activity of GSK1904529A, a small-molecule inhibitor of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 2009;15-9:3058-67.
- 83.** Sabbatini P, Korenchuk S, Rowand JL, Groy A, Liu Q, Leperi D, Atkins C, Dumble M, Yang J, Anderson K, Kruger RG, Gontarek RR, Maksimchuk KR, Suravajjala S, Lapierre RR, Shotwell JB, Wilson JW, Chamberlain SD, Rabindran SK, Kumar R. GSK1838705A inhibits the insulin-like growth factor-1 receptor and anaplastic lymphoma kinase and shows antitumor activity in experimental models of human cancers. *Mol Cancer Ther* 2009;8-10:2811-20.
- 84.** O'Neill A, Shah N, Zitomersky N, Ladanyi M, Shukla N, Uren A, Loeb D, Toretsky J. Insulin-like growth factor 1 receptor as a therapeutic target in ewing sarcoma: lack of consistent upregulation or recurrent mutation and a review of the clinical trial literature. *Sarcoma* 2013;2013:450478.
- 85.** Bernard G, Raimondi V, Alberti I, Pourtein M, Widjenes J, Ticchioni M, Bernard A. CD99 (E2) up-regulates alpha4beta1-dependent T cell adhesion to inflamed vascular endothelium under flow conditions. *Eur J Immunol* 2000;30-10:3061-5.
- 86.** Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol* 2002;3-2:143-50.
- 87.** Bernard G, Breitmayer JP, de Matteis M, Trampont P, Hofman P, Senik A, Bernard A. Apoptosis of immature thymocytes mediated by E2/CD99. *J Immunol* 1997;158-6:2543-50.
- 88.** Pettersen RD, Bernard G, Olafsen MK, Pourtein M, Lie SO. CD99 signals caspase-independent T cell death. *J Immunol* 2001;166-8:4931-42.

- 89. Sohn HW, Shin YK, Lee IS, Bae YM, Suh YH, Kim MK, Kim TJ, Jung KC, Park WS, Park CS, Chung DH, Ahn K, Kim IS, Ko YH, Bang YJ, Kim CW, Park SH.** CD99 regulates the transport of MHC class I molecules from the Golgi complex to the cell surface. *J Immunol* 2001;166-2:787-94.
- 90. Bremond A, Meynet O, Mahiddine K, Coito S, Tichet M, Scotlandi K, Breittmayer JP, Gounon P, Gleeson PA, Bernard A, Bernard G.** Regulation of HLA class I surface expression requires CD99 and p230/golgin-245 interaction. *Blood* 2009;113-2:347-57.
- 91. Kovar H, Dworzak M, Strehl S, Schnell E, Ambros IM, Ambros PF, Gadner H.** Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Oncogene* 1990;5-7:1067-70.
- 92. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M.** MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 1991;67-7:1886-93.
- 93. Fellinger EJ, Garin-Chesa P, Triche TJ, Huvos AG, Rettig WJ.** Immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma cell surface antigen p30/32MIC2. *Am J Pathol* 1991;139-2:317-25.
- 94. Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G, Garofalo C, Meschini S, Astolfi A, Colombo MP, Lessnick SL, Picci P, Scotlandi K.** CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest* 2010;120-3:668-80.
- 95. Franzetti GA, Laud-Duval K, Bellanger D, Stern MH, Sastre-Garau X, Delattre O.** MiR-30a-5p connects EWS-FLI1 and CD99, two major therapeutic targets in Ewing tumor. *Oncogene* 2013;32-33:3915-21.
- 96. Sohn HW, Choi EY, Kim SH, Lee IS, Chung DH, Sung UA, Hwang DH, Cho SS, Jun BH, Jang JJ, Chi JG, Park SH.** Engagement of CD99 induces apoptosis through a calcineurin-independent pathway in Ewing's sarcoma cells. *Am J Pathol* 1998;153-6:1937-45.

- 97. Scotlandi K, Baldini N, Cerisano V, Manara MC, Benini S, Serra M, Lollini PL, Nanni P, Nicoletti G, Bernard G, Bernard A, Picci P.** CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors. *Cancer Res* 2000;60-18:5134-42.
- 98. Ban J, Bennani-Baiti IM, Kauer M, Schaefer KL, Poremba C, Jug G, Schwentner R, Smrzka O, Muehlbacher K, Aryee DN, Kovar H.** EWS-FLI1 suppresses NOTCH-activated p53 in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2008;68-17:7100-9.
- 99. Li Y, Tanaka K, Fan X, Nakatani F, Li X, Nakamura T, Takasaki M, Yamamoto S, Iwamoto Y.** Inhibition of the transcriptional function of p53 by EWS-Fli1 chimeric protein in Ewing Family Tumors. *Cancer Lett* 2010;294-1:57-65.
- 100. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA.** In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004;303-5659:844-8.
- 101. Lain S, Hollick JJ, Campbell J, Staples OD, Higgins M, Aoubala M, McCarthy A, Appleyard V, Murray KE, Baker L, Thompson A, Mathers J, Holland SJ, Stark MJ, Pass G, Woods J, Lane DP, Westwood NJ.** Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator. *Cancer Cell* 2008;13-5:454-63.
- 102. Pishas KI, Al-Ejeh F, Zinonos I, Kumar R, Evdokiou A, Brown MP, Callen DF, Neilsen PM.** Nutlin-3a is a potential therapeutic for ewing sarcoma. *Clin Cancer Res* 2011;17-3:494-504.
- 103. Choong ML, Yang H, Lee MA, Lane DP.** Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy. *Cell Cycle* 2009;8-17:2810-8.
- 104. Zenali MJ, Zhang PL, Bendel AE, Brown RE.** Morphoproteomic confirmation of constitutively activated mTOR, ERK, and NF-kappaB pathways in Ewing family of tumors. *Ann Clin Lab Sci* 2009;39-2:160-6.
- 105. Porta C, Paglino C, Mosca A.** Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol* 2014;4:64.

- 106.** Subbiah V, Kurzrock R. Ewing's sarcoma: overcoming the therapeutic plateau. *Discov Med* 2012;13-73:405-15.
- 107.** Grohar PJ, Woldemichael GM, Griffin LB, Mendoza A, Chen QR, Yeung C, Currier DG, Davis S, Khanna C, Khan J, McMahon JB, Helman LJ. Identification of an inhibitor of the EWS-FLI1 oncogenic transcription factor by high-throughput screening. *J Natl Cancer Inst* 2011;103-12:962-78.
- 108.** Boro A, Pretere K, Rechfeld F, Thalhammer V, Oesch S, Wachtel M, Schafer BW, Niggli FK. Small-molecule screen identifies modulators of EWS/FLI1 target gene expression and cell survival in Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 2012;131-9:2153-64.
- 109.** Glade Bender JL, Adamson PC, Reid JM, Xu L, Baruchel S, Shaked Y, Kerbel RS, Cooney-Qualter EM, Stempak D, Chen HX, Nelson MD, Kralio MD, Ingle AM, Blaney SM, Kandel JJ, Yamashiro DJ. Phase I trial and pharmacokinetic study of bevacizumab in pediatric patients with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2008;26-3:399-405.
- 110.** Ory B, Heymann MF, Kamijo A, Gouin F, Heymann D, Redini F. Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* 2005;104-11:2522-9.
- 111.** Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev* 2001;27-3:165-76.
- 112.** Green JR, Muller K, Jaeggi KA. Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *J Bone Miner Res* 1994;9-5:745-51.
- 113.** Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann MF, Coipeau P, Charrier C, Couillaud S, Thiery JP, Gouin F, Redini F. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 2005;37-1:74-86.
- 114.** Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Monkkonen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 2011;49-1:34-41.
- 115.** Bergstrom JD, Bostedor RG, Masarachia PJ, Reszka AA, Rodan G. Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. *Arch Biochem Biophys* 2000;373-1:231-41.

116. van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Lowik C, Papapoulos S. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo.

Biochem Biophys Res Commun 1999;255-2:491-4.

117. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 2003;9-32:2643-58.

118. Oades GM, Senaratne SG, Clarke IA, Kirby RS, Colston KW. Nitrogen containing bisphosphonates induce apoptosis and inhibit the mevalonate pathway, impairing Ras membrane localization in prostate cancer cells. *J Urol* 2003;170-1:246-52.

119. Denoyelle C, Hong L, Vannier JP, Soria J, Soria C. New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *Br J Cancer* 2003;88-10:1631-40.

120. Coxon FP, Benford HL, Russell RG, Rogers MJ. Protein synthesis is required for caspase activation and induction of apoptosis by bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol* 1998;54-4:631-8.

121. Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugal N, Yamamoto M, Nagata N. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone* 1996;18-1:9-14.

122. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Grundker C, Hofbauer LC. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291-3:680-6.

123. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K, Zannettino AC. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res* 2004;19-1:147-54.

124. Follet H, Li J, Phipps RJ, Hui S, Condon K, Burr DB. Risedronate and alendronate suppress osteocyte apoptosis following cyclic fatigue loading. *Bone* 2007;40-4:1172-7.

125. Sadr-Eshkevari P, Ashnagar S, Rashad A, Dietz M, Jackowski J, Abdulazim A, Prochnow N.

Bisphosphonates and connexin 43: a critical review of evidence. *Cell Commun Adhes* 2014;21-5:241-7.

126. Reinholtz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, Spelsberg TC.

Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 2000;60-21:6001-7.

127. Verdijk R, Franke HR, Wolbers F, Vermes I. Differential effects of bisphosphonates on breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 2007;246-1-2:308-12.

128. Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Russell RG, Croucher PI. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. *Br J Haematol* 1997;98-3:665-72.

129. Tassone P, Tagliaferri P, Visconti C, Palmieri C, Caraglia M, D'Alessandro A, Galea E, Goel A, Abbruzzese A, Boland CR, Venuta S. Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells in vitro. *Br J Cancer* 2003;88-12:1971-8.

130. Forsea AM, Muller C, Riebeling C, Orfanos CE, Geilen CC. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit cell cycle progression in human melanoma cells. *Br J Cancer* 2004;91-4:803-10.

131. Vorotnjak M, Boos J, Lanvers-Kaminsky C. In vitro toxicity of bisphosphonates on human neuroblastoma cell lines. *Anticancer Drugs* 2004;15-8:795-802.

132. Kimura S, Kuroda J, Segawa H, Sato K, Nogawa M, Yuasa T, Ottmann OG, Maekawa T. Antiproliferative efficacy of the third-generation bisphosphonate, zoledronic acid, combined with other anticancer drugs in leukemic cell lines. *Int J Hematol* 2004;79-1:37-43.

133. Koto K, Murata H, Kimura S, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, Ryu K, Sakabe T, Itoi M, Ashihara E, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T. Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis, and shows combined effects with other anticancer agents. *Oncol Rep* 2010;24-1:233-9.

134. Tamura T, Shomori K, Nakabayashi M, Fujii N, Ryoke K, Ito H. Zoledronic acid, a third-generation bisphosphonate, inhibits cellular growth and induces apoptosis in oral carcinoma cell lines. *Oncol Rep* 2011;25-4:1139-43.

135. Ory B, Blanchard F, Battaglia S, Gouin F, Redini F, Heymann D. Zoledronic acid activates the DNA S-phase checkpoint and induces osteosarcoma cell death characterized by apoptosis-inducing factor and endonuclease-G translocation independently of p53 and retinoblastoma status. *Mol Pharmacol* 2007;71-1:333-43.

136. Dass CR, Choong PF. Zoledronic acid inhibits osteosarcoma growth in an orthotopic model. *Mol Cancer Ther* 2007;6-12 Pt 1:3263-70.

137. Guenther A, Gordon S, Tiemann M, Burger R, Bakker F, Green JR, Baum W, Roelofs AJ, Rogers MJ, Gramatzki M. The bisphosphonate zoledronic acid has antimyeloma activity in vivo by inhibition of protein prenylation. *Int J Cancer* 2010;126-1:239-46.

138. Ottewell PD, Woodward JK, Lefley DV, Evans CA, Coleman RE, Holen I. Anticancer mechanisms of doxorubicin and zoledronic acid in breast cancer tumor growth in bone. *Mol Cancer Ther* 2009;8-10:2821-32.

139. Zhang W, Zhu XD, Sun HC, Xiong YQ, Zhuang PY, Xu HX, Kong LQ, Wang L, Wu WZ, Tang ZY. Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects. *Clin Cancer Res* 2010;16-13:3420-30.

140. Clezardin P. Bisphosphonates' antitumor activity: an unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone* 2011;48-1:71-9.

141. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyan S, Venner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA, Zheng M. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96-11:879-82.

142. Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyan NS, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M, Pawlicki M, De Souza P, Zheng M, Urbanowitz G, Reitsma D, Seaman J. Long-term efficacy and safety of zoledronic

acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, Phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer* 2004;100-12:2613-21.

143. Rosen LS, Gordon DH, Dugan W, Jr., Major P, Eisenberg PD, Provencher L, Kaminski M, Simeone J, Seaman J, Chen BL, Coleman RE. Zoledronic acid is superior to pamidronate for the treatment of bone metastases in breast carcinoma patients with at least one osteolytic lesion. *Cancer* 2004;100-1:36-43.

144. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA, Chen B. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94-19:1458-68.

145. Rosen LS, Gordon D, Kaminski M, Howell A, Belch A, Mackey J, Apffelstaedt J, Hussein MA, Coleman RE, Reitsma DJ, Chen BL, Seaman JJ. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid compared with pamidronate disodium in the treatment of skeletal complications in patients with advanced multiple myeloma or breast carcinoma: a randomized, double-blind, multicenter, comparative trial. *Cancer* 2003;98-8:1735-44.

146. Lipton A, Zheng M, Seaman J. Zoledronic acid delays the onset of skeletal-related events and progression of skeletal disease in patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2003;98-5:962-9.

147. Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian S, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M, Pawlicki M, de Souza P, Zheng M, Urbanowitz G, Reitsma D, Seaman JJ. Zoledronic acid versus placebo in the treatment of skeletal metastases in patients with lung cancer and other solid tumors: a phase III, double-blind, randomized trial--the Zoledronic Acid Lung Cancer and Other Solid Tumors Study Group. *J Clin Oncol* 2003;21-16:3150-7.

148. Palmieri C, Fullarton JR, Brown J. Comparative efficacy of bisphosphonates in metastatic breast and prostate cancer and multiple myeloma: a mixed-treatment meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2013;19-24:6863-72.

- 149.** Smith MR, Eastham J, Gleason DM, Shasha D, Tchekmedyian S, Zinner N. Randomized controlled trial of zoledronic acid to prevent bone loss in men receiving androgen deprivation therapy for nonmetastatic prostate cancer. *J Urol* 2003;169-6:2008-12.
- 150.** Michaelson MD, Kaufman DS, Lee H, McGovern FJ, Kantoff PW, Fallon MA, Finkelstein JS, Smith MR. Randomized controlled trial of annual zoledronic acid to prevent gonadotropin-releasing hormone agonist-induced bone loss in men with prostate cancer. *J Clin Oncol* 2007;25-9:1038-42.
- 151.** Hershman DL, McMahon DJ, Crew KD, Cremers S, Irani D, Cucchiara G, Brafman L, Shane E. Zoledronic acid prevents bone loss in premenopausal women undergoing adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26-29:4739-45.
- 152.** Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M, Bastert G. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med* 1998;339-6:357-63.
- 153.** Powles T, Paterson A, McCloskey E, Schein P, Scheffler B, Tidy A, Ashley S, Smith I, Ottestad L, Kanis J. Reduction in bone relapse and improved survival with oral clodronate for adjuvant treatment of operable breast cancer [ISRCTN83688026]. *Breast Cancer Res* 2006;8-2:R13.
- 154.** Gnant M, Mlinaritsch B, Schipplinger W, Luschin-Ebengreuth G, Postlberger S, Menzel C, Jakesz R, Seifert M, Hubalek M, Bjelic-Radisic V, Samonigg H, Tausch C, Eidtmann H, Steger G, Kwasny W, Dubsky P, Fridrik M, Fitzal F, Stierer M, Rucklinger E, Greil R, Marth C. Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 2009;360-7:679-91.
- 155.** Okegawa T, Higaki M, Matsumoto T, Kase H, Murata A, Noda K, Noda H, Asaoka H, Oshi M, Tomoishi J, Uchida H, Higashihara E, Nutahara K. Zoledronic Acid Improves Clinical Outcomes in Patients with Bone Metastatic Hormone-naive Prostate Cancer in a Multicenter Clinical Trial. *Anticancer Res* 2014;34-8:4415-20.
- 156.** Wirth M, Tammela T, Cicalese V, Gomez Veiga F, Delaere K, Miller K, Tubaro A, Schulze M, Debruyne F, Huland H, Patel A, Lecouvet F, Caris C, Witjes W. Prevention of Bone Metastases in

Patients with High-risk Nonmetastatic Prostate Cancer Treated with Zoledronic Acid: Efficacy and Safety Results of the Zometa European Study (ZEUS). *Eur Urol* 2014.

157. Coleman R, Cameron D, Dodwell D, Bell R, Wilson C, Rathbone E, Keane M, Gil M, Burkinshaw R, Grieve R, Barrett-Lee P, Ritchie D, Liversedge V, Hinsley S, Marshall H. Adjuvant zoledronic acid in patients with early breast cancer: final efficacy analysis of the AZURE (BIG 01/04) randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15-9:997-1006.

158. Coleman RE, Marshall H, Cameron D, Dodwell D, Burkinshaw R, Keane M, Gil M, Houston SJ, Grieve RJ, Barrett-Lee PJ, Ritchie D, Pugh J, Gaunt C, Rea U, Peterson J, Davies C, Hiley V, Gregory W, Bell R. Breast-cancer adjuvant therapy with zoledronic acid. *N Engl J Med* 2011;365-15:1396-405.

159. Nahleh Z, Abrams J, Bhargaval A, Nirmal K, Graff JJ. Outcome of patients with early breast cancer receiving nitrogen-containing bisphosphonates: a comparative analysis from the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *Clin Breast Cancer* 2010;10-6:459-64.

160. Coleman R, de Boer R, Eidtmann H, Llombart A, Davidson N, Neven P, von Minckwitz G, Sleeboom HP, Forbes J, Barrios C, Frassoldati A, Campbell I, Paija O, Martin N, Modi A, Hundred N. Zoledronic acid (zoledronate) for postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole (ZO-FAST study): final 60-month results. *Ann Oncol* 2013;24-2:398-405.

161. Yan T, Yin W, Zhou Q, Zhou L, Jiang Y, Du Y, Shao Z, Lu J. The efficacy of zoledronic acid in breast cancer adjuvant therapy: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Eur J Cancer* 2012;48-2:187-95.

162. Niikura N, Liu J, Hayashi N, Palla SL, Tokuda Y, Hortobagyi GN, Ueno NT, Theriault RL. Retrospective analysis of antitumor effects of zoledronic acid in breast cancer patients with bone-only metastases. *Cancer* 2012;118-8:2039-47.

163. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, Cocks K, Bell SE, Szubert AJ, Navarro-Coy N, Drayson MT, Owen RG, Feyler S, Ashcroft AJ, Ross F, Byrne J, Roddie H, Rudin C, Cook G, Jackson GH, Child JA. First-line treatment with zoledronic acid as compared with clodronic acid in multiple myeloma (MRC Myeloma IX): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376-9757:1989-99.

- 164.** Pandya KJ, Gajra A, Warsi GM, Argonza-Aviles E, Ericson SG, Wozniak AJ. Multicenter, randomized, phase 2 study of zoledronic acid in combination with docetaxel and carboplatin in patients with unresectable stage IIIB or stage IV non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010;67-3:330-8.
- 165.** Yasuda Y, Fujii Y, Yuasa T, Kitsukawa S, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Takahashi S, Fukui I. Possible improvement of survival with use of zoledronic acid in patients with bone metastases from renal cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2013;18-5:877-83.
- 166.** Hue TF, Cummings SR, Cauley JA, Bauer DC, Ensrud KE, Barrett-Connor E, Black DM. Effect of Bisphosphonate Use on Risk of Postmenopausal Breast Cancer: Results From the Randomized Clinical Trials of Alendronate and Zoledronic Acid. *JAMA Intern Med* 2014.
- 167.** Giraudo E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest* 2004;114-5:623-33.
- 168.** Koto K, Horie N, Kimura S, Murata H, Sakabe T, Matsui T, Watanabe M, Adachi S, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T. Clinically relevant dose of zoledronic acid inhibits spontaneous lung metastasis in a murine osteosarcoma model. *Cancer Lett* 2009;274-2:271-8.
- 169.** Labrinidis A, Hay S, Liapis V, Findlay DM, Evdokiou A. Zoledronic acid protects against osteosarcoma-induced bone destruction but lacks efficacy against pulmonary metastases in a syngeneic rat model. *Int J Cancer* 2010;127-2:345-54.
- 170.** Gouin F, Ory B, Redini F, Heymann D. Zoledronic acid slows down rat primary chondrosarcoma development, recurrent tumor progression after intralesional curettage and increases overall survival. *Int J Cancer* 2006;119-5:980-4.
- 171.** Zhou Z, Guan H, Duan X, Kleinerman ES. Zoledronic acid inhibits primary bone tumor growth in Ewing sarcoma. *Cancer* 2005;104-8:1713-20.
- 172.** Fournier PG, Stresing V, Ebetino FH, Clezardin P. How do bisphosphonates inhibit bone metastasis in vivo? *Neoplasia* 2010;12-7:571-8.

- 173.** Roelofs AJ, Coxon FP, Ebetino FH, Lundy MW, Henneman ZJ, Nancollas GH, Sun S, Blazewska KM, Bala JL, Kashemirov BA, Khalid AB, McKenna CE, Rogers MJ. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res* 2010;25-3:606-16.
- 174.** Yamada J, Tsuno NH, Kitayama J, Tsuchiya T, Yoneyama S, Asakage M, Okaji Y, Shuno Y, Nishikawa T, Tanaka J, Takahashi K, Nagawa H. Anti-angiogenic property of zoledronic acid by inhibition of endothelial progenitor cell differentiation. *J Surg Res* 2009;151-1:115-20.
- 175.** Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, Avvisati G, Massacesi C, Battistoni F, Gavasci M, Rocci L, Tirindelli MC, Altomare V, Tocchini M, Bonsignori M, Tonini G. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9-8:2893-7.
- 176.** Ferretti G, Fabi A, Carlini P, Papaldo P, Cordiali Fei P, Di Cosimo S, Salesi N, Giannarelli D, Alimonti A, Di Cocco B, D'Agosto G, Bordignon V, Trento E, Cognetti F. Zoledronic-acid-induced circulating level modifications of angiogenic factors, metalloproteinases and proinflammatory cytokines in metastatic breast cancer patients. *Oncology* 2005;69-1:35-43.
- 177.** Santini D, Vincenzi B, Galluzzo S, Battistoni F, Rocci L, Venditti O, Schiavon G, Angeletti S, Uzzali F, Caraglia M, Dicuonzo G, Tonini G. Repeated intermittent low-dose therapy with zoledronic acid induces an early, sustained, and long-lasting decrease of peripheral vascular endothelial growth factor levels in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13-15 Pt 1:4482-6.
- 178.** Thompson K, Roelofs AJ, Jauhiainen M, Monkkonen H, Monkkonen J, Rogers MJ. Activation of gammadelta T cells by bisphosphonates. *Adv Exp Med Biol* 2010;658:11-20.
- 179.** Clezardin P, Massaia M. Nitrogen-containing bisphosphonates and cancer immunotherapy. *Curr Pharm Des* 2010;16-27:3007-2014.
- 180.** Fowler DW, Copier J, Dagleish AG, Bodman-Smith MD. Zoledronic acid causes gammadelta T-cells to target monocytes and downmodulate inflammatory homing. *Immunology* 2014.

- 181.** Kuroda J, Kimura S, Segawa H, Sato K, Matsumoto S, Nogawa M, Yuasa T, Kobayashi Y, Yoshikawa T, Ottmann OG, Maekawa T. p53-independent anti-tumor effects of the nitrogen-containing bisphosphonate zoledronic acid. *Cancer Sci* 2004;95-2:186-92.
- 182.** Fromigue O, Lagneaux L, Body JJ. Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro. *J Bone Miner Res* 2000;15-11:2211-21.
- 183.** Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2000;82-8:1459-68.
- 184.** Tassone P, Forciniti S, Galea E, Morrone G, Turco MC, Martinelli V, Tagliaferri P, Venuta S. Growth inhibition and synergistic induction of apoptosis by zoledronate and dexamethasone in human myeloma cell lines. *Leukemia* 2000;14-5:841-4.
- 185.** Aparicio A, Gardner A, Tu Y, Savage A, Berenson J, Lichtenstein A. In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Leukemia* 1998;12-2:220-9.
- 186.** Honda Y, Takahashi S, Zhang Y, Ono A, Murakami E, Shi N, Kawaoka T, Miki D, Tsuge M, Hiraga N, Abe H, Ochi H, Imamura M, Aikata H, Chayama K. The effects of bisphosphonate zoledronic acid in hepatocellular carcinoma, depending on mevalonate pathway. *J Gastroenterol Hepatol* 2014.
- 187.** Lee MV, Fong EM, Singer FR, Guenette RS. Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001;61-6:2602-8.
- 188.** Ory B, Moriceau G, Trichet V, Blanchard F, Berreur M, Redini F, Rogers M, Heymann D. Farnesyl diphosphate synthase is involved in the resistance to zoledronic acid of osteosarcoma cells. *J Cell Mol Med* 2008;12-3:928-41.
- 189.** Salomo M, Jurlander J, Nielsen LB, Gimsing P. How myeloma cells escape bisphosphonate-mediated killing: development of specific resistance with preserved sensitivity to conventional chemotherapeutics. *Br J Haematol* 2003;122-2:202-10.
- 190.** Milone MR, Pucci B, Bruzzese F, Carbone C, Piro G, Costantini S, Capone F, Leone A, Di Gennaro E, Caraglia M, Budillon A. Acquired resistance to zoledronic acid and the parallel acquisition

of an aggressive phenotype are mediated by p38-MAP kinase activation in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* 2013;4:e641.

191. Gnant M, Clezardin P. Direct and indirect anticancer activity of bisphosphonates: a brief review of published literature. *Cancer Treat Rev* 2012;38-5:407-15.

192. Shipman CM, Croucher PI, Russell RG, Helfrich MH, Rogers MJ. The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. *Cancer Res* 1998;58-23:5294-7.

193. Mitrofan LM, Pelkonen J, Monkkonen J. The level of ATP analog and isopentenyl pyrophosphate correlates with zoledronic acid-induced apoptosis in cancer cells in vitro. *Bone* 2009;45-6:1153-60.

194. Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami HA, Croucher PI. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer* 2001;84-8:1126-34.

195. Clyburn RD, Reid P, Evans CA, Lefley DV, Holen I. Increased anti-tumour effects of doxorubicin and zoledronic acid in prostate cancer cells in vitro: supporting the benefits of combination therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65-5:969-78.

196. Neville-Webbe HL, Holen I, Coleman RE. The anti-tumour activity of bisphosphonates. *Cancer Treat Rev* 2002;28-6:305-19.

197. Mattarollo SR, Kenna T, Nieda M, Nicol AJ. Chemotherapy and zoledronate sensitize solid tumour cells to Vgamma9Vdelta2 T cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56-8:1285-97.

198. Chen T, Berenson J, Vescio R, Swift R, Gilchick A, Goodin S, LoRusso P, Ma P, Ravera C, Deckert F, Schran H, Seaman J, Skerjanec A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol* 2002;42-11:1228-36.

199. Hiraga T, Williams PJ, Ueda A, Tamura D, Yoneda T. Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. *Clin Cancer Res* 2004;10-13:4559-67.

- 200.** Hirbe AC, Roelofs AJ, Floyd DH, Deng H, Becker SN, Lanigan LG, Apicelli AJ, Xu Z, Prior JL, Eagleton MC, Piwnica-Worms D, Rogers MJ, Weilbaecher K. The bisphosphonate zoledronic acid decreases tumor growth in bone in mice with defective osteoclasts. *Bone* 2009;44-5:908-16.
- 201.** Daubine F, Le Gall C, Gasser J, Green J, Clezardin P. Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2007;99-4:322-30.
- 202.** Zhao X, Xu X, Guo L, Ragaz J, Guo H, Wu J, Shao Z, Zhu J, Guo X, Chen J, Zhu B, Wang Z, Hu X. Biomarker alterations with metronomic use of low-dose zoledronic acid for breast cancer patients with bone metastases and potential clinical significance. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124-3:733-43.
- 203.** Cornish J, Bava U, Callon KE, Bai J, Naot D, Reid IR. Bone-bound bisphosphonate inhibits growth of adjacent non-bone cells. *Bone* 2011;49-4:710-6.
- 204.** Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaisse JM, Clezardin P. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* 2000;60-11:2949-54.
- 205.** Virtanen SS, Vaananen HK, Harkonen PL, Lakkakorpi PT. Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. *Cancer Res* 2002;62-9:2708-14.
- 206.** Quinn JE, Brown LG, Zhang J, Keller ET, Vessella RL, Corey E. Comparison of Fc-osteoprotegerin and zoledronic acid activities suggests that zoledronic acid inhibits prostate cancer in bone by indirect mechanisms. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2005;8-3:253-9.
- 207.** Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* 1996;347-9012:1377-81.
- 208.** van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 2011;728-1-2:23-34.
- 209.** Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2-8:563-72.
- 210.** Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970;45-4:773-82.

- 211. Almog N.** Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer Lett* 2010;294-2:139-46.
- 212. Klein CA.** Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 2009;9-4:302-12.
- 213. Nguyen DX, Bos PD, Massague J.** Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 2009;9-4:274-84.
- 214. Fidler IJ.** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003;3-6:453-8.
- 215. Schleiermacher G, Peter M, Oberlin O, Philip T, Rubie H, Mechinaud F, Sommelet-Olive D, Landman-Parker J, Bours D, Michon J, Delattre O.** Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized ewing tumor. *J Clin Oncol* 2003;21-1:85-91.
- 216. Strauss SJ, Ng T, Mendoza-Naranjo A, Whelan J, Sorensen PH.** Understanding micrometastatic disease and Anoikis resistance in ewing family of tumors and osteosarcoma. *Oncologist* 2010;15-6:627-35.
- 217. Stresing V, Daubine F, Benzaid I, Monkkonen H, Clezardin P.** Bisphosphonates in cancer therapy. *Cancer Lett* 2007;257-1:16-35.
- 218. McLeod NM, Moutasim KA, Brennan PA, Thomas G, Jenei V.** In vitro effect of bisphosphonates on oral keratinocytes and fibroblasts. *J Oral Maxillofac Surg* 2014;72-3:503-9.
- 219. Derenne S, Amiot M, Barille S, Collette M, Robillard N, Berthaud P, Harousseau JL, Bataille R.** Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment. *J Bone Miner Res* 1999;14-12:2048-56.
- 220. Sasaki A, Boyce BF, Story B, Wright KR, Chapman M, Boyce R, Mundy GR, Yoneda T.** Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice. *Cancer Res* 1995;55-16:3551-7.

221. Yoneda T, Sasaki A, Dunstan C, Williams PJ, Bauss F, De Clerck YA, Mundy GR. Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2. *J Clin Invest* 1997;99-10:2509-17.

222. Saarto T, Blomqvist C, Virkkunen P, Elomaa I. Adjuvant clodronate treatment does not reduce the frequency of skeletal metastases in node-positive breast cancer patients: 5-year results of a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2001;19-1:10-7.

223. Powles T, Paterson S, Kanis JA, McCloskey E, Ashley S, Tidy A, Rosenqvist K, Smith I, Ottestad L, Legault S, Pajunen M, Nevantaus A, Mannisto E, Suovuori A, Atula S, Nevalainen J, Pylkkanen L. Randomized, placebo-controlled trial of clodronate in patients with primary operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20-15:3219-24.

224. Rosen G, Caparros B, Mosende C, McCormick B, Huvos AG, Marcove RC. Curability of Ewing's sarcoma and considerations for future therapeutic trials. *Cancer* 1978;41-3:888-99.

225. Paulussen M, Ahrens S, Dunst J, Winkelmann W, Exner GU, Kotz R, Amann G, Dockhorn-Dworniczak B, Harms D, Muller-Weihrich S, Welte K, Kornhuber B, Janka-Schaub G, Gobel U, Treuner J, Voute PA, Zoubek A, Gadner H, Jurgens H. Localized Ewing tumor of bone: final results of the cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86. *J Clin Oncol* 2001;19-6:1818-29.

226. Paulussen M, Craft AW, Lewis I, Hackshaw A, Douglas C, Dunst J, Schuck A, Winkelmann W, Kohler G, Poremba C, Zoubek A, Ladenstein R, van den Berg H, Hunold A, Cassoni A, Spooner D, Grimer R, Whelan J, McTiernan A, Jurgens H. Results of the EICESS-92 Study: two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment--cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients. *J Clin Oncol* 2008;26-27:4385-93.

227. Block GA, Bone HG, Fang L, Lee E, Padhi D. A single-dose study of denosumab in patients with various degrees of renal impairment. *J Bone Miner Res* 2012;27-7:1471-9.

228. Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, Diel IJ, Takahashi S, Shore N, Henry DH, Barrios CH, Facon T, Senecal F, Fizazi K, Zhou L, Daniels A, Carriere P, Dansey R.

Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol* 2012;23-5:1341-7.

229. Ripamonti CI, Maniezzo M, Campa T, Fagnoni E, Brunelli C, Saibene G, Bareggi C, Ascani L, Cislaghi E. Decreased occurrence of osteonecrosis of the jaw after implementation of dental preventive measures in solid tumour patients with bone metastases treated with bisphosphonates. The experience of the National Cancer Institute of Milan. *Ann Oncol* 2009;20-1:137-45.

230. Dimopoulos MA, Kastritis E, Bamia C, Melakopoulos I, Gika D, Roussou M, Migkou M, Eleftherakis-Papaiakovou E, Christoulas D, Terpos E, Bamias A. Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. *Ann Oncol* 2009;20-1:117-20.

231. Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, Steger GG, Tonkin K, de Boer RH, Lichinitser M, Fujiwara Y, Yardley DA, Viniegra M, Fan M, Jiang Q, Dansey R, Jun S, Braun A. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol* 2010;28-35:5132-9.

232. Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damiao R, Brown J, Karsh L, Milecki P, Shore N, Rader M, Wang H, Jiang Q, Tadros S, Dansey R, Goessl C. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet* 2011;377-9768:813-22.

233. Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, Scagliotti GV, Sleeboom H, Spencer A, Vadhan-Raj S, von Moos R, Willenbacher W, Woll PJ, Wang J, Jiang Q, Jun S, Dansey R, Yeh H. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2011;29-9:1125-32.

234. Peddi P, Lopez-Olivio MA, Pratt GF, Suarez-Almazor ME. Denosumab in patients with cancer and skeletal metastases: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2013;39-1:97-104.

235. Scagliotti GV, Hirsh V, Siena S, Henry DH, Woll PJ, Manegold C, Solal-Celigny P, Rodriguez G, Krzakowski M, Mehta ND, Lipton L, Garcia-Saenz JA, Pereira JR, Prabhash K, Ciuleanu TE, Kanarev V, Wang H, Balakumaran A, Jacobs I. Overall survival improvement in patients with lung cancer and bone metastases treated with denosumab versus zoledronic acid: subgroup analysis from a randomized phase 3 study. *J Thorac Oncol* 2012;7-12:1823-9.

236. Zwolak P, Dudek AZ. Antineoplastic activity of zoledronic acid and denosumab. *Anticancer Res* 2013;33-8:2981-8.

237. Misso G, Porru M, Stoppacciaro A, Castellano M, De Cicco F, Leonetti C, Santini D, Caraglia M. Evaluation of the in vitro and in vivo antiangiogenic effects of denosumab and zoledronic acid. *Cancer Biol Ther* 2012;13-14:1491-500.

ACIDE ZOLEDRONIQUE : NOUVEL AGENT THERAPEUTIQUE DANS LE SARCOME D'EWING

Mots clés : Acide Zolédonique, sarcome d'Ewing, ostéolyse tumorale, métastases

L'acide Zolédonique est le bisphosphonate de 3^{ème} génération le plus puissant pour inhiber la résorption osseuse. Il est actuellement utilisé pour traité l'ostéoporose, mais aussi l'ostéolyse associé aux tumeurs malignes. Dans le développement tumoral en milieu osseux, il existe un cercle vicieux entre les cellules tumorales et l'ostéolyse qui se stimulent réciproquement. En agissant sur l'ostéolyse, l'acide Zolédonique peut donc inhiber le développement tumoral intraosseux. Cliniquement, il prévient l'apparition de fractures pathologiques de métastases osseuses de nombreux types de cancers, est associé à une diminution du risque de métastases et à une amélioration de la survie dans certains cancers. Il présente de plus un effet direct sur les cellules tumorales *in-vitro*. Le sarcome d'Ewing est une tumeur osseuse primitive survenant principalement au moment de l'adolescence qui a pour caractéristique d'être très ostéolytique. Il résulte d'une translocation entre le gène EWS et un gène de la famille ETS, qui aboutit à la production d'un facteur de croissance aberrant, conférant à lui seul le phénotype tumoral. Le pronostic est de 70% en cas de tumeur de petite taille non métastasée, mais de moins de 30% en cas de métastases pulmonaires et 10% en cas de métastases osseuse. Ceux-ci sont restés quasiment inchangés depuis l'avènement des chimiothérapies dans les années 1970. Le but de cette étude est d'étudier les effets directs *in-vitro* de l'Acide Zolédonique sur des lignées de sarcome d'Ewing, et son effet *in-vivo* sur la croissance tumorale et le phénomène métastatique pulmonaire dans des modèles murins, en vue d'une application clinique.

ZOLEDRONIC ACID: NOVEL THERAPEUTIC AGENT IN EWING'S SARCOMA

Keywords: Zoledronic acid, Ewing's sarcoma, tumor induced osteolysis, metastases

Zoledronic acid is the most potent 3rd generation bisphosphonate to inhibit bone resorption. It is currently used to treat osteoporosis, but also tumor induced osteolysis. In bone developing tumors, there is a vicious cycle between tumoural cells and osteolysis, which stimulate each other. By acting on osteolysis, Zoledronic acid can therefore inhibit the development of tumors in bone. In clinical trials, it prevents pathological fractures associated to bone metastases of many cancer types, is associated with a diminished risk of metastatic disease and in better prognosis in certain cancers. It is also known to have a direct effect on tumoural cells *in-vitro*. Ewing's sarcoma is a very osteolytic primitive bone tumor mainly appearing in teenagers. It results from the translocation of EWS gene with an ETS family gene, resulting in the production of an aberrant transcription factor which induces the tumoural phenotype by itself. Prognosis is 70% if the tumor is small and non metastatic, but less than 30% in case of pulmonary metastases, and 10% with bone metastases. These have not changed since the introduction of chemotherapies in the 1970's. The aim of this work is to study Zoledronic acid's direct *in-vitro* effects on Ewing's sarcoma cells, its *in-vivo* effects on tumor growth and pulmonary metastases in murine models, as a preparation study for clinical use.

ODRI Guillaume-Anthony, 3 place Gambetta, 45000 Orléans