

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MEDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

2013

N° 31

**APPROCHES THERAPEUTIQUES DES OSTEOSARCOMES
PAR CIBLAGE DES ACTIVITES KINASES**

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie – Médecine – Santé
Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Bérengère GOBIN

Le 24 Octobre 2013, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

Mme VICO Laurence
M. PEYRUCHAUD Olivier

Directeur de recherche, INSERM, Saint-Etienne
Chargé de recherche, INSERM, Lyon

Examineurs

Mme SCHMID-ALLIANA Annie
M. FLEURY Fabrice
M. LEZOT Frédéric

Directeur de recherche, INSERM, Nice
Professeur des Universités, Nantes
Chargé de recherche, INSERM, Nantes

Directeur de thèse

M. HEYMANN Dominique

Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Nantes

COMMUNICATIONS

ECRITES & ORALES

Articles originaux soumis dans des journaux internationaux à comité de lecture :

- ✓ **Gobin B**, Moriceau G, Ory B, Charrier C, Brion R, Blanchard F, Redini F, Heymann D. Therapeutic interest of imatinib mesylate in osteosarcoma: an open debate. PLOS ONE, 2013. En revision.

- ✓ **Gobin B**, Baud'huin M, Lamoureux F, Charrier C, Lanel R, Battaglia S, Redini F, Lezot F, Blanchard F, Heymann D. BYL719, a new α -specific PI3K inhibitor : single administration and in combination with conventional chemotherapy for treatment of osteosarcoma. Soumis

- ✓ **Gobin B**, Battaglia S, Lanel R, Chesneau J, Amiaud J, Redini F, Ory B, Heymann D. NVP-BEZ235, a dualPI3K/mTOR inhibitor, inhibits osteosarcoma cell proliferation and tumor development *in vivo* with an improved survival rate. Soumis

Reuves acceptées dans des journaux internationaux à comité de lecture:

- ✓ **Gobin B**, Baud'huin M, Isidor B, Heymann D, Heymann MF. Monoclonal antibodies targeting RANKL in bone metastasis treatment. In Monoclonal antibodies in oncology, Ed. Fatih M. Uckum, eBook Future Medicine Ltd, 2012, 42-53.

- ✓ Ory B, Moriceau G, **Gobin B**, Redini F, Heymann D. mTOR inhibitors (rapamycin and its derivatives) and nitrogen containing bisphosphonates: bi-functional compounds for the treatment of bone tumors. *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Ed Bentham, 2012, 6:189-202.
- ✓ Moriceau G, Ory B, **Gobin B**, Verrecchia F, Gouin F, Blanchard F, Redini F, Heymann D. Therapeutic approach of primary bone tumours by bisphosphonates. *Curr Pharm Des.* 2010;16(27):2981-7.

Communications orales:

- ✓ **European Calcified Tissue Society (ECTS) du 18 au 21 mai 2013, Lisbonne, Portugal.**
Gobin B, Baud'huin M, Charrier C, Hervouet S, Lezot F, Blanchard F, Heymann D. New PI3K α -specific inhibitor, BYL719: therapeutic interest in osteosarcoma.
- ✓ **Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM) 2012, Bordeaux.**
Gobin B, Moriceau G, Brion R, Heymann D. Apport de l'Imatinib Métylate dans le traitement des ostéosarcomes
- ✓ **Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM) 2012, Bordeaux.**
Gobin B, Baud'huin M, Charrier C, Hervouet S, Heymann D. Un nouvel inhibiteur de PI3K, BYL719, inhibent l'ostéoblastogénèse, l'ostéoclastogénèse ainsi que la prolifération des ostéosarcomes *in vitro*.

- ✓ **GSF GETO, du 29 juin au 1er juillet 2011, Marseille.** Gobin B, Moriceau G, Ory B, Gouin F, Bompas E, Amiaud J, Charrier C, Corradini N, Rédini F, Heymann D. Apport de l'Imatinib Mesylate dans le traitement des ostéosarcomes : étude pré-clinique.

Posters:

- ✓ **European Calcified Tissue Society (ECTS) du 18 au 21 mai 2013, Lisbonne, Portugal.**
Gobin B, Battaglia S, Chesneau J, Heymann D. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, inhibits osteosarcoma cell proliferation and the tumor development *in vivo*.
- ✓ **European Calcified Tissue Society (ECTS) du 18 au 21 mai 2013, Lisbonne, Portugal.**
Gobin B, Moriceau G, Ory B, Brion R, Redini F, Heymann D. Therapeutic interest of Imatinib mesylate in osteosarcoma.
- ✓ **Cancéropôle, les 2 et 3 avril 2013, les Sables d'Olonne.** **Gobin B,** Baud'huin M, Charrier C, Hervouet S, Lezot F, Blanchard F, Heymann D. Intérêt thérapeutique du nouvel inhibiteur spécifique de PI3K α dans l'ostéosarcome.

SOMMAIRE

Sommaire

ABRÉVIATIONS.....	I
LISTE DES FIGURES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	X
INTRODUCTION GENERALE.....	1
I. LE TISSU OSSEUX	2
A. Constituants du tissu osseux.....	2
1. La matrice extracellulaire.....	3
2. Les cellules spécialisées.....	4
a. Des cellules souches mésenchymateuses aux ostéocytes.....	4
b. Des cellules souches hématopoïétiques aux ostéoclastes.....	10
B. Le remodelage osseux.....	13
II. PATHOLOGIES OSSEUSES	17
A. Les tumeurs osseuses.....	17
1. Les tumeurs osseuses primitives.....	17
2. Les tumeurs osseuses secondaires.....	18
B. L'ostéosarcome.....	19
1. Généralités.....	19
2. Epidémiologie.....	22
3. Etiologie.....	22
4. Le cercle vicieux « tumeur-niche tumorale ».....	25
5. Diagnostic.....	27
6. Prise en charge de l'ostéosarcome.....	28

III. LES RECEPTEURS A ACTIVITE TYROSINE KINASE.....	34
A. Structure des récepteurs à activité tyrosine kinase	38
B. Activation des récepteurs tyrosine kinase	40
C. Voies de signalisations induites par l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase	44
1. La voie PI3K/AKT	45
2. La voie RAS/RAF/MEK/ERK.....	46
3. La voie PLC γ	49
4. La voie JAK/STAT	49
5. La famille SRC.....	49
D. Mécanismes d'arrêt du signal intracellulaire induit par les récepteurs tyrosine kinase	50
E. La voie de signalisation PI3K/AKT	54
F. Activation de la classe I de PI3K.....	57
G. Signalisation de la voie PI3K.....	59
H. La voie PI3K dans le cancer	62
IV. OBJECTIFS DE LA THESE.....	64
MATERIELS & METHODES	67
I. MOLECULES	68
II. EFFET DES MOLECULES DANS L'OSTEOSARCOME.....	68
A. Cellules d'ostéosarcome et conditions de culture	68
B. Expérimentations <i>in vitro</i>	69
C. Expérimentations <i>in vivo</i>	75
III. EFFET DES MOLECULES SUR LES CELLULES DU TISSU OSSEUX	80
A. Cellules et conditions de culture.....	80

B. Expérimentation <i>in vitro</i>	81
IV. ANALYSES STATISTIQUES	84
PARTIE I – L’IMATINIB MESYLATE DANS L’OSTEOSARCOME.....	85
I. INTRODUCTION	86
II. RESULTATS.....	90
III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	101
PARTIE II – CIBLAGE DE LA VOIE PI3K/AKT/MTOR DANS L’OSTEOSARCOME.....	112
I. INTRODUCTION	113
II. RESULTATS.....	121
A. Effet du NVP-BEZ235 et du BYL719 <i>in vitro</i>	121
B. Effet du NVP-BEZ235 <i>in vivo</i>	127
C. Effet du BYL719 <i>in vivo</i>	134
D. Effet <i>in vitro</i> du BYL719 sur les cellules osseuses.....	142
III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	146
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES	155
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	172

ABRÉVIATIONS

4E-BP1: 4E-binding protein 1
ABC: ATP-binding cassette
ALDH: aldehyde dehydrogenase
ALP: alkaline phosphatase
AP-1: activating protein-1
ATF: activating transcription factor
ATM: ataxia-telangiectasia mutated
ATR: ataxia- and Rad3-related
BAD: Bcl-2 antagonist of cell death
BAX: Bcl-2 associated X protein
BCR: breakpoint cluster region
BMK-1: big MAP Kinase-1
BMP: bone morphogenic protein
BS: surface osseuse
BS/BV: surface osseuse/volume osseux
BS/TV: densité osseuse
BSP: bone sialoprotein
BV: volume osseux
BV/TV: pourcentage de volume osseux
C.Tb: épaisseur de la corticale
CA: anhydrase carbonique
CATHK: cathepsine K
CDK4: cyclin dependent kinase 4
CFU-GM: colony forming unit-granulocyte macrophage
COLL1: collagen I
CREB: C-AMP response element-binding protein
CSC: cellule souche cancéreuse
CSH: cellule souche hématopoïétique
CSM: cellule souche mésenchymateuse
CTC: cellule tumorale circulante
DAG: diacylglycérol
DEPTOR: DEP-domain-containing mTOR interacting protein
DMP-1: dentin matrix protein-1
DNA-PK: DNA-dependent protein kinase
EGF: epithelial growth factor
EGFR: epithelial growth factor receptor
EphR: récepteur aux éphrines
ErbB: v-Erb avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
ERK: extracellular signal-regulated kinase
FAK: focal adhesion kinase
FGF: fibroblast growth factor
FGFR: fibroblast growth factor receptor
FOXO: forkhead box
GDP: guanosine diphosphate
GEF: guanine exchange factor
GH/IGH-1: growth hormone/insulin-like growth hormone-1
GIST: tumeur stromale gastrointestinale
GSK: glycogen synthase kinase
HDAC: histone deacetylase
HECT: homologous to E6-associated C-terminus
HGF: hepatocyte growth factor
HIF-1 α : Hypoxia Inductible Factor 1 α
HSP90: heat shock protein 90
IAP: inhibitor of apoptosis protein
IEG: immediate early gene
IFOS: Ifosfamide
Ig: immunoglobuline
IL-6: interleukine-6
Ins/IR: insulin/insulin receptor
IP₃: inositol-1,4,5-trisphosphate
JAK: janus kinase
JNK: c-jun Nterminal kinase
IGF-1R: insulin-like growth factor-1 receptor
LMC: leucémie myéloïde chronique
LRIG-1: leucin-rich repeats immunoglobulin-like domains protein-1
MAF: musculo aponeurotic fibrosarcoma
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MAPKK: MAPK kinase

MAPKKK, MAPK kinase kinase

M-CSF, macrophage-colony stimulating factor

M-CSFR - c-FMS, macrophage-colony stimulating factor receptor

MDM2, mouse double minute 2 Homolog

MDR1, multidrug resistance-1

MMP-9, matrix metalloproteinase-9

MRP1, multidrug resistance protein

mSIN1, mammalian stress activated protein kinase interacting protein 1

MSK, mitogen and stress-activated protein kinase

MTM1, myotubularine 1

mTOR, mammalian target of rapamycin

mTORC1/C2, mTOR complex1/complex2

NFκB, nuclear factor Kappa B

NOS, nitric oxide synthase

OC, ostéocalcine

OPG, ostéoprotégérine

OPN, ostéopontine

PARP, poly(ADP-ribose) polymerase

PBMC, peripheral blood mononuclear cell

PDGF, platelet derived growth factor

PDGFR, platelet derived growth factor Receptor

RTK, récepteur à activité tyrosine kinase

PDK, phosphoinositide-dependent protein kinase-1

P-gp, P-glycoprotein

PH, pleckstrin homology

PI, phosphatidylinositol

PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase

PI3P, phosphatidylinositol 3-monophosphate

PI4P, phosphatidylinositol 4-monophosphate

PIP₂, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP₃, phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PKA, protéine kinase A

PKC, protéine kinase C

PLC, phospholipase C

PLK1, polo-like kinase 1

PPAR_γ, peroxysome proliferator-activator- γ

PRAS40, prolin-rich AKT substrate 40 kDa

PTB, phospho tyrosine binding

PTEN, phosphatase and tensin homolog

PTH, parathormone

PTHrP, parathormone related peptide

PTP, protein tyrosine phosphatase

PTPN6, protéine tyrosine phosphatase, type non-récepteur, 6

P-Tyr, phosphorylation du résidu tyrosine

RANK, receptor activator of NFκB

RANKL, receptor activator of NFκB ligand

RCPG, récepteur couplé aux protéines G

RDB, Ras binding domain

RGD, séquence arginine-glycine-acide aspartique

Rheb, Ras-related GTPase

RICTOR, rapamycin insensitive companion of mTOR

RSK1/2, 90kDa ribosomal S6 kinase

SCF, stem cell factor

Ser, sérine

SH2, Src homology 2

SH3, Src homology 3

SMAC, second mitochondria derived activator of caspase

SMRT, single molecule real time

SOS, son of sevenless

SREBP-1, sterol regulatory element binding proteins-1

STAT: signal transducers and activators
of transcription

Tb.Sp: espace trabéculaire

Tb.Th: épaisseur de la trabéculaire

TGF- β : transforming growth factor- β

Thr: thréonine

TNF α et β : tumor necrosis factor α et β

TRAP: tartrate resistant acid phosphatase

TS: surface tissulaire

TSC1/2: tuberous sclerosis complex 1/2

TV: volume tissulaire

VEGF: vascular endothelial growth factor

VEGFR: vascular endothelial growth factor
receptor

Vps34: vacuolar protein sorting 34

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM).....	5
Figure 2 : La différenciation ostéoblastique.....	6
Figure 3 : L'ostéocyte.....	8
Figure 4 : L'ostéoclaste.	10
Figure 5 : L'ostéoclastogenèse	11
Figure 6 : Représentation d'un ostéoclaste activé.....	12
Figure 7 : Le remodelage osseux.	14
Figure 8 : Paléopathologie : existence ancestrale des ostéosarcomes	19
Figure 9 : Classification des ostéosarcomes.	21
Figure 10 : Mise en place d'un cercle vicieux entre les cellules tumorales et le microenvironnement.....	26
Figure 11 : Famille des protéines tyrosine kinase (non récepteur)	35
Figure 12 : Famille des récepteurs à activité tyrosine kinase	37
Figure 13 : Structure et activation des récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille du PDGF.....	38
Figure 14 : Activation des récepteurs de la famille PDGF.....	41
Figure 15 : Freins moléculaires intracytoplasmiques des récepteurs à activité tyrosine kinase.....	42
Figure 16 : Voies de signalisation induites par l'activation de récepteur à activité tyrosine kinase.....	45

Figure 17 : La voie RAS/RAF/MEK/ERK.....	47
Figure 18 : Rétrocontrôle négatif des signaux intracellulaires activés par les récepteurs tyrosine kinase	51
Figure 19 : Structure des protéines PI3K des classes I, II et III.....	55
Figure 20 : La voie de signalisation PI3K.....	60
Figure 21 : Mode d'action de l'imatinib mésylate.....	88
Figure 22 : L'imatinib mésylate inhibe la voie de signalisation PI3K/AKT dans 2 lignées d'ostéosarcome.....	90
Figure 23 : L'imatinib mésylate diminue la viabilité cellulaire des cellules d'ostéosarcome .	91
Figure 24 : L'imatinib mésylate diminue la prolifération des cellules d'ostéosarcome	92
Figure 25 : L'imatinib mésylate induit l'accumulation des cellules d'ostéosarcome en phase G0/G1 ou S/G2M.....	93
Figure 26 : L'imatinib mésylate induit l'accumulation des cellules d'ostéosarcome en phase SubG0	94
Figure 27 : L'imatinib mésylate induit la mort cellulaire des cellules d'ostéosarcome : exemple des cellules MG63 (humaines).....	95
Figure 28 : L'imatinib mésylate inhibe la migration cellulaire.	96
Figure 29 : Le PDGFR α , cible de l'imatinib mésylate dans la lignée HOS.....	97
Figure 30 : Les ARN des PDGFR α et PDGFR β sont exprimés dans les cellules d'ostéosarcome.....	98

Figure 31 : L'imatinib mésylate ralentit la croissance tumorale dans un modèle murin syngénique d'ostéosarcome MOS-J chez la souris C57Bl/6J dans un protocole préventif.....	99
Figure 32 : L'imatinib mésylate ralentit la croissance tumorale dans un modèle murin syngénique d'ostéosarcome POS-1 chez la souris C3H/HeN dans un protocole préventif ...	99
Figure 33 : L'imatinib mésylate ralentit la croissance tumorale dans un modèle murin syngénique d'ostéosarcome MOS-J chez la souris C57Bl/6J dans un protocole curatif.....	100
Figure 34 : Résultats préliminaires : le nilotinib inhibe la viabilité cellulaire des cellules d'ostéosarcome.....	101
Figure 35 : Composition des complexes mTORC1 et mTORC2.....	115
Figure 36 : Voie de signalisation de mTOR.....	116
Figure 37 : Structures chimiques du NVP-BEZ235 et du BYL719	120
Figure 38 : Effet du NVP-BEZ235 et du BYL719 sur la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR.....	121
Figure 39 : Le NVP-BEZ235 et le BYL719 diminuent la viabilité des cellules d'ostéosarcome.....	123
Figure 40 : Le NVP-BEZ235 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 des cellules d'ostéosarcome.....	124
Figure 41 : Le BYL719 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 des cellules d'ostéosarcome.....	125
Figure 42 : Le NVP-BEZ235 et le BYL719 n'induisent pas d'activité caspase.....	127

Figure 43 : Le NVP-BEZ235 a un effet anti-tumoral dans un modèle syngénique murin d'ostéosarcome.....	128
Figure 44 : le NVP-BEZ235 diminue la vascularisation et la prolifération des cellules d'ostéosarcome MOS-J <i>in vivo</i>	129
Figure 45 : Le NVP-BEZ235 augmente le nombre d'ostéoclastes et diminue le nombre de cellules Ostérix ⁺ <i>in vivo</i> du tibia sans tumeur des souris C57BL/6J traitées.....	131
Figure 46 : Le NVP-BEZ235 a un effet anti-tumoral dans un modèle xénogénique murin d'ostéosarcome.....	132
Figure 47 : Le BYL719 a un effet anti-tumoral dans un modèle syngénique murin d'ostéosarcome.....	135
Figure 48 : le BYL719 diminue la vascularisation et la prolifération des cellules d'ostéosarcome MOS-J <i>in vivo</i>	136
Figure 49 : Le BYL719 diminue le nombre d'ostéoclastes sans affecter le nombre de cellules Ostérix ⁺ du tibia sans tumeur des animaux traités.....	137
Figure 50 : Le BYL719 a un effet anti-tumoral dans un modèle xénogénique murin d'ostéosarcome.....	138
Figure 51 : Effet anti-tumoral synergique de la combinaison du BYL719 avec l'ifosfamide dans un modèle syngénique murin d'ostéosarcome.....	141
Figure 52 : Le BYL719 inhibe la prolifération de cellules souches mésenchymateuses (CSM) et module leur différenciation et leur minéralisation.....	143
Figure 53 : Le BYL719 inhibe l'ostéoclastogenèse, la viabilité des monocytes mais n'affecte que légèrement l'activité ostéoclastique.....	145

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Agents chimiothérapeutiques conventionnels utilisés dans le protocole thérapeutique de l'ostéosarcome.	30
Tableau 2 : Récapitulatif des gènes et protéines selon la classe de PI3K.....	55
Tableau 3 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés en western blot.....	72
Tableau 4 : Séquence des amorces de PCR semi-quantitative.	74
Tableau 5 : Protocoles thérapeutiques testant l'effet de l'imatinib mésylate <i>in vivo</i>	77
Tableau 6 : Protocoles thérapeutiques testant l'effet du NVP-BEZ235 <i>in vivo</i>	77
Tableau 7 : Protocoles thérapeutiques testant l'effet du BYL719 <i>in vivo</i>	77
Tableau 8 : Protocole de coloration du Trichrome de Masson.	79
Tableau 9 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés en immunohistologie.....	80
Tableau 10 : Amorces sens (S) et anti-sens (AS) utilisées pour la PCR quantitative	84
Tableau 11 : Représentation schématique de l'organisation de la membrane préhybridée par 49 récepteurs tyrosine kinase	98
Tableau 12 : Récapitulatif des IC50 et des IC90 du NVP-BEZ235 et du BYL719 à 72 heures sur les lignées d'ostéosarcome	123
Tableau 13 : Répartition des cellules d'ostéosarcome dans le cycle cellulaire après traitement au NVP-BEZ235	125
Tableau 14 : Répartition des cellules d'ostéosarcome dans le cycle cellulaire après traitement au BYL719	126

Tableau 15 : Le NVP-BEZ235 n'a pas d'effet sur l'os trabéculaire et très peu d'effet sur l'os cortical des tibias controlatéraux de souris C57BL/6J.....	130
Tableau 16 : Le NVP-BEZ235 n'a d'effet ni sur l'os trabéculaire, ni sur l'os cortical des tibias controlatéraux de souri Nude.....	133
Tableau 17 : Le BYL719 systémique ne module pas les paramètres trabéculaires mais module les paramètres corticaux du tibia sans tumeur des souris C57BL/6J traitées.....	137
Tableau 18 : Le BYL719 systémique module les paramètres osseux trabéculaires et corticaux des tibias sans tumeur des souris Nude traitées.....	139

INTRODUCTION GENERALE

I. Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé d'origine mésenchymateuse, richement vascularisé et innervé. Il est composé de cellules spécialisées associées à une abondante matrice extracellulaire, qui, contrairement à de nombreux tissus conjonctifs de l'organisme, est minéralisée. Cette minéralisation confère au tissu osseux une rigidité qui lui assure des fonctions mécaniques. Le tissu osseux permet le soutien et la protection des organes internes, la locomotion et est un point d'ancrage au système musculaire. A ces fonctions « mécaniques » s'ajoutent des fonctions métaboliques. En effet, ce tissu est le principal réservoir d'ions minéraux de l'organisme et contribue à l'homéostasie du phosphate, du calcium, du sodium, du magnésium et d'autres ions (fluor, carbonate ...). La fonction métabolique est assurée par le remodelage osseux qui contrôle la libération et le stockage des éléments minéraux. Ce processus de remodelage, qui perdure pendant toute la vie, permet la croissance des pièces osseuses, l'adaptation du tissu osseux aux contraintes mécaniques auxquelles il est soumis ainsi que la réparation de fractures. De plus, le tissu osseux participe au contrôle de l'hématopoïèse. En effet, les os (plats, principalement) renferment dans leur espace médullaire la moelle hématopoïétique à l'origine des éléments figurés du sang.

A. Constituants du tissu osseux

Le tissu osseux est composé d'une matrice extracellulaire occupant approximativement 95 % du volume tissulaire ainsi que de cellules spécialisées (5 %) : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes (Toppets et al., 2004).

1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est composée d'une fraction organique (25 %) ainsi que d'une fraction minérale (65 %). Sa teneur en eau est approximativement de 10 % mais reste variable selon la pièce osseuse, le degré de minéralisation et l'âge (diminution de la quantité d'eau entre l'enfance et l'âge adulte).

De par leur abondance dans la fraction organique, les fibres de collagène de type I conditionnent la structure de l'os. Plus de 200 protéines (hors collagène) ont été répertoriées au sein de la matrice organique du tissu osseux. Parmi ces protéines, on trouve la fibronectine et l'élastine qui, avec le collagène, forment la substance fibrillaire. Comme le collagène, l'élastine possède un rôle structural alors que la fibronectine possède d'avantage un rôle d'organisation de la matrice extracellulaire et d'adhérence cellulaire. Cette substance fibrillaire est entourée de substance interfibrillaire, représentant 10 % de la fraction organique. Cette substance « non-collagénique » est constituée de glycoprotéines (ostéopontine ou OPN, sialoprotéine osseuse ou BSP), de protéines contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé (ostéocalcine ou OC), de phospholipides, de phosphoprotéines, de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes. Spécifique de la matrice extracellulaire, l'ostéocalcine est la plus abondante des protéines non-collagéniques. Cette protéine, marqueur de l'activité ostéoblastique, joue un rôle dans l'attraction de ostéoclastes dans les foyers de résorption ainsi que dans la minéralisation (Glowaki et al., 1991 ; Swaminathan, 2001 ; Neve et al., 2013). Plusieurs protéines « non-collagéniques » telles que l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse et la fibronectine renferment une séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD). Cette séquence RGD caractérise les protéines d'adhérence cellulaire et est reconnue par certaines protéines membranaires appelées intégrines (Ruoslahti et al., 1991). Ainsi, les intégrines présentes à la surface des ostéoblastes permettent leur attachement à la matrice extracellulaire. De plus, il a été montré récemment que la BSP est fortement

impliquée dans la différenciation des ostéoclastes et dans leur activité de résorption (Malaval et al., 2008 ; Boudiffa et al., 2010). Des facteurs de croissance et des cytokines (Transforming Growth Factor- β ou TGF- β ; Insulin-like Growth Factor ou IGF ; les interleukines ; Bone Morphogenetic Protein ou BMP) sont également présents en petites quantités dans la matrice osseuse (Hauschka et al., 1986). Ces facteurs protéiques jouent un rôle important dans l'activation et la différenciation cellulaire et interviennent dans le couplage entre formation et résorption osseuse (Heymann et Lepreux, 2008).

La fraction minérale confère à l'os sa rigidité, sa résistance mécanique ainsi que la réserve de l'organisme en minéraux. En effet, environ 99 % du calcium de l'organisme, 85 % du phosphore et entre 40 à 60 % du sodium et du magnésium sont incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse. Elle est essentiellement composée de phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite $[\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ disposés dans les espaces interfibrillaires. Ces cristaux ont une forme hexagonale et aplatie. Le nombre et la taille de ces cristaux s'accroissent lentement au cours du processus de minéralisation qui débute par la synthèse de la matrice ostéoïde par les ostéoblastes, essentiellement sous forme de collagène de type I, et est suivie par la minéralisation de cette trame collagénique (Heymann et Lepreux, 2008).

2. Les cellules spécialisées

a. Des cellules souches mésenchymateuses aux ostéocytes

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM), découvertes grâce aux travaux d'A.J. Friedenstein (Friedenstein et al., 1968), constituent un élément important de la niche hématopoïétique *in vivo* (Ehninger et Trumpp, 2011). Ces cellules ont été identifiées et

isolées principalement à partir de la moelle osseuse. Ces CSM se caractérisent par une capacité proliférative élevée et une aptitude à se différencier en différents types cellulaires dont les ostéoblastes, les adipocytes, les chondrocytes et les myocytes sous l'effet de facteurs de transcription « spécifiques » (Figure 1). Ainsi, l'expression de RUNX2 gouvernera la voie ostéoblastique, celle de PPAR γ 2 la voie adipocytaire, celle de Sox-9 la voie chondroblastique et celle de MyoD/Myf5 la voie des myocytes (Pittenger et al., 1999).

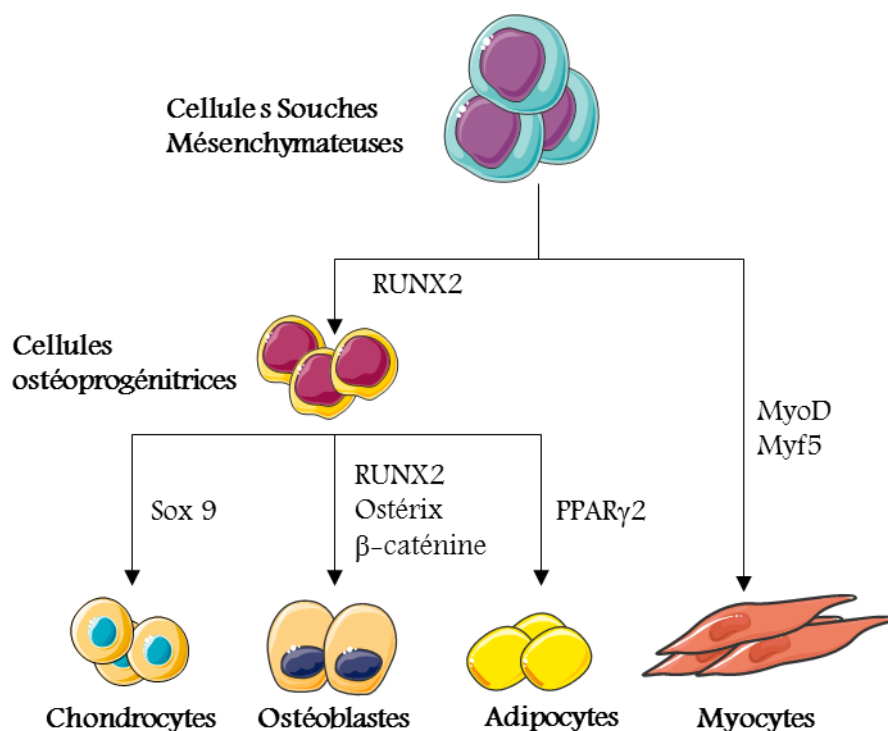


Figure 1 . Différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM). Sous l'effet de divers facteurs de transcription spécifiques, les CSM se différencient en chondrocytes (Sox 9), en adipocytes (PPAR γ 2), en ostéoblastes (RUNX2, Ostérix, β -caténine) ou en myocytes (MyoD, Myf5). Adapté de Marie, 2008. Images issues de la banque d'images Servier Medical Art.

D'origine mésodermique dans la plus grande partie du squelette, mais issus des crêtes neurales dans certains os du crâne et de la face, les progéniteurs ostéoblastiques sont donc les cellules mésenchymateuses (Owen et al., 1988). Ces cellules sont localisées dans le

stroma médullaire mais également au niveau du périoste et de l'endoste. Une série complexe d'étapes de prolifération et de différenciation conduisent aux ostéoblastes matures depuis les cellules souches mésenchymateuses (Figure 2).

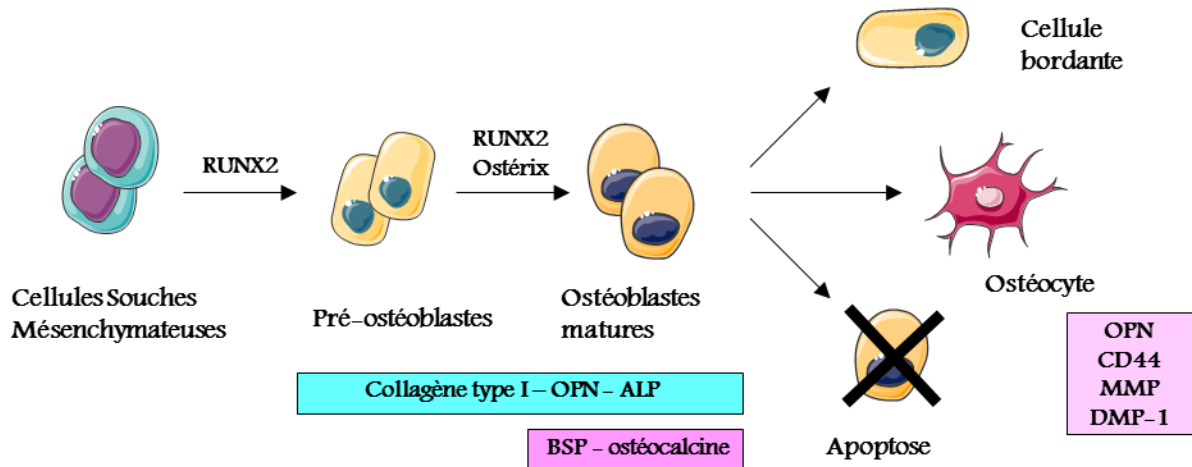


Figure 2 . La différenciation ostéoblastique. Sous l'effet de RUNX2 et d'Ostérix, les cellules souches mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes matures. La majorité des ostéoblastes vont mourir par apoptose ; cependant, certains ostéoblastes se différencient en ostéocytes ou s'inactivent et deviennent des cellules bordantes. Les ostéoblastes expriment des marqueurs spécifiques : collagène de type I, ostéopontine, ALP (Alkaline Phosphatase), BSP (Bone SialoProtein) et ostéocalcine. Suite à leur différenciation terminale, les ostéocytes perdent ces marqueurs (sauf l'ostéopontine) mais en acquièrent de nouveaux : CD44 (récepteur de l'acide hyaluronique), MMP (Matrix MetalloProteinase) et DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1). Images issues de la banque d'images Servier Medical Art.

L'engagement de précurseurs vers la voie ostéoblastique implique également de nombreux facteurs de transcription. Ainsi, l'importance du complexe AP-1 (Activating protein-1 ; Eferl et Wagner, 2003), constitué de facteurs de transcription de la famille FOS/JUN/ATF (Activating Transcription Factor)/MAF (Musculo Aponeurotic Fibrosarcoma) sous forme d'homo ou hétérodimères, a été mise en évidence dans le tissu osseux. Dans un modèle murin présentant une surexpression ubiquitaire de c-Fos, 100 % des souris développent une tumeur osseuse ostéogène (Grigoriadis et al., 1993). La surexpression de c-Fos le rend majoritairement disponible pour former AP-1, ce qui induit une prolifération continue des

ostéoblastes, leur transformation puis la survenue de tumeurs osseuses (Grigoriadis et al., 1993) (Wagner, 2002). L'activité de ce complexe AP-1, très intense dans les ostéoblastes en prolifération, diminue fortement lors de leur différenciation terminale. A l'inverse, des souris *Fos*^{-/-} présentent un retard de croissance, une ostéopétrose, maladie métabolique osseuse autosomique provoquée par une anomalie fonctionnelle des ostéoclastes à l'origine de la persistance de cartilage calcifié dans l'os trabéculaire, ainsi que des défauts du remodelage osseux et une hématopoïèse altérée (Wang et al., 1992).

Les ostéoblastes différenciés sont des cellules mononucléées de forme cuboïdale, disposées en une monocouche cellulaire à la surface osseuse. Leur cytoplasme renferme un abondant réticulum endoplasmique granuleux responsable d'une importante basophilie du cytoplasme associée à une réactivité forte pour la phosphatase alcaline, de nombreuses mitochondries et un appareil de Golgi très développé, témoins d'une activité de synthèse protéique importante. De plus, le cytoplasme renferme des vésicules de calcium qui permettront la minéralisation de la matrice préalablement synthétisée (chez l'homme en moyenne 10-20 jours après la déposition de la matrice). Ces cellules ont donc pour fonction principale la synthèse de la substance ostéoïde, matrice organique qui sera minéralisée par la précipitation à la surface et entre les fibres de collagène de type I de cristaux de phosphate de calcium. A l'issue de la période de formation osseuse, la majorité des ostéoblastes meurent par apoptose (65 %). Dans le cas contraire, les ostéoblastes peuvent devenir des cellules bordantes ou subir une différenciation terminale en ostéocytes.

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes inactivés ou quiescents et forment une monocouche de cellules aplaties le long des pièces osseuses. Leur cytoplasme étant pauvre en organites (faible nombre de mitochondries et faible quantité de réticulum endoplasmique rugueux en particulier), l'activité métabolique de ces cellules est très réduite (Rodan, 1992). Chez l'adulte, seulement 15 % des surfaces trabéculaires sont recouvertes d'ostéoblastes

actifs. Le reste des surfaces osseuses est recouvert de cellules bordantes. Ces cellules ont pour principale fonction d'assurer la communication entre la surface osseuse, l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse. De plus, sous l'influence de stimuli, les cellules bordantes sont capables de se multiplier et de se re-différencier en ostéoblastes actifs (Chow et al., 1998) et/ou de jouer également un rôle durant la phase initiale du remodelage osseux. Sous l'effet de certains signaux, elles subissent un phénomène de migration/rétractation, se détachent et libèrent ainsi la surface osseuse, permettant l'attraction et l'ancrage des ostéoclastes (Chambers & Fuller, 1985).

Les ostéocytes proviennent de la différenciation terminale de certains ostéoblastes, emmurés au sein de la matrice osseuse, à l'intérieur de lacunes péri-ostéocytaires appelées ostéoplastes (Figure 3).

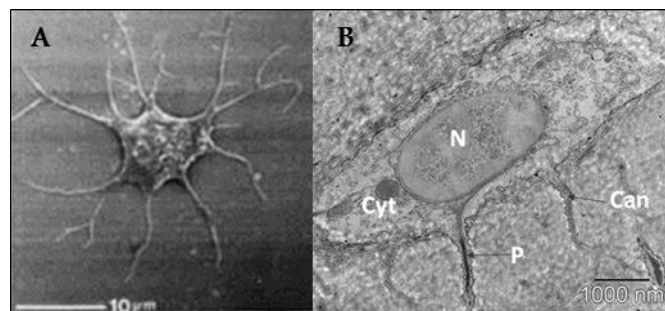


Figure 3 : L'ostéocyte. (A) Observation d'un ostéocyte en microscopie à balayage (1 cm = 10 µm ; Tanaka-Kamioka et al., 1998). (B) Observation d'un ostéocyte par microscopie à transmission (1 cm = 1 µm). Can = canalicule, Cyt = cytoplasme, N = noyau, P = prolongement cytoplasmique (Thompson et al., 2012).

La transformation de l'ostéoblaste en ostéocyte s'accompagne d'une diminution progressive de certains marqueurs ostéoblastiques tels que l'ALP (Alcaline Phosphatase), le collagène de type I, la BSP et l'OC, du maintien de certains marqueurs tel que l'ostéopontine et de l'apparition de nouveaux facteurs tels que le CD44 (récepteur de l'acide hyaluronique, liant

également l'ostéopontine, certains collagènes, certaines MMP (ou Matrix MetalloProteinase) et la DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1) (Franz-Odendaal et al., 2006 ; Rochefort et al., 2010). Au cours de cette différenciation, les ostéocytes perdent une grande quantité de leurs organites. Possédant de nombreux prolongements cytoplasmiques, les ostéocytes établissent entre eux un contact et communiquent avec les cellules bordantes recouvrant la surface osseuse. Les substances nutritives, véhiculées par voie endocrine, atteignent les ostéocytes en diffusant soit dans les canalicules autour des prolongements cellulaires, soit dans les cellules elles-mêmes, passant de l'une à l'autre par des jonctions communicantes. Les ostéocytes interviennent essentiellement dans la transmission des signaux mécano-sensoriels durant le remodelage osseux et dans les échanges entre les cellules et le microenvironnement (Aarden et al., 1994). En effet, ces cellules interagissent avec les fibres de collagène tapissant les ostéoplastes, par l'intermédiaire de molécules de type intégrine, et fonctionnent comme des mécanorécepteurs, percevant les modulations des contraintes mécaniques appliquées à l'os. Ils transmettent ensuite les informations aux ostéoblastes et aux cellules bordantes par l'intermédiaire des jonctions communicantes, assurant une adaptation fonctionnelle du tissu osseux (Bonewald et Johnson, 2008). Par ailleurs, les ostéocytes régulent la formation osseuse via la sécrétion de sclérostine (Poole et al., 2005). En effet, la sclérostine est connue pour être un antagoniste de la voie Wnt, ainsi, cette protéine régule négativement l'activité et la différenciation des ostéoblastes. Enfin, les ostéocytes sont fortement impliqués dans la régulation des ostéoclastes. En effet, les ostéocytes sont les producteurs majeurs de RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand), indispensable à l'ostéoclastogenèse (Nakashima et al., 2011). De plus, il semblerait que l'apoptose des ostéocytes soit le facteur déclenchant l'ancrage des ostéoclastes à la surface osseuse et par conséquent, la mise en place du processus de résorption (Gu et al., 2005).

b. Des cellules souches hématopoïétiques aux ostéoclastes

Seules cellules de l'organisme capable de résorber la matrice osseuse, les ostéoclastes sont des cellules géantes (de 50 à 100 μm de diamètre) plurinucléées (de 4 à 20 noyaux ; Figure 4).

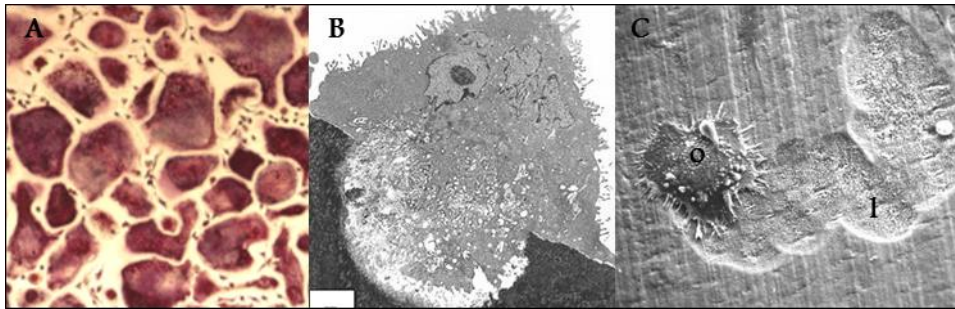


Figure 4 . L'ostéoclaste. (A) Coloration cytochimique TRAP d'ostéoclastes différenciés à partir de monocytes humains CD14⁺ en présence de M-CSF et de RANKL. (B) Observation d'un ostéoclaste en cours de résorption par microscopie à transmission (Heymann et Rousselle, 2000). (C) Observation d'un ostéoclaste (o) et de sa lacune de résorption (l) en microscopie à balayage (<http://www.atpbone.org>).

Ces cellules possèdent un appareil de golgi extrêmement développé ainsi que de nombreuses mitochondries péri-nucléaires fournissant l'énergie nécessaire aux cellules pour dégrader la matrice osseuse extracellulaire. De plus, les ostéoclastes sont riches en enzymes lysosomales telles que la TRAP (Tartrate Resistant Acide Phosphatase), la cathepsine K, ainsi qu'en collagénases (surtout la MMP-9) nécessaires à son activité de dégradation osseuse (Wittrant et al., 2003). Seuls les ostéoclastes matures sont capables de résorber la matrice osseuse (Nicholson et al., 2000).

Contrairement aux ostéoblastes qui dérivent des cellules souches mésenchymateuses, les ostéoclastes dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) par un processus physiologique appelé l'ostéoclastogenèse (Figure 5).

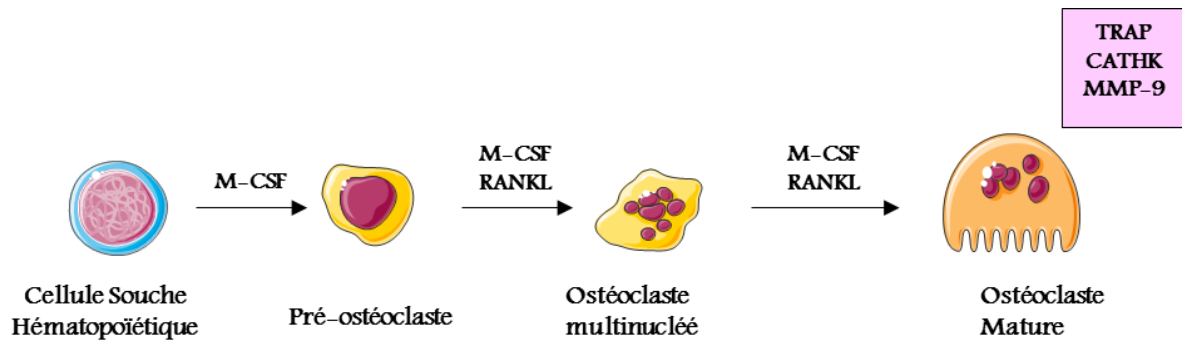


Figure 5 : L'ostéoclastogenèse. Sous l'effet du M-CSF et du RANKL, les cellules souches hématopoïétiques se différencient en ostéoclastes multinucléés. Les ostéoclastes matures (activés) expriment des marqueurs spécifiques : TRAP (Tartrate Resistant Acid Phosphatase), CATHK (cathepsine K) et MMP-9 (Matrix MetalloProteinase-9). Images issues de la banque d'images Servier Medical Art.

Les CSH donnent naissance aux cellules circulantes mononucléées appelées CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage). Un pool de ces précurseurs est maintenu grâce à une cytokine appelée M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) qui en se fixant à son récepteur, le M-CSFR, permet leur prolifération et leur survie. Ces précurseurs ou monocytes vont alors migrer par chimiotactisme sur un futur site de résorption. RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand) est un facteur pro-résorptif exprimé à la membrane des ostéoblastes et des cellules stromales ou bien sécrété sous forme soluble dans l'espace extracellulaire. Sous l'action de facteurs de transcription [PU-1, c-Fos, NFκB, NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T Cells, c1)], du M-CSF et du RANKL, les précurseurs mononucléés, exprimant les récepteurs de ces deux cytokines, vont se différencier en pré-ostéoclastes mononucléés, qui vont alors fusionner. RANKL va activer les ostéoclastes multinucléés, ce qui a pour conséquence la formation, au niveau du pôle basal cellulaire d'une membrane plissée appelée bordure en brosse (Lacey et al., 1998 ; Suda et al., 1999). Afin de maintenir une régulation fine de la différenciation ostéoclastique, il existe un troisième facteur, l'ostéoprotégérine (OPG), également sécrétée par les ostéoblastes. L'OPG agit comme un récepteur leurre pour le RANKL, faisant de cette molécule un facteur anti-

résorptif. L'OPG prévient donc la formation et la maturation des ostéoclastes. En d'autres termes, la balance RANKL/OPG est indispensable dans le contrôle de l'ostéoclastogénèse.

La résorption débute lorsque l'ostéoclaste adhère à la matrice osseuse. Durant la première phase de ce processus, une réorganisation du cytosquelette est observée. Ce phénomène permet la mise en place d'une zone dépourvue d'organite intercellulaire et riche en filament d'actine appelée « zone claire » (Lakkakorpi and Vaananen, 1996 ; Jurdic et al., 2006). Ainsi, la membrane plasmique ostéoclastique est en contact avec la matrice osseuse, délimitant un compartiment rendu hermétique par la présence d'anneaux d'actine, entre la bordure en brosse et la surface osseuse, appelé chambre de résorption (Holtrop and King, 1977). La résorption s'effectue en deux étapes : la dissolution de la matrice minérale précède la dégradation de la phase organique (Rousselle et Heymann, 2002) (Figure 6).

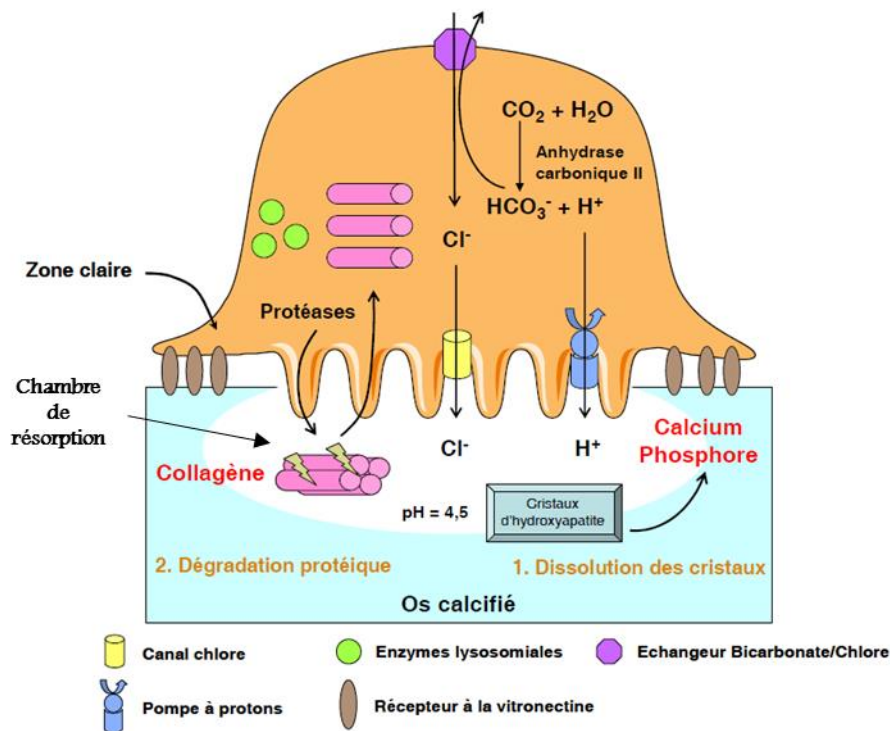


Figure 6 . Représentation d'un ostéoclaste activé. Après adhérence à la matrice, l'ostéoclaste va créer un environnement acide (libération de protons) au niveau de la chambre de résorption. Cette acidité va dissoudre la matrice minérale (1), entraînant un relargage massif de calcium et de phosphate. Des protéases vont dégrader la matrice organique (2) (Heymann et Rousselle, 2002).

Les protons produits sous l'action d'une anhydrase carbonique de type II sont expulsés sous la bordure en brosse par des pompes à protons membranaires dépendantes de l'ATP (Holliday et al., 2005). La libération des protons fait chuter le pH de l'environnement sous-ostéoclastique, induit la dissolution des phases minérales du tissu osseux et constitue un environnement optimal pour l'activité des enzymes comme la cathepsine K. L'ostéoclaste libère alors de nombreuses enzymes lysosomales qui vont dégrader les éléments de la matrice organique, formant alors une lacune de Howship. Parmi les ions libérés, le calcium induit une dépolarisation des filaments d'actine de la zone claire et un détachement des ostéoclastes, qui se déplacent à la surface du tissu osseux notamment grâce à la MMP-9 pour résorber une zone contiguë (Chellaiah et al., 2006). Une partie des produits de dégradation de la matrice organique est endocytée par l'ostéoclaste pour être métabolisés, amenés jusqu'à la membrane apicale par transcytose puis relargués dans la circulation sanguine sous forme de fragments digérés.

B. Le remodelage osseux

La masse osseuse augmente progressivement pendant 20 à 30 ans, se stabilise quelques années avant de diminuer lentement jusqu'à la fin de notre vie. L'os est le siège d'un remaniement permanent, tout au long de notre vie. Par an, on estime que 10 % du tissu osseux adulte est renouvelé. Le remodelage osseux est indispensable à l'adaptation aux contraintes mécaniques, à la cicatrisation en cas de fractures mais également indispensable à l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme (avec l'intestin et les reins). A chaque instant, environ 5 % des surfaces intracorticales et 20 % des surfaces trabéculaires sont le siège d'un remodelage. Ce processus est complexe et suit une chronologie bien établie. Le remodelage osseux se divise en une succession de 4 phases bien définies, chaque cycle étant

captation de ce signal conduirait à la dégradation de la fine couche de matrice non minéralisée située sous les cellules bordantes, exposant ainsi la matrice minéralisée à l'action des ostéoclastes. Les cellules bordantes ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se multiplier ou se différencier à nouveau en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires. Lors de la phase d'activation, sous l'action des facteurs ostéo-résorbants (PTH ou ParaTHormone, vitamine D3, ...), les ostéoblastes se rétractent et laissent la place aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui peuvent adhérer à la matrice.

Phase de résorption. Cette phase dure environ trente jours et débute par l'activation des précurseurs ostéoclastiques présents dans la moelle osseuse, au niveau du site de remodelage, et conduit à leur différenciation en ostéoclastes matures et à leur attachement sur la surface osseuse. Les ostéoblastes situés à proximité des pré-ostéoclastes vont favoriser leur différenciation en ostéoclastes matures via la production de différentes cytokines telles que l'IL-6 (InterLeukine 6), le M-CSF ou encore RANKL, qui sont des facteurs pro-résorptifs. Une fois adhérent à la matrice par interactions moléculaires fortes, l'ostéoclaste mature va procéder à la dégradation de cette dernière au niveau de la chambre de résorption.

Phase d'inversion. Le couplage entre résorption et formation intervient durant la phase de transition. La dégradation de la matrice entraîne une augmentation du taux de calcium intracellulaire des ostéoclastes, provoquant une désorganisation des podosomes et par conséquent le détachement de l'ostéoclaste. Les ostéoclastes qui se détachent de la surface osseuse meurent par apoptose, en partie médiée par le système Fas/Fas ligand (Wu et al., 2003). Ces ostéoclastes sont alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents au fond de la lacune. Il a été suggéré que les facteurs favorisant la formation osseuse seraient intégrés dans la matrice osseuse et relargués durant la phase de résorption. Cela concernerait en

particulier les IGF, le FGF (Fibroblast Growth Factor), le TGF- β , les BMP et le PDGF (Platelet Derived Growth Factor). La surface osseuse ainsi libérée par les ostéoclastes, ou lacune de Howship, est riche en éléments, tels que l'ostéopontine, qui activeraient les ostéoblastes.

Phase de formation. Elle débute par la prolifération des cellules ostéoprogénitrices qui vont venir tapisser le fond de la lacune de Howship, dans le but de combler cette lacune. Les ostéoblastes vont alors synthétiser une nouvelle matrice collagénique non-minéralisée. Puis, après un délai de 10 à 15 jours, le tissu ostéoïde se minéralise par l'apposition de cristaux d'hydroxyapatite dans les espaces interfibrillaires du collagène. Cette étape de minéralisation comporte une phase rapide appelée minéralisation primaire, qui se poursuit plus lentement pendant une durée variable appelée minéralisation secondaire. La durée de la minéralisation secondaire est liée à la fréquence du remodelage. La phase d'ostéoformation dure de 4 à 5 mois.

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

II. Pathologies osseuses

A. Les tumeurs osseuses

1. Les tumeurs osseuses primitives

Le maintien de l'homéostasie phosphocalcique et de la masse osseuse au cours de la vie est rendu possible par un équilibre entre la résorption du tissu osseux ancien et son remplacement par un nouveau tissu ostéoïde minéralisé (Manolagas, 2000 ; Raggatt et Partridge, 2010). Tout déséquilibre entre l'activité ostéoclastique et l'activité ostéoblastique engendre l'apparition de pathologies ostéocondensantes (ostéopétrose, ostéosarcome) et/ou ostéolytiques, pouvant être tumorales (cancer du sein par exemple) ou non (ostéoporose).

Les tumeurs osseuses primitives sont des pathologies rares qui peuvent être bénignes ou malignes. Les tumeurs bénignes sont plus fréquentes que les malignes. Elles peuvent s'observer à tout âge avec néanmoins une prédilection pour chez l'enfant et le jeune adulte. Les tumeurs bénignes sont principalement classées selon la nature du tissu qu'elles produisent :

- Production de tissu osseux : ostéome ostéoïde, ostéoblastome.
- Production de cartilage : chondrome, ostéochondrome.
- Production de tissu conjonctif indifférencié : fibrome non ossifiant.
- Tumeurs à cellules géantes.

Avec 300 nouveaux cas par an en France, les tumeurs osseuses primitives malignes représentent moins de 1 % de l'ensemble des cancers humains et 10 % des cancers pédiatriques et du jeune adulte. Cependant, il existe un deuxième pic d'incidence vers 60 ans où les tumeurs sont consécutives à une première pathologie telle que la maladie de

Paget. Tout comme les tumeurs bénignes, ces tumeurs peuvent être classifiées selon le type de tissu qu'elles produisent :

- Production de tissu osseux : ostéosarcome.
- Production de cartilage : chondrosarcome.
- Production de tissu conjonctif indifférencié : fibrosarcome.
- Production de cellules dérivées de la moelle osseuse : sarcome d'Ewing, lymphome de Parker et Jackson, myélome multiple.

L'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing représentent 90 % de l'ensemble des tumeurs osseuses primitives malignes pédiatriques (Descandes et al., 2004). Parmi ces tumeurs, certaines sont ostéolytiques, d'autres ostéocondensantes et d'autres hétérogènes, ce qui rend leur classification très complexe.

2. Les tumeurs osseuses secondaires

Le tissu osseux est le réservoir de minéraux mais aussi de facteurs de croissance de l'organisme. Les tumeurs osseuses secondaires sont les métastases osseuses, qui peuvent être ostéolytiques ou ostéocondensantes. Les métastases osseuses sont issues d'autres cancers primaires, majoritairement d'origine non osseuse, mais peuvent aussi se développer dans le sarcome d'Ewing ainsi que dans l'ostéosarcome. Bien que la majorité des cancers puissent métastaser à l'os, les cancers du sein, de la prostate, du poumon et du rein privilégient l'os comme site secondaire de développement. Le développement de métastases osseuses repose sur l'existence d'un cercle vicieux entre la tumeur et son microenvironnement (Clézardin et Téli, 2007).

B. L'ostéosarcome

En paléopathologie, plusieurs auteurs ont rapporté des cas de tumeurs osseuses primitives, y compris chez certains dinosaures. De rares cas d'ostéosarcomes ont été décrits chez des momies de l'Égypte ancienne, de populations péruvienne et romaine antique (Capasso et al., 2005 ; Minozzi et al., 2012 ; Figure 8).

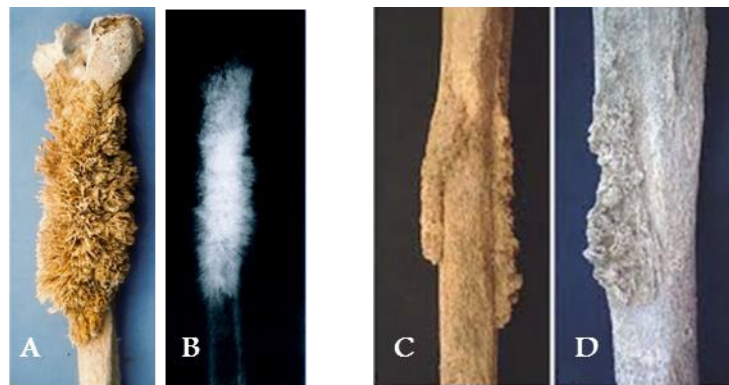


Figure 8 . Paléopathologie . existence ancestrale des ostéosarcomes. Photographie (A) et radiographie (B) d'un ostéosarcome du fémur dit « en feu d'herbe » découvert chez une momie péruvienne lors d'une autopsie réalisé par le paléopathologiste A. Aufderheide en 1990 [800 B.P. (Before Present) = 1150 après J.C. (Jésus Christ) ; Capasso, 2005]. Photographies, vues antérieure (C) et postérieure (D), d'un ostéosarcome affectant le tiers proximal du tibia d'un adulte mâle de la nécropole impériale de Castel Malnome en Italie (I à II siècle A.D. ; Minozzi et al., 2012).

1. Généralités

L'ostéosarcome est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales (Fletcher et al., 2012).

L'ostéosarcome touche préférentiellement la métaphyse des os longs. En effet, les localisations diaphysaires représentent moins de 10 % et les localisations épiphysaires sont encore plus rares. Il se localise surtout au genou, à l'extrémité inférieure du fémur (40 %) et

à l'extrémité supérieure du tibia (15 %), puis à l'extrémité supérieure du fémur et de l'humérus (14 %), sites correspondant aux segments osseux dont la croissance est la plus importante de l'organisme. Les os plats et les os courts sont plus rarement touchés. Le crâne et la face sont atteints dans moins de 10 % des cas, préférentiellement à la voûte et la base du crâne, ainsi que la mandibule. Des cas d'ostéosarcomes ont été rapportés pour tous les os du squelette, même pour les sésamoïdes (Guinebretière et al., 2001 ; Fletcher et al., 2012).

En fonction de leur localisation au niveau du tissu osseux, 3 groupes sont définis : les ostéosarcomes de surface (juxtacorticaux), intracorticaux et intramédullaires (ou centraux) (Figure 9). Avec seulement des observations isolées, les ostéosarcomes intracorticaux sont extrêmement rares. Les ostéosarcomes développés à la surface de l'os (parostéal, périosté et de haut grade) sont généralement de bon pronostic. Les ostéosarcomes centraux sont les plus fréquents. Ils regroupent différentes variantes histologiques qui, à l'exception de la forme dite «bien différenciée intramédullaire», sont toutes de haute malignité. Parmi ces variantes, on peut noter la forme commune l'ostéosarcome télangiectasique, l'ostéosarcome à petites cellules rondes et l'ostéosarcome bien différencié intramédullaire :

- la forme commune ou conventionnelle, classée par Dahlin selon le contingent cellulaire prédominant, est de loin la plus fréquente (Unni, 1996). La variante ostéoblastique représente environ 50 % des cas, les variantes chondroblastique et fibroblastique 25 % chacune.

- la fréquence de l'ostéosarcome télangiectasique varie selon les séries entre 2 et 10 % (différences liées aux critères anatomo-radiologiques retenus). Des lésions purement lytiques et expansives sur la radiographie sont à l'origine de fréquentes fractures pathologiques. Son aspect lors de la biopsie et en macroscopie est celui d'une lésion multilobée à contenu hémorragique.

- l'ostéosarcome à petites cellules rondes a un aspect radiographique hétérogène. La tumeur est constituée de petites cellules tumorales aux noyaux arrondis, au cytoplasme peu abondant et aux limites imprécises, similaire au sarcome d'Ewing.

- l'ostéosarcome bien différencié intramédullaire est caractérisé par sa localisation intramédullaire, un envahissement des parties molles absent ou limité et son aspect histologique bien différencié.

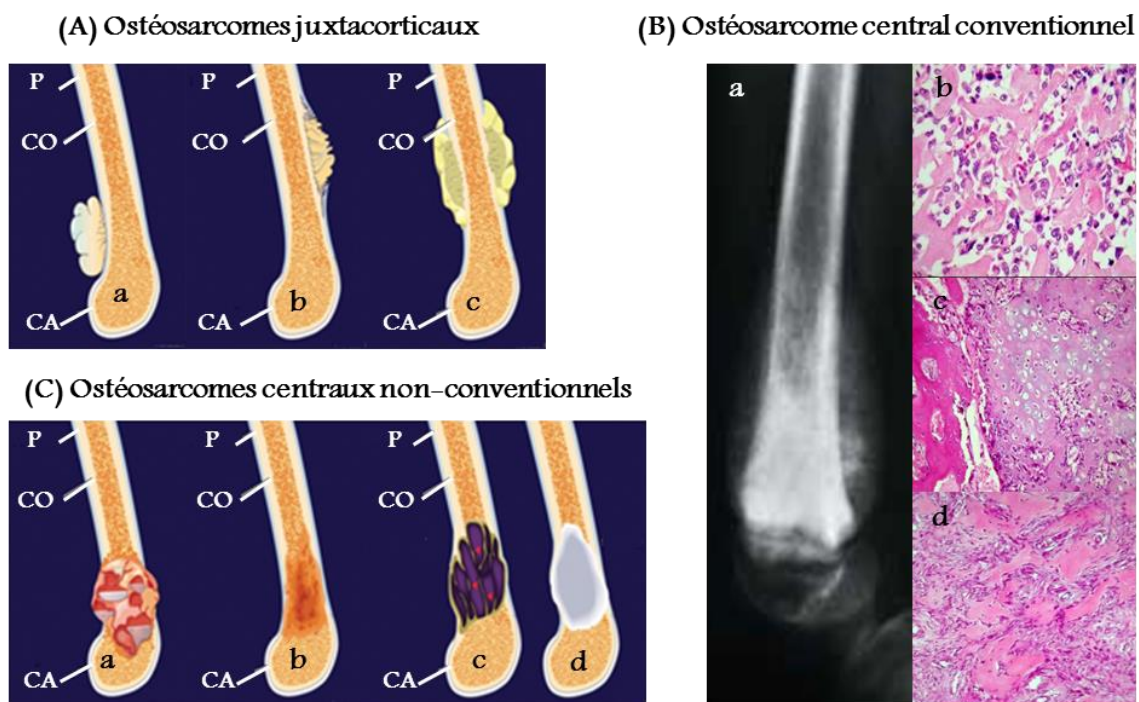


Figure 9 : Classification des ostéosarcomes. (A) Ostéosarcomes juxtacorticaux : parostéal (a), périosté (b) et de haut grade de surface (c). (B) Ostéosarcome central conventionnel. (a) radiographie du fémur distal d'un ostéosarcome conventionnel ostéoblastique ; Sous-types histologiques : (b) ostéoblastique, (c) chondroblastique et (d) fibroblastique. (C) Ostéosarcomes centraux non-conventionnels : (a) télangiectasique, (b) à petites cellules rondes et de bas grade lytique (c) et sclérotique (d). D'après Yarmish et al., 2010 et Fletcher et al., 2002 (9Ca). P = Périoste, CO = Corticale, CA = Cartilage.

Le site préférentiel de métastases de l'ostéosarcome est le poumon. Le développement de nodules pulmonaires entraîne de graves problèmes respiratoires causant le décès du patient. Dans de rares cas, des métastases osseuses peuvent être détectées.

2. Epidémiologie

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuse primitive maligne avec une incidence annuelle d'environ 4,8 nouveaux cas par million d'enfants de moins de 20 ans aux Etats-Unis (Linnet et al., 1999) et 3,6 nouveaux cas par million d'enfant de moins de 15 ans en France (Hauben et Hogendoorn, 2010). L'ostéosarcome survient plus généralement sur une population jeune, 75 % d'ostéosarcomes étant diagnostiqués entre 8 et 25 ans, avec un pic d'incidence observé à l'âge de 18 ans avec une relative prédominance masculine (sex-ratio moyen de 1,4 : 1). Il est rare avant 10 ans, exceptionnel avant 5 ans, mais aussi très rare après 60 ans où il survient généralement suite à une première pathologie ou après une radiothérapie.

3. Etiologie

Bien que les causes exactes de la survenue des ostéosarcomes ne soient pas connues à ce jour, l'âge de survenue au moment de la poussée de croissance pubertaire, la localisation souvent métaphysaire de ces tumeurs, ainsi que l'incidence élevée de l'ostéosarcome chez les chiens de grande taille suggèrent un lien entre la croissance osseuse et la survenue des ostéosarcomes (Guinebretière et al., 2001). L'ostéosarcome secondaire se rencontre chez l'adulte ayant préalablement développé une dysplasie fibreuse, une tumeur à cellules géantes, ou bien une maladie osseuse sous-jacente comme la maladie de Paget ou suite à une

radiothérapie (Guinebretière et al., 2001). L'ostéosarcome est très rarement familial, cependant, quelques cas d'ostéosarcomes congénitaux ont été décrits (Lynch et al., 2003 ; Picci, 2007). Il survient dans un tableau de tumeurs multiples de différentes variétés histologiques et correspond à la présence d'un gène de prédisposition aux tumeurs (Hauben et al., 2003). On peut citer (i) le syndrome de Li-Fraumeni qui correspond à une anomalie innée de l'un des allèles du gène p53, où l'enfant développe de multiples tumeurs aussi bien sarcomateuses (os et tissus mous) que carcinomateuses ; (ii) le rétinoblastome, maladie caractérisée par des tumeurs oculaires bilatérales, avec une incidence des ostéosarcomes 100 fois plus fréquente que dans la population normale (Chauveinc et al., 2001).

Les ostéosarcomes dérivent du mésoderme et il semble qu'ils soient directement issus des cellules souches mésenchymateuses orientées dans une différenciation ostéogène à des stades variables de cette différenciation (Mohseny et Hogendoorn, 2011). En effet, comme les ostéoblastes, les ostéosarcomes expriment RUNX2 (Wagner et al., 2011), ALP, OC et BSP. Les ostéosarcomes résulteraient ainsi d'une dérégulation du programme de différenciation des CSM. Au sein de ces tumeurs, différents degrés de différenciation peuvent être retrouvés, selon le degré de différenciation de la cellule affectée par la transformation tumorale. De manière générale, il semble apparaître une corrélation inverse entre le degré de dédifférenciation et le pronostic (Wagner et al, 2011).

La complexité de l'ostéosarcome repose sur une diversité d'aberrations génétiques et de voies de signalisation impliquées. Cependant, aucune anomalie génétique décrite ne semble définir spécifiquement la pathologie. Dans l'ostéosarcome, une fréquente atteinte des loci des gènes *TP53* (environ 50 % des patients) (Sandberg et Bridge, 2003) et *RBI* (gène du rétinoblastome, environ 70 % des patients) a été observée (Fuchs and Pritchard, 2002 ; Wadayama et al., 1994). Une étude réalisée sur une population réduite de 29 patients atteints d'ostéosarcome a ainsi montré que 38 % d'entre eux présentent une ou plusieurs

altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle de la transition G1/S, et donc dans l'entrée dans le cycle cellulaire (López-Guerrero et al, 2004). Il s'agit principalement de mutations du gène *RBI*, *TP53*, et/ou de l'amplification des gènes *MDM2* (inhibiteur de p53) et *CDK4* (Cyclin Dependent Kinase 4 ; nécessaire à la transition G1-S) ainsi que la perte du locus *Cdkn2*, codant physiologiquement pour p14 (inhibiteur de *MDM2*) et p16 (inhibiteur de *CDK4*) (Mohseny et al., 2009). Une surexpression du proto-oncogène *c-Myc* (contrôle de la prolifération/différenciation, adhérence et apoptose) (Sandberg et Bridge, 2003) ainsi que du facteur de transcription AP-1 (homo ou hétérodimère de *c-Jun* et *c-Fos* régulant des gènes essentiels pour la prolifération et la différenciation des ostéoblastes) (Papachristou et al., 2003) a également été observée dans des ostéosarcomes. Plus récemment, Choy et ses collaborateurs ont réalisé une étude de 961 mutations sur 89 gènes différents sur un ensemble de 98 ostéosarcomes : 14 mutations au total ont été détectées, dont *TP53* et *RBI* mais également 3 mutations différentes de *PIK3CA* (codant pour PI3K p110 α ; Phosphatidylinositol-3-Kinase, kinase impliquée dans de multiples processus cellulaires), dont 2 reconnues pour être fortement impliquées dans de nombreux cancers (H1047R et E545K) (Choy et al., 2012).

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

atteinte du locus du gène *KIT* codant un récepteur tyrosine kinase avec un rôle central dans la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire, a été mise en évidence dans les ostéosarcomes de haut grade. En effet, 39 % des patients inclus dans cette étude présentaient une altération de ce locus en corrélation avec une surexpression de la protéine c-KIT, conduisant à un mauvais pronostic vital (Entz-Werlé et al., 2005).

Le manque de données sur les mécanismes moléculaires augmente la difficulté du diagnostic ainsi que le développement d'approches thérapeutiques ciblées. Toutefois la présence de ces altérations génétiques a pu être corrélée à l'agressivité des tumeurs et à la survie des patients (Wu et al., 2012). De plus, la détection de MDM2 et CDK4 par immunohistochimie est utilisée comme marqueur pour le diagnostic des ostéosarcomes de bas grade, permettant de les différencier des lésions fibreuses bénignes et des lésions fibro-osseuses dans le cas de tableaux radiologiques ou cliniques atypiques (Dujardin et al., 2011).

4. Le cercle vicieux « tumeur-niche tumorale »

La croissance des cellules tumorales entraîne une dérégulation de l'activité des cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes), promue la néoangiogenèse et altère l'immunité locale, favorisant ainsi la survie, la croissance et la dissémination métastatique des cellules tumorales. Comme vu précédemment, la croissance de l'ostéosarcome est associée à une formation directe de tissu ostéoïde tumoral ainsi qu'à une formation de plage de lyse, résultant d'une hyperactivation des ostéoclastes : un cercle vicieux s'est établi entre la progression tumorale et le tissu osseux (Figure 10). En effet, les cellules tumorales sécrètent des facteurs pro-ostéoclastiques dont des cytokines [TNF α et β (Tumor Necrosis Factor α et β), IL-1, IL-6 ...], un peptide apparenté à la parathormone ou PTHrP (ParaTHormone related Peptide), des facteurs de croissance tel que le TGF- β mais aussi des

facteurs pro-ostéoblastiques tels les BMP, IGF et Wnts. L'action de ces différents facteurs sur les ostéoclastes est soit directe, soit indirecte via les ostéoblastes (producteur de la cytokine RANKL) et permet d'activer les ostéoclastes grâce à l'interaction RANK/RANKL. La résorption de la matrice osseuse va alors libérer des facteurs pro-tumoraux (IGF-1, TGF- β , Ca²⁺...), qui vont alors activer la prolifération tumorale.

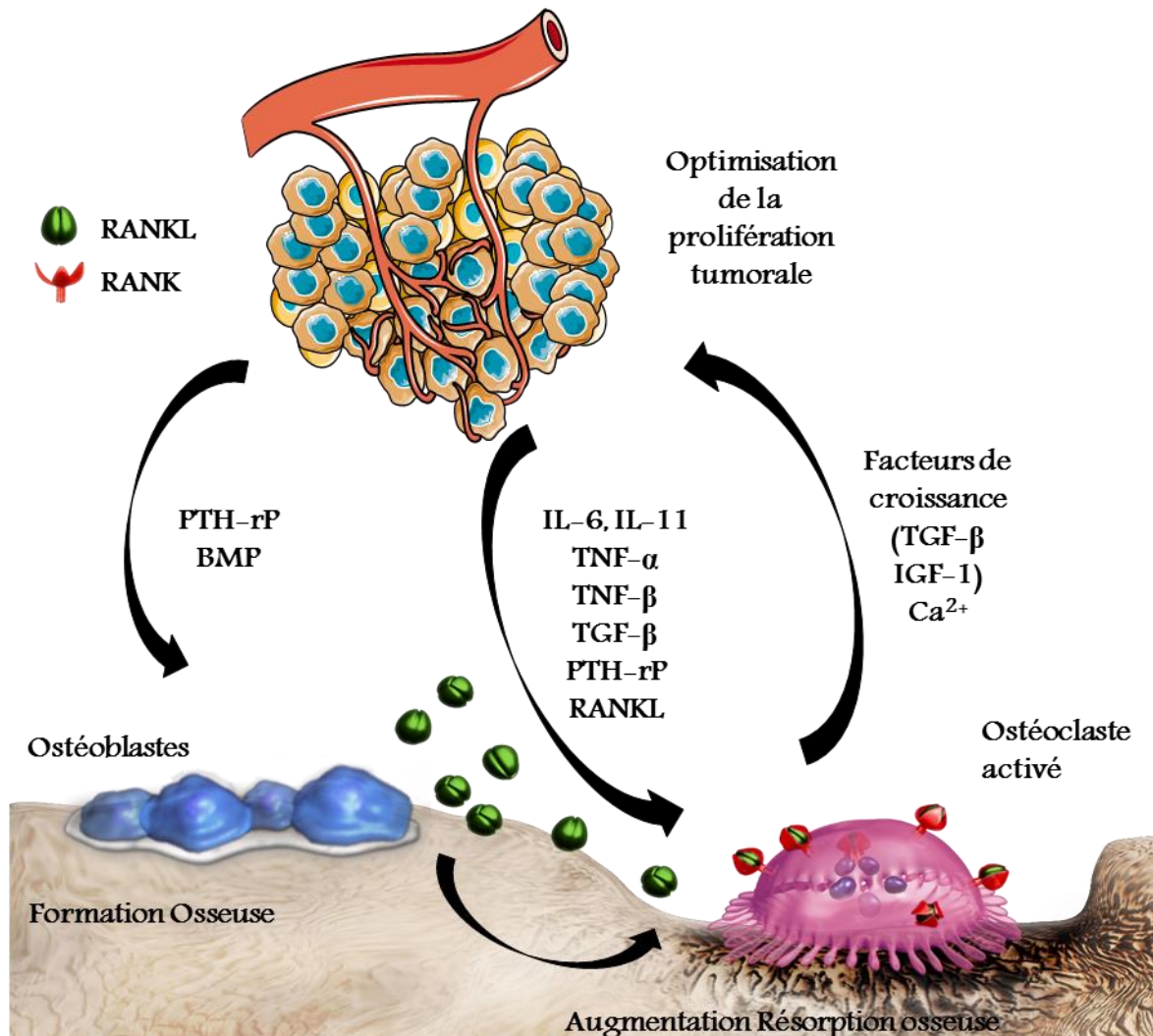


Figure 10 . Mise en place d'un cercle vicieux entre les cellules tumorales et le microenvironnement. Les cellules tumorales sécrètent des facteurs pro-ostéoclastiques dont des cytokines [TNF α et β (Tumor Necrosis Factor α et β), IL-1, IL-6, PTHrP (ParaTHormone related Peptide), TGF- β (Transfoming Growth Factor- β) et BMP (Bone Morphogenic Protein) ...] qui activent les ostéoclastes directement ou indirectement (via les ostéoblastes). En retour, la dégradation de la matrice osseuse libère des facteurs pro-tumoraux, qui induisent la prolifération tumorale (facteurs de croissances et Ca²⁺). Adaptation de Lamoureux et al., 2010.

5. Diagnostic

La faible fréquence des ostéosarcomes et leur extrême diversité anatomopathologique rendent leur étude complexe pour le cancérologue généraliste. Le diagnostic repose sur des méthodes d'investigations complémentaires incluant l'imagerie, la chirurgie et l'histologie.

La principale manifestation clinique de l'ostéosarcome est la douleur osseuse irradiant vers les articulations voisines, avant même qu'une masse soit palpable. Cette douleur peut être liée à des micro-fractures de stress (affaiblissement de l'os) voire à des fractures pathologiques. Une masse palpable apparaît plus tardivement, sensible à la palpation et pouvant gêner la mobilité de l'articulation selon la taille. Les signes systémiques tels que la perte de poids ou la fièvre sont très rares (Picci, 2007). A un stade plus tardif, des signes inflammatoires cutanés et une stase veineuse sont visibles.

L'examen médical initial est la radiographie conventionnelle de l'os douloureux dans son intégralité et de manière plus localisée pour affiner la résolution spatiale et donc mieux cibler les détails. Elle permet d'observer des lésions ostéolytiques, ostéocondensantes ou mixtes. Notamment pour les ostéosarcomes intramédullaires, l'examen radiologique permet également de mettre en évidence des attentes osseuses caractéristiques, tel qu'un soulèvement du périoste/réaction périostée, indication importante pour une biopsie. Lorsque des lésions osseuses suspectes sont détectées, l'urgence est de réaliser une biopsie, qui sera le premier acte chirurgical.

La biopsie est une étape incontournable et critique dans le diagnostic des ostéosarcomes. Cette étape est donc critique car elle expose les parties molles à un ensemencement cellulaire, pouvant, dans le cas d'une « mauvaise biopsie » réduire le pronostic (Errani et al., 2013). Il est donc fortement recommandé que la biopsie soit réalisée par le chirurgien qui réalisera la résection tumorale. En effet, suite à cette biopsie, la

résection chirurgicale devra enlever toute trace de cicatrice et du trajet de l'aiguille. Autrement dit, le trajet de la biopsie déterminé par le chirurgien devra anticiper la ligne de résection future. Le produit de la biopsie est analysé en anatomie pathologique, avec les données d'imagerie pertinentes et les renseignements cliniques du patient. Cette étape est clé dans l'établissement avec certitude du diagnostic de l'ostéosarcome et permet d'écarter les autres pathologies possibles.

Associé au diagnostic de la tumeur osseuse primitive, un bilan d'extension métastatique doit être réalisé. Ce bilan permet d'évaluer le stade de progression de la tumeur en investiguant l'absence/présence de métastases pulmonaires (majoritairement) et/ou osseuses. Les examens médicaux inclus sont une radiographie des poumons, un scanner thoracique avec injection de produit de contraste iodé ainsi qu'une scintigraphie osseuse du corps entier au technétium 99. D'autres examens d'imagerie tels que l'IRM (imagerie par résonance magnétique) et la tomodensitométrie (TDM) seront réalisés afin de déterminer un bilan d'extension locale. L'IRM et la TDM permettent de déterminer la taille de la lésion osseuse en 3 dimensions ainsi que le degré d'envahissement des parties molles. Le cas échéant, l'IRM doit être réalisée avant la biopsie car cet examen peut perturber l'interprétation (œdème ...) (Philip et al., 1999).

6. Prise en charge de l'ostéosarcome

Jusque dans les années 70, la prise en charge de l'ostéosarcome était purement local avec comme seul traitement l'acte chirurgical. L'amputation du membre représentait le traitement radical de la tumeur primitive, mais augmentait la survenue de métastases majoritairement pulmonaires chez environ 80% des patients dans les semaines ou les mois suivant l'amputation et conduisait au décès du patient.

Actuellement, le protocole thérapeutique repose sur une polychimiothérapie pré et post-opératoires associées à une chirurgie. La conservation du membre est possible chez la grande majorité des patients (> 90 %), mais l'amputation reste la seule solution en cas de tumeur trop volumineuse envahissant les tissus mous avoisinants.

Les pionniers de la chimiothérapie dans l'ostéosarcome ont été Friedman, Carter (Friedman et Carter, 1972), Rosen et Jaffe (Rosen et al., 1974 ; Jaffe, 1972 ; Jaffe et al., 1978). Les premiers agents de chimiothérapie rapportés pour leur activité anti-cancéreuse prometteuse ont été le méthotrexate et l'adriamycine. La combinaison des molécules de chimiothérapie, les doses et la fréquence des injections dépendant de l'âge du patient et des données histologiques de la biopsie qui déterminent la nature et le grade de l'ostéosarcome. La chimiothérapie néoadjuvante (= préopératoire) a 2 objectifs théoriques majeurs qui sont de faire régresser la tumeur et donc de favoriser une chirurgie conservatrice ainsi que de traiter précocement la dissémination micrométastatique. Au moment de l'exérèse chirurgicale, la sensibilité de la tumeur à la chimiothérapie préopératoire est déterminée par l'appréciation de la nécrose tumorale qui quantifie le pourcentage moyen de cellules viables sur la pièce de résection (grade de HUVOS). Un patient est considéré comme « bon répondeur » à un traitement néoadjuvant lorsque 90 à 95 % de nécrose est observée sur la pièce de résection. La chimiothérapie postopératoire est ensuite adaptée en fonction de la qualité de la réponse histologique : un bon répondeur recevra le même traitement qu'en préopératoire alors que le protocole sera modifié pour un mauvais répondeur (Rosen et al., 1982).

La radiothérapie n'est pas utilisée en routine contre l'ostéosarcome. En effet, cette pathologie ne semble pas y être sensible (Picci, 2007). Cependant, dans certains cas, la radiothérapie peut être envisagée, afin d'augmenter les effets de la chimiothérapie lorsque

par exemple l'ensemble de la tumeur ne peut pas être excisé (ostéosarcome de la face...) ou bien pour réduire la douleur, notamment dans le cas de métastases osseuses multiples.

Avec plus de 20 % de réponse en monothérapie, les agents cytotoxiques les plus utilisés dans la prise en charge de l'ostéosarcome en France sont le Méthotrexate à haute dose, l'Ifosfamide, la Doxorubicine/Adriamycine, le Cisplatine (Bacci et al., 2003 ; Jaffe et al., 2013 ; Tableau 1).

Drogue	Mécanisme d'action	Doses et Adjuvants (Hattinger et al., 2010)
Méthotrexate (MTX)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Agent cytotoxique anti-métabolite ✓ Inhibiteur de la dihydrofolate réductase (enzyme clé de la synthèse de la thymidine) et d'enzymes impliquées dans la synthèse des purines 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Efficacité à doses élevées (12 g/m²/cycle) ; Dose cumulative = 48 à 168 g/m² ✓ Administration d'acide folinique (antidote du MTX) (Blackwell et al, 1995) + hyperhydratation alcaline
Doxorubicine / Adriamycine (DOX / AD)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Agent cytotoxique ✓ Agent intercalant ✓ Inhibiteur des topo-isomérases de type II (enzymes impliquées dans le déenroulement de l'ADN) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 60 à 90 mg/m²/cure ; Dose cumulative = 240 à 480 mg/m²
Cisplatine (CP)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Agent cytotoxique alkylant ✓ Formation de « ponts inter et intrabrin » dans les chaînes d'ADN 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 100 à 120 mg/m²/cure ; Dose cumulative = 480 à 600 mg/m² ✓ Administration d'une hyperhydratation saline
Ifosfamide (IFO)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Agent cytotoxique alkylant, ne dépend pas du cycle cellulaire ✓ Formation de ponts inter-brin et intra-brin en se fixant sur le N7 des guanines. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 6 à 14 g/m²/cure ; Dose cumulative = 30 à 69 g/m² ✓ Administration conjointe de MESNA + hyperhydratation

Tableau 1 . Agents chimiothérapeutiques conventionnels utilisés dans le protocole thérapeutique de l'ostéosarcome.

Lorsqu'un seul traitement local est effectué, la dissémination métastatique apparaît dans plus de 80 % des cas. L'approche multidisciplinaire associant chimiothérapie et chirurgie a permis depuis le début des années 1980 une amélioration considérable du pronostic (Bielack et al., 2002). Avec les thérapeutiques actuelles, la survie des patients à

5 ans est de 60 à 70 % mais chute à 30 % lorsque des métastases pulmonaires sont détectées lors du diagnostic (30 % des patients présentent déjà des métastases au diagnostic).

Bien que souvent mal toléré, le protocole thérapeutique actuel a contribué à l'amélioration du taux de survie ces dernières années. Cependant, une absence de réponse aux drogues anti-tumorales est souvent observée (résistance) et demeure un problème majeur conduisant au développement de métastases puis au décès du patient. De plus, les séquences de traitement et les hospitalisations répétées font de la chimiothérapie un traitement difficile à supporter, dégradant la qualité de vie du patient. C'est pourquoi, de nouvelles approches thérapeutiques de l'ostéosarcome sont en développement. Lors de la mise en place d'un processus tumoral, les phénomènes clés sont la croissance tumorale incontrôlée, l'échappement à la mort cellulaire et la néoangiogenèse. Ainsi, de nombreux anticorps et molécules ont été développés par divers laboratoires pharmaceutiques dans le but de cibler ces phénomènes tumoraux. Plusieurs de ces inhibiteurs ont montré des résultats encourageants en préclinique et sont en essais cliniques dans l'ostéosarcome (Heymann et Rédini, 2013 ; Sampson et al., 2013 ; www.clinical.trial.gov):

- Inhibiteurs de multiples tyrosines kinases : Imatinib Mésylate (c-KIT, PDGFR, BCR-Abl), Dasatinib (Src et BCR-Abl), Sorafenib (BRAF, c-KIT, PDGFR, VEGFR, Ret), Sunutinib (Flt3, c-KIT, PDGFR, VEGFR), Pazopanib (VEGFR1-3, PDGFR, c-KIT) et Cediranib (VEGFR). Ces récepteurs sont fréquemment mutés et/ou surexprimés dans les cellules cancéreuses induisant ainsi une suractivation de voies de signalisation, notamment la voie PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase), qui dérèglent alors la prolifération/survie cellulaire, la mort cellulaire, la migration, l'angiogenèse, le métabolisme glucidique, etc. Les inhibiteurs ci-dessus ont été développés pour la plupart en tenant compte de ces mutations et sont donc actifs sur les récepteurs mutés.

- Inhibiteurs du récepteur IGF-1R (Insulin-like Growth Factor-1 Receptor) : SCH717454 et IMC-A12 (cixutumumab) sont deux anticorps monoclonaux humanisés bloquant la liaison du ligand sur leurs récepteurs. Si l'axe insuline/IGF-1R est important durant la croissance comme le démontre les études chez des souris déficientes en IGF-1 ou en IGF-1R qui présentent un retard de croissance de 40 % et de 55 % respectivement (Liu et al., 1993), cet axe joue un rôle clé dans la biologie de l'ostéosarcome (Rikhof et al., 2009).

- Inhibiteurs de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) : parmi lesquels Ridaforolimus, Everolimus (RAD001) et Sirolimus. La protéine mTOR est un effecteur clé dans la voie de signalisation de PI3K mais est également une protéine importante dans la détection de variations intracellulaires (hypoxie, nutriment, énergie). Cette protéine est en aval des récepteurs à activité tyrosine kinase, dont le récepteur à l'IGF-1 et est une cible clé des cellules tumorales (Ory et al., 2012).

- Inhibiteurs de protéines impliquées dans le cycle cellulaire : Dinaciclib (inhibiteur des CDK ; Cyclin Dependant Kinase), MLN8237 (inhibiteur de Aurora A), BI2536 (inhibiteur de PLK1 ; Polo-Like Kinase 1) et Nutlin-3 [inhibiteur de MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog)]. Les cyclines sont importantes dans la régulation du cycle cellulaire et de la division cellulaire. Plus particulièrement, elles jouent un rôle important dans la réponse des dommages à l'ADN. Dans l'ostéosarcome, l'inhibiteur des CDK, le SCH 727965, induit l'apoptose *in vitro* (Fu et al., 2011). La protéine MDM2 est impliquée dans l'ubiquitination de p53 et induit sa dégradation, permettant à la cellule de poursuivre dans le cycle cellulaire. L'inhibition de MDM2 permet donc l'induction de la voie de signalisation induite par p53 (Micel et al., 2013).

- Inhibiteurs de la résistance à la mort cellulaire : le LCL161 [mime SMAC (Second Mitochondria derived Activator of Caspase)] et le Suromine (inhibiteur de la télomérase). La

résistance à la mort cellulaire peut être induite par plusieurs mécanismes, dont la surexpression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 dans l'ostéosarcome, Mcl-1 dans le cancer du sein), l'inhibition de protéines pro-apoptotiques (BIM dans l'ostéosarcome, BAD), mais aussi une augmentation de signaux de survie (récepteurs tyrosine kinase/PI3K) et une résistance aux récepteurs de mort Fas/FasL (Fas Ligand) ou TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Induced Ligand). Les SMAC vont faciliter la mort cellulaire dépendante des caspases en séquestrant les protéines inhibitrices de l'apoptose ou IAP (dont XIAP, Survivine ...). Un inhibiteur des XIAP, le AEG35156, sensibilise les cellules d'ostéosarcome à certains agents cytotoxiques, dont la doxorubicine (Holt et al., 2011). La télomérase est une enzyme qui, dans un contexte cancéreux, va empêcher l'apoptose en permettant le maintien de l'intégrité chromosomique, et donc une immortalité cellulaire. Dans l'ostéosarcome, le suromine inhibe la prolifération cellulaire et l'activité des télomérase *in vitro* (Trieb et Blahovec, 2003).

Il existe également des inhibiteurs de HDAC (Histone DéACétylase), de l'autophagie, de la HSP90 (Heat Shock Protein 90 ; 17 AAG) ainsi que de c-MET [récepteur de l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) ; PF-2341066]. Les HDAC sont des enzymes qui vont permettre l'accès de la chromatine aux facteurs de transcription. Dans l'ostéosarcome, l'inhibition des HDAC permettrait une inhibition de la réparation de l'ADN ainsi qu'une sensibilisation des cellules à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Blattmann et al., 2010). Cependant, ces inhibiteurs sont suspectés d'induire la dissémination métastatique, notamment en activant la voie Notch (Hughes, 2009). L'autophagie est un processus permettant la survie cellulaire en protégeant la cellule de conditions drastiques (déplétion en nutriments par exemple) et va être fortement impliquée dans les phénomènes de résistance aux agents de chimiothérapie (Shanware et al., 2013). La protéine chaperonne HSP90 supervise le bon repliement des protéines et leur fonctionnalité. Dans l'ostéosarcome, la présence d'anticorps anti-HSP90

corrèle avec une mauvaise réponse à la chimiothérapie. Une étude récente a montré que l'association d'un inhibiteur de la HSP90 à un inhibiteur de CDK pourrait être une stratégie thérapeutique dans l'ostéosarcome (Fu et al., 2013). Enfin, l'inhibition de c-MET *in vitro* a montré une sensibilisation des cellules d'ostéosarcomes MG-63 et SAOS2 au cisplatine (Wang et al., 2012). Ainsi, de nombreuses molécules ont été testées *in vitro* et *in vivo* dans l'ostéosarcome et sont déjà en essais cliniques. Parmi ces molécules, nombreuses sont celles qui ciblent directement l'activité tyrosine kinase et par conséquent leur voie de signalisation associée.

III. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les protéines à activité tyrosine kinase sont des éléments clés dans la régulation de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la différenciation, la survie et le métabolisme cellulaire, ou encore la migration et le contrôle du cycle cellulaire. Ces protéines catalysent le transfert du phosphate γ (P γ) de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) sur un résidu Tyrosine (Tyr). Les protéines à activité tyrosine kinase sont classées en 2 familles distinctes :

- les protéines à activité tyrosine kinase qui ne sont pas des récepteurs.
- les récepteurs à activité tyrosine kinase ou récepteurs tyrosine kinase (RTK).

Il existe 32 protéines tyrosine kinase humaines qui ne sont pas des récepteurs. Selon leur homologie de structure, elles sont regroupées en 10 sous-familles : SRC, ABL, JAK, ACK, CSK, FAK, FES, FRK, TEC et SYK (Blume-Jensen et Hunter, 2001) (Figure 11).

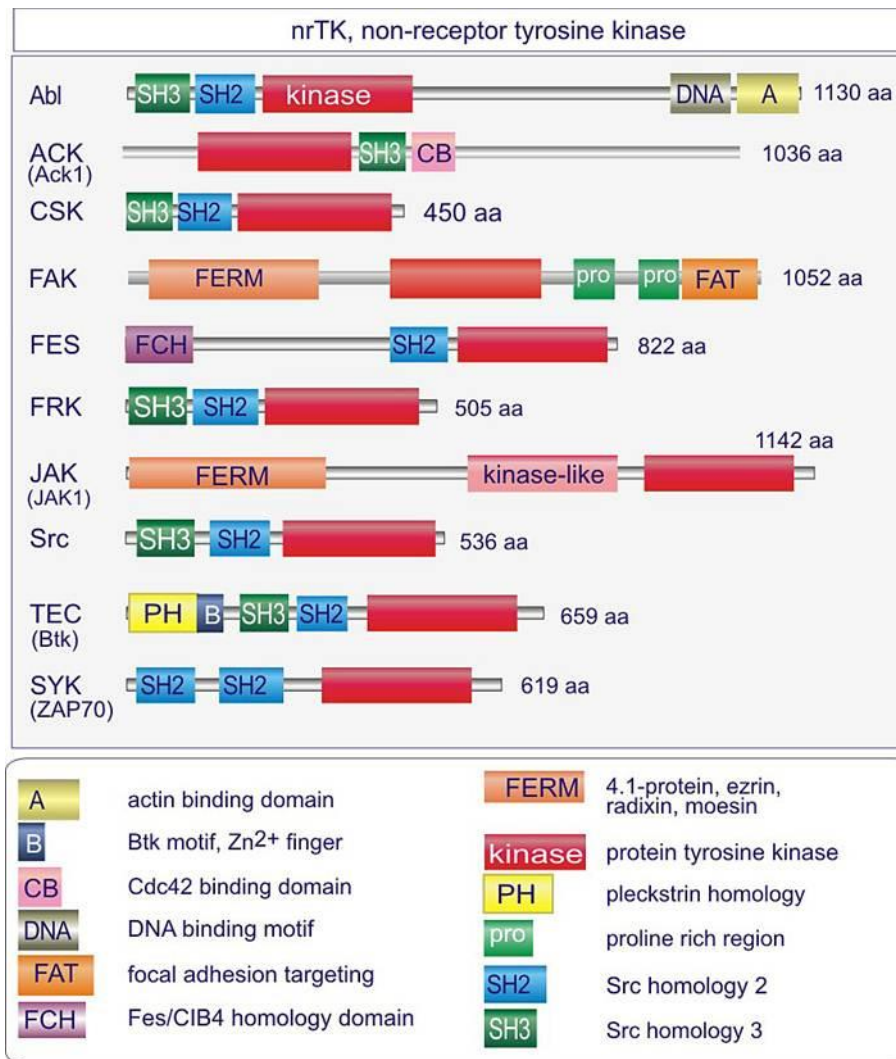


Figure 11 . Famille des protéines tyrosine kinase (non récepteur). Les 32 protéines à activité tyrosine kinase humaines sont divisées en 10 familles selon leur homologie de structure (<http://www.cellbiol.net>). Ces protéines sont cytoplasmiques. Des modifications post-traductionnelles (myristoylation, palmitoylation) permettent à certaines protéines de se fixer à des membranes plasmiques.

Ces protéines sont composées d'un domaine catalytique associé à d'autres composants extra-catalytiques qui permettent des interactions protéine/protéine, protéine/peptide ou protéine/ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Deux domaines principaux répertoriés permettant l'interaction protéine/protéine sont les domaines SH2 (Src Homology 2) et le SH3 (Src Homology 3). Alors que le domaine SH3 se lie à des séquences riches en proline, le domaine SH2, lui, possède une fixation spécifique aux résidus tyrosines phosphorylés.

Certaines protéines ne possèdent ni le domaine SH2 ni le domaine SH3, elles possèdent alors d'autres domaines de liaison comme par exemple la sous-famille JAK (Janus Kinase). La famille JAK possède un domaine de liaison aux intégrines mais possède également la capacité de se lier à la partie cytoplasmique des récepteurs aux cytokines. Ces protéines sont principalement cytoplasmiques, certaines peuvent néanmoins se fixer à des membranes plasmiques grâce à des modifications post-transcriptionnelles telles que la myristoylation ou la palmitoylation.

Les 58 récepteurs à activité tyrosine kinase humains connus sont répartis en 20 sous-familles, dont les familles ErbB (v-Erb avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog), Ins (Insuline), PDGF (Platelet Derived Growth Factor), VEGF (Vascular endothelial Growth Factor) et FGF (Fibroblast Growth Factor) sont les plus connues (Figure 12) (Lemmon et Schlessinger, 2010).

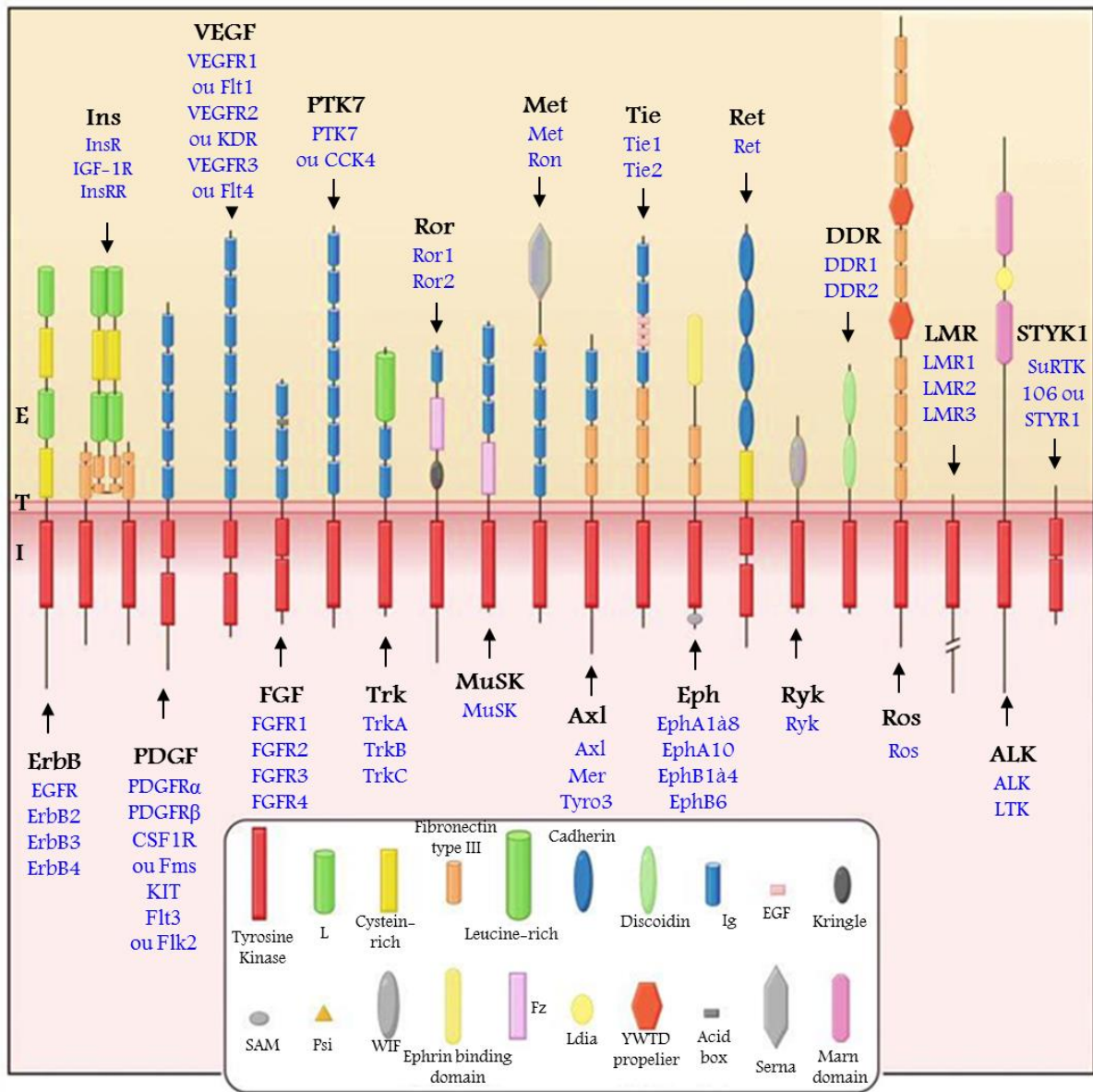


Figure 12 . Famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont répartis en 20 familles (écriture noire = famille, écriture bleue = membre de la famille) selon leur structure. Ils sont composés de trois domaines : extracellulaire (E), transmembranaire (T) et intracellulaire (I) qui possède l'activité kinase. D'après Lemmon et Schlessinger, 2010.

A. Structure des récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont des récepteurs membranaires composés de trois parties distinctes : un domaine extracellulaire qui va permettre la liaison de ligand spécifique à chaque récepteur afin de l'activer, un domaine transmembranaire unique qui va relier le domaine extracellulaire au domaine intracytoplasmique et donc un domaine cytoplasmique, responsable de l'activité tyrosine kinase et des interactions avec des protéines

du cytoplasme (Figure 13).

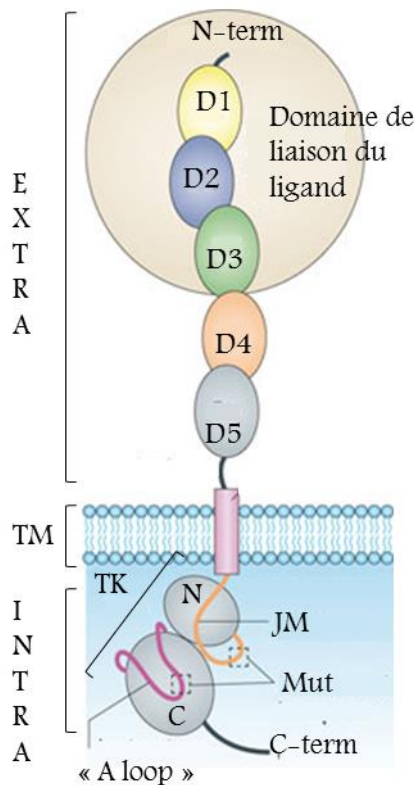


Figure 13 . Structure et activation des récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille du PDGF. (A) les récepteurs sont composés de 3 domaines distincts : extracellulaire (EXTRA), transmembranaire (TM) et intracytoplasmique (INTRA). Cette famille de récepteurs possède 5 domaines immunoglobuline (D1 à D5). Les domaines D1 à D3 servent à la fixation du ligand activateur. Le domaine intracytoplasmique est composé d'un domaine tyrosine kinase (TK) divisé en 2 lobes : le petit lobe (N) et le grand lobe (C), avec un domaine de liaison entre ces 2 lobes correspondant à la boucle d'activation (« A loop »). Le domaine tyrosine kinase débute par un domaine juxtamembranaire (JM) et se termine par un domaine C-terminal (C-term). Les zones « mut » correspondent à des parties souvent mutées dans les cancers. D'après Verstraete et Savvides, 2012.

Le domaine extracellulaire. Il permet la fixation de divers ligands activateurs. Il est composé de différents domaines conservés, répétés ou non, dont des domaines riches en cystéines ou en leucines et/ou des domaines de type immunoglobuline (IgD ou « Ig-like »). Ces différents domaines détermineront la spécificité de la liaison au ligand activateur.

Le domaine transmembranaire. Composé de 22 à 26 acides aminés, il établit un lien physique entre les 2 autres domaines, généralement par une unique hélice α . Ce domaine permet l'ancrage du récepteur dans la membrane (séquence hydrophobe) et permet son orientation. Ce domaine ne joue pas de rôle dans l'activation des récepteurs tyrosine kinase mais pourrait jouer un rôle d'un point de vue conformationnel.

Le domaine intracytoplasmique. Il est composé d'une région juxta-membranaire de 40 à 80 acides aminés suivie par le domaine catalytique tyrosine kinase (qui possède une boucle d'activation) et est terminé par la région carboxy-terminale. Le domaine juxta-membranaire peut, chez certains récepteurs comme par exemple c-KIT, jouer le rôle d'un segment auto-inhibiteur (Ma et al., 1999). De plus, l'intégrité du domaine juxtamembranaire est important ; il a été montré que des mutations, insertions et délétions peuvent induire la tumorigenèse (Casteran et al., 2003). La longueur et la séquence du domaine intracytoplasmique varient suivant les récepteurs tyrosine kinase. Ce domaine possède un nombre différent de résidus tyrosine, connus pour être phosphorylés ou non. Ces sites peuvent être phosphorylés de deux façons : par le récepteur lui-même (autophosphorylation) ou par des protéines kinases (Hubbard, 2002). Il a été établi que le domaine catalytique tyrosine kinase comporte douze sous-domaines majeurs (I à XI, de NH₂ vers COOH), répartis en 2 lobes et reliés entre eux par le sous-domaine V (Hanks et Hunter, 1995). Les domaines I à IV, dont l'ensemble est appelé le petit lobe N, sont hautement impliqués dans la liaison, la stabilisation et l'orientation de l'ATP. Le second lobe, appelé grand lobe C, est impliqué dans la chélation du Mg²⁺ et le phospho-transfert du P _{γ} , ainsi que dans la reconnaissance des substrats (domaine VIII). Le domaine tyrosine kinase possède également la boucle d'activation ou « A loop » qui doit être phosphorylée pour que l'activité kinase soit activée. L'activité kinase est cruciale pour l'activation des voies de transduction

en aval des récepteurs, aboutissant à l'induction des réponses cellulaires comme la survie, la prolifération et la différenciation (Hubbard and Till, 2000).

B. Activation des récepteurs tyrosine kinase

L'activation d'un récepteur tyrosine kinase est déclenchée par la fixation de son ligand sur le domaine extracellulaire. De manière générale, cette interaction ligand/récepteur va engendrer le rapprochement de deux récepteurs monomères et donc leur dimérisation (homo ou hétérodimère), indispensable à l'activation du récepteur. Plusieurs modes d'interactions ligand/récepteur existent, basés sur les contacts physiques entre les ligands et les parties extracellulaires des récepteurs tyrosine kinase engendrant la dimérisation (Lemmon et Schlessinger, 2010). Parmi ces interactions, deux mécanismes « extrêmes » ont été décrits. La dimérisation peut être due uniquement au contact ligand-ligand (exemple de TrkA ; Wehrman et al., 2007) où les deux récepteurs monomères n'ont aucun contact physique entre eux. A l'inverse, il est possible d'observer une dimérisation où il n'existe de contact physique qu'entre les deux récepteurs monomères, suite à la fixation d'un ligand sur chaque monomère qui va engendrer un changement de conformation de chaque monomère, dévoilant ainsi les sites de dimérisation (exemple de la famille EGFR/ErbB ; Ogiso et al., 2002). Il existe néanmoins des exemples de dimérisation intermédiaire, où l'on retrouve des contacts ligand/ligand associées à des contacts récepteur/récepteur ou bien à des éléments du récepteur (chaines héparines ...) (Figure 14). Le récepteur au SCF (Stem Cell Factor ; récepteur c-KIT ; Yuzawa et al., 2007) associe l'interaction entre les ligands sous-forme de dimère à un contact physique étroit entre une zone des domaines extracellulaires appelées D4 et D5 (domaines Ig-like).

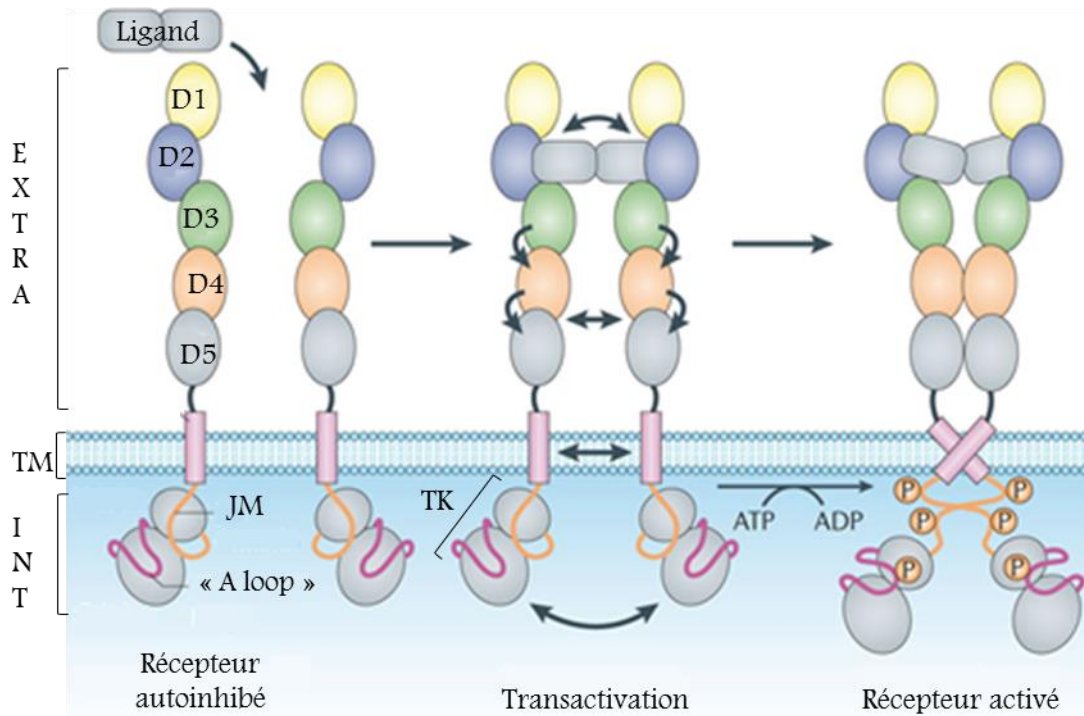


Figure 14 . Activation des récepteurs de la famille PDGF (Platelet Derived Growth Factor). En absence de ligand, les monomères membranaires sont dans un état d’autoinhibition, grâce à des boucles de contrôles présentes dans le domaine intracytoplasmique (INT) et à des phénomènes de répulsions des domaines immunoglobulines (D1 à D5). La liaison d’un ligand dimérique spécifique (aux domaines D1 à D3) à 2 monomères différents induit des rotations de D4 et D5 autour des axes de liaisons D3–D4 et D4–D5. Ce changement de conformation permet une interaction physique entre les domaines D4 et D5 de chaque récepteur. Les interactions ligand/récepteur ainsi que récepteur/récepteur permettent une transphosphorylation des domaines tyrosine kinase (TK), l’autophosphorylation de ces domaines grâce à la fixation d’ATP, qui devient actif et va permettre l’activation des voies de signalisations en aval. D’après Verstraete et Savvides, 2012 ; JM = domaine juxtamembranaire, « A loop » = boucle d’activation.

Cependant, parallèlement au mode de dimérisation induit par la fixation de ligands sur leurs récepteurs, certaines familles de récepteurs peuvent être trouvées à l’état inactif sous forme dimérisée, en l’absence de ligand. L’exemple majeur est le récepteur à l’insuline. Néanmoins, la fixation d’un ligand est tout de même requise pour activer ce récepteur, le ligand permettant de changer la conformation du dimère.

La fixation du ligand induit donc *in fine* un changement de conformation du récepteur. Ce changement de conformation permet une levée d'inhibition d'activité en modifiant diverses interactions intramoléculaires. Cette auto-inhibition en cis (inhibition du récepteur par ce même récepteur) est appelée « frein moléculaire » (Lemmon et Schlessinger, 2010). Il existe 3 freins moléculaires majeurs de l'activité tyrosine kinase (Figure 15).

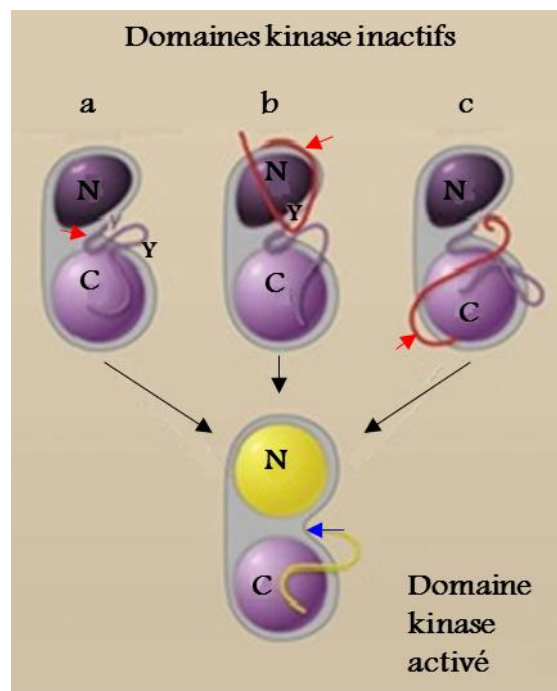


Figure 15 . Freins moléculaires intracytoplasmiques des récepteurs à activité tyrosine kinase. Le domaine kinase intracellulaire des récepteurs est composé des 2 lobes (N = petit lobe, C = grand lobe) Afin d'empêcher toute activation des voies de signalisation en absence de ligand, il existe trois freins moléculaires majeurs permettant de bloquer la fixation de l'ATP au domaine kinase (flèches rouges). (a) blocage par la boucle d'activation du récepteur (exemples : IGF-1R, InsR, FGFR), (b) blocage par le domaine juxtamembranaire du récepteur (rouge ; exemples : c-KIT, PDGFR, Eph), (c) blocage par le domaine C terminal du domaine kinase (rouge) (exemple : Tie2). L'inhibition est levée lorsque le récepteur fixe son ligand, ce qui engendre l'autophosphorylation d'une tyrosine clé (Y) grâce à la fixation d'ATP (flèche bleue). D'après Lemmon et Schlessinger, 2010).

Appartenant au domaine tyrosine kinase, la première interaction auto-inhibitrice est la boucle d'activation ou « A loop ». Régulateur clé du domaine catalytique, ce segment de 20 à

25 acides aminés possède 1 à 3 résidus tyrosines qui vont créer des interactions avec le domaine actif de l'enzyme, empêchant l'accès à l'ATP et aux substrats. Lors de la fixation d'un ligand, le changement de conformation engendre une autophosphorylation de ces tyrosines, rompant l'auto-inhibition. Le récepteur est actif. La seconde possibilité d'auto-inhibition est déterminée par deux segments extérieurs au domaine catalytique : soit par le domaine juxtamembranaire, soit par le domaine C terminal. Dans le premier cas, le domaine juxtamembranaire inhibe l'activité tyrosine kinase par la présence de résidus tyrosines, qui lors du changement de conformation seront autophosphorylés. Dans le second cas, il y aura également une autophosphorylation de résidus tyrosines mais dans la partie C-terminale. Dans les 2 cas décrits précédemment, la phosphorylation est une cis-phosphorylation, correspondant à une phosphorylation induite par le récepteur lui-même, sur lui-même. Une dernière possibilité d'activation s'ajoute : l'activation allostérique. Cette dernière activation correspond à une activation mettant en jeu des interactions entre un petit lobe N d'un monomère (ou receveur) et un grand lobe C d'un autre monomère (ou activateur) (Zhang et al., 2006). L'activation ne nécessite donc aucun changement conformationnel, le simple effet de proximité engendré par la dimérisation suffit à déclencher la transphosphorylation des tyrosines (Hubbard and Till, 2000).

Le premier substrat phosphorylé par le récepteur est donc le récepteur lui-même, permettant son activation complète. D'autres résidus seront ensuite phosphorylés dans le domaine intracytoplasmique dans un ordre précis et serviront à transmettre un signal par le recrutement d'effecteurs enzymatiques, de protéines adaptatrices ou des protéines d'ancrage grâce à la présence de site de liaisons spécifiques : les domaines SH2 (Src Homology 2) ou PTB (Phospho Tyrosine Binding). Il apparaît que plusieurs protéines peuvent se lier à une même phosphorylation d'une tyrosine et qu'à l'inverse, une protéine peut se lier à plusieurs phosphorylations d'un même récepteur tyrosine kinase (Masson et Rönnstrand, 2013). Pour

illustrer cette dernière remarque, prenons le récepteur c-KIT : la tyrosine phosphorylée en position 568 peut accueillir les protéines SFKs, APS, SHP2, Cbl, Lnk, SOCS6, CHK ; en revanche, la protéine Grb2 peut être accueillie par les phosphorylations des tyrosines en positions 703 et 936.

C. Voies de signalisations induites par l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase activent diverses voies de signalisation en lien avec de nombreux processus biologiques (Schlessinger, 2000). En effet, de par leur activité tyrosine kinase, ces récepteurs sont considérés comme étant une plateforme de reconnaissance et de recrutement de multiples protéines. Suite à leur autophosphorylation, les récepteurs tyrosine kinase peuvent recruter des enzymes dont leur activité est stimulée directement par les phosphorylations du récepteur (Src, PLC γ , PI3K, Shp-2 ...). De plus, les récepteurs tyrosine kinase peuvent recruter des protéines adaptatrices grâce à leur domaine SH2 (Grb2, Shc ...) ; ces protéines possèdent néanmoins d'autres domaines leur permettant des interactions avec d'autres protéines en aval. Enfin, les récepteurs peuvent recruter les protéines dites d'ancrages ou « docking protein » [Gab, IRS (Insulin Receptor Substrate protein)...] qui se lient par leur domaine PTB directement au récepteur ou par l'intermédiaire de Grb2. La majorité de ces protéines d'ancrage possèdent un domaine PH (Pleckstrin Homology) en position N-terminale ou bien un site de myristoylation afin de cibler la membrane plasmique. L'ensemble de ces interactions récepteurs/protéines induit de nombreuses voies de signalisations, dont les 2 principales sont les voies de signalisation PI3K/PDK1/AKT et RAS/RAF/ERK (Figure 16). De plus, les voies de la PLC γ , et de JAK/STAT sont impliquées.

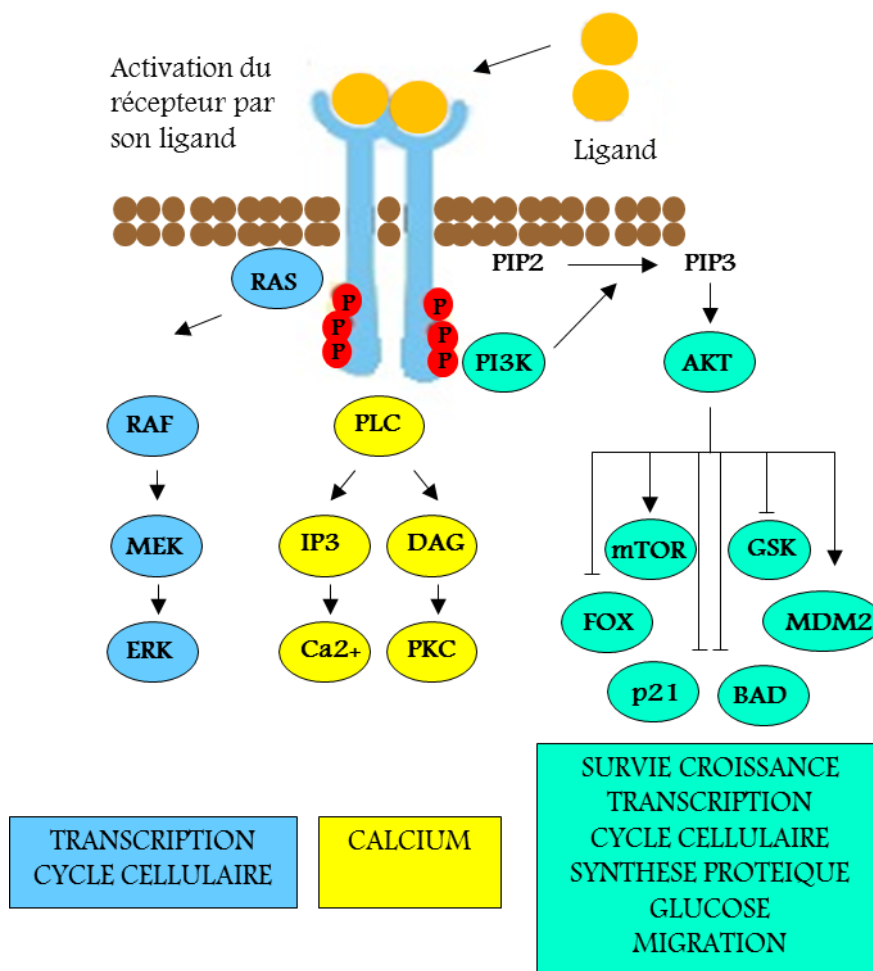


Figure 16 . Voies de signalisation induites par l'activation de récepteur à activité tyrosine kinase. Lorsque le ligand spécifique se fixe à son récepteur, il permet l'autophosphorylation du récepteur qui va alors déclencher des voies de signalisation en aval, dont principalement les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/ERK, impliquées dans la prolifération cellulaire, la transcription, la synthèse protéique, la migration cellulaire et le métabolisme du glucose) mais aussi la voie de la PLC (PhosphoLipase C), impliquée dans le métabolisme du calcium.

1. La voie PI3K/AKT

La voie PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) est une voie impliquée dans de nombreux processus biologiques, tels que la prolifération cellulaire, dans la survie cellulaire/contrôle de l'apoptose, dans la synthèse protéique ainsi que dans la régulation du métabolisme du glucose et dans l'angiogenèse. L'enzyme PI3K est composée de 2 sous-unités, une catalytique appelée p110 et une régulatrice appelée p85. Les récepteurs tyrosine

kinase peuvent activer la classe IA de PI3K, correspondant aux sous-unités p110 α , β et δ (Vadas et al., 2011). Lorsque le récepteur est activé par son ligand, l'autophosphorylation permet le recrutement de l'enzyme PI3K par sa sous-unité régulatrice p85. La PI3K va alors participer à la formation d'un phospholipide, appelé le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃ ou PIP₃) à partir du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂ ou PIP₂). La formation de ce second messager va induire l'activation de la PDK1 membranaire (Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1) qui va à son tour activer AKT (= PKB ; Protein Kinase B). Lorsque la protéine AKT est activée, celle-ci va réguler de nombreux effecteurs dont mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), la GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) et bien d'autres protéines. Cette voie sera décrite plus en détail dans la partie suivante.

2. La voie RAS/RAF/MEK/ERK

La voie de signalisation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) est extrêmement bien conservée au cours de l'évolution et est impliquée dans le contrôle de nombreux processus fondamentaux tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation, et la migration cellulaire. Il existe 4 voies majeures des MAPK chez les mammifères : ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2), JNK (c-Jun Nterminal Kinase), la voie p38 (Krishna et Narang, 2008) et la voie ERK5 (ou BMK-1 pour Big MAP Kinase-1). La voie fortement impliquée dans la transduction de signaux issus de l'activation d'un récepteur tyrosine kinase est la voie de signalisation ERK1/2 (Figure 17).

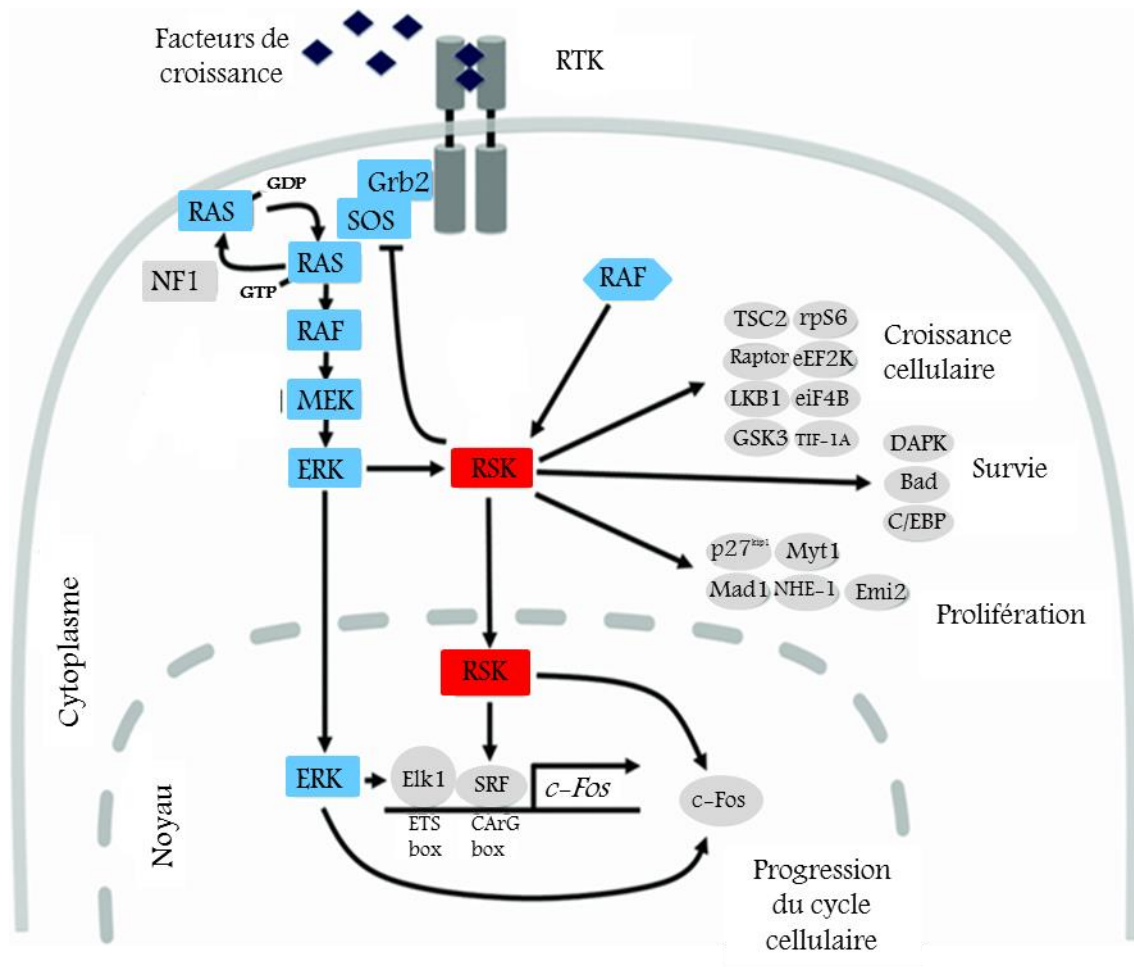


Figure 17 . La voie RAS/RAF/MEK/ERK. Suite à l'activation du récepteur tyrosine kinase, RAS est recruté par des protéines adaptatrices Grb2/SOS qui vont recruter RAS. RAS-GDP est transformé en RAS-GTP et active la voie de signalisation. ERK active RSK cytoplasmique et/ou est transloqué dans le noyau où il joue son rôle de facteurs de transcription. La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK est impliquée dans la prolifération/croissance cellulaire, la survie cellulaire et dans la progression des cellules dans le cycle cellulaire. D'après Romeo et al., 2012.

Voici le schéma classique d'une activation de voie MAPK : l'activation d'une MAPK est induite par une MAPKK (ou MAP2K ; MAPK Kinase) elle-même activée par une MAPKKK (ou MAP3K ; MAPK Kinase Kinase). Suite à la fixation de la protéine adaptatrice Grb2 par son domaine SH2 directement sur un résidu tyrosine phosphorylé d'un RTK, ou de Shc qui recrutera Grb2 (selon les récepteurs), Grb2 recrute la protéine SOS (Son of Sevenless). Le signal est alors transmis à la petite protéine monomérique RAS, qui échange son GDP

(Guanosine DiPhosphate) par du GTP (Guanosine TriPhosphate) via la GEF (Guanine Exchange Factor). Les protéines RAS-GTPases sont le lien critique entre l'activation des récepteurs tyrosine kinase et la signalisation MAPK. RAS, qui est membranaire, recrute à son tour RAF (MAP3K) et l'active en le phosphorylant. Puis, RAF phosphoryle MEK1/2 (MAPK-ERK Kinase1/2 ; MAP2K) qui phosphoryle ERK1/2 (MAPK) sur des résidus régulateurs Thr et Tyr dans le domaine Thr-Glu-Tyr présent dans sa boucle d'activation (Plotnikov, 2011). Après activation, ERK va alors cibler des protéines cytosoliques, comme par exemple RSK1/2 (90kDa Ribosomal S6 Kinase ; Frödin et Gammeltoff, 1999 ; Romeo et al., 2012), membranaires ou nucléaires, dont les MSK (Mitogen and Stress-activated protein Kinases ; Deak et al., 1998). En effet, une partie des RSK1/2 ainsi qu'une proportion active d'ERK1/2, une fois activées, vont être transférées dans le noyau ; en parallèle, les RSK ont également des effecteurs cytoplasmiques. En tant que facteurs de transcription, ERK et RSK (ainsi que les MSK) vont alors activer des régulateurs transcriptionnels tels que les facteurs STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), Elk-1 (Sharrocks, 2001), CREB (C-AMP Response Element-Binding protein) ou l'histone H3. L'activation de ces régulateurs engendre la transcription d'IEG (Immediate Early Gene ; Healy et al., 2013) dont c-Fos, qui sera soit rapidement dégradé (activation transitoire d'ERK1/2) ou stabilisé par phosphorylation de RSK1/2 et d'ERK1/2 (activation soutenue d'ERK1/2) sur les Thr325 et Thr331, prémices de la fixation d'ERK1/2 sur le domaine DBE (Phe-Thr-Tyr-Pro) de c-Fos (Murphy et Blenis, 2006). Lorsque c-Fos est stabilisé, il forme le complexe AP-1 (Activating Protein-1) avec c-Jun et engendre la transcription de multiples gènes permettant diverses activités biologiques (Roux et Blenis, 2004). L'activation constitutive de c-Fos et donc d'ERK1/2 est impliqué dans le phénomène de transformation cellulaire (Okazaki et Sagata, 1995).

3. La voie PLC γ

La phospholipase C γ (PLC γ) hydrolyse le PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) pour former le second messenger IP₃ (inositol-1,4,5-trisphosphate) et du DAG (DiAcylGlycérol) (Patterson et al., 2005). L'IP₃, en se fixant à son récepteur IP₃R, permet le relargage du calcium (Ca²⁺) stocké dans des compartiments intracellulaires. Le Ca²⁺ va alors se lier au récepteur de la calmoduline, ce qui engendre l'activation de protéines dépendantes de l'interaction Ca²⁺/calmoduline. Le DAG permet l'activation de la protéine kinase C (PKC), qui à son tour cible de multiples protéines. L'activation de la PKC peut mener à l'activation des MAPK (Schönwasser et al., 1998).

4. La voie JAK/STAT

Les protéines STAT (Signal transducers and activators of transcription) interagissent avec les résidus phosphotyrosines via leurs domaines SH2. Une fois activées, ces protéines vont se dimériser et vont alors être transloquées au noyau pour permettre l'expression de gènes cibles spécifiques. Ainsi, pour exemple, le récepteur à l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) possède un site de fixation à STAT3 (Trusolino et al., 2010).

5. La famille SRC

Src est le membre prototype d'une famille de neuf gènes de tyrosines kinases non récepteurs (Parsons et Parsons, 2004). Localisée dans le cytosol, la protéine kinase Src peut être activée par divers récepteurs tyrosine kinase, dont le PDGFR et l'EGFR. En retour, la protéine Src est capable d'engendrer de nombreuses voies de signalisation en se liant à divers substrats tels que RAS, la PLC γ , la sous-unité régulatrice de PI3K ou encore avec les FAK (Focal Adhesion

Kinase). Etant donné les nombreux substrats possibles, la Src joue un rôle critique dans la régulation de la prolifération cellulaire, la migration, l'adhérence cellulaire, l'angiogenèse et la fonction immune. De plus, son rôle est nettement impliqué dans le développement et la progression de cancers.

D. Mécanismes d'arrêt du signal intracellulaire induit par les récepteurs tyrosine kinase

Comme expliqué précédemment, les récepteurs tyrosine kinase ont un rôle important dans tous les processus biologiques cellulaires. Il apparaît donc indispensable que leur activité tyrosine kinase soit finement régulée, afin d'empêcher tout échappement des cellules pouvant alors conduire à diverses pathologies et notamment à la survenue de cancers. Il existe des contrôles positifs (qui vont amplifier le signal) et négatifs, qui vont limiter le signal (Ledda et Pratcha, 2007 ; Lemmon et Schlessinger, 2010).

Il existe différents mécanismes de régulation négative. Ces processus peuvent être soit rapides ou précoces soit lents ou tardifs (Figure 18).

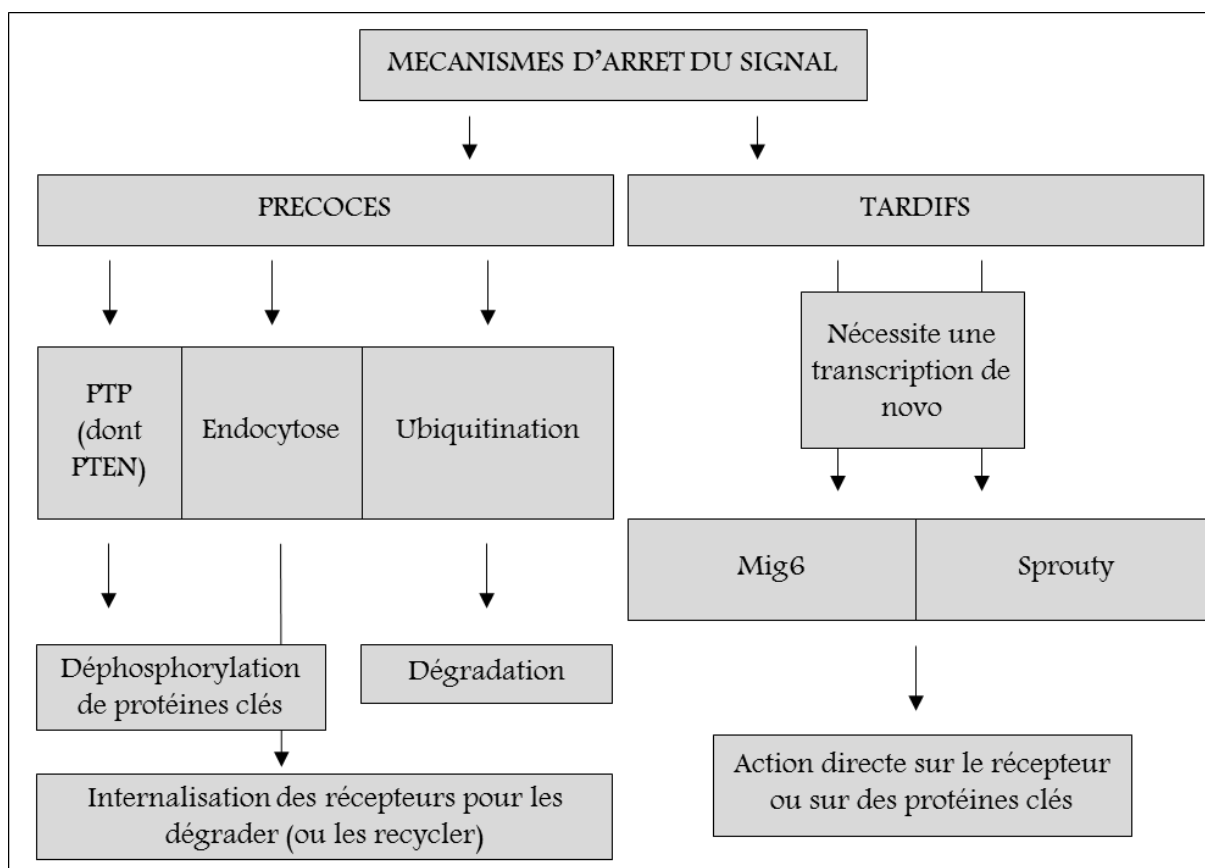


Figure 18 . Rétrocontrôle négatif des signaux intracellulaires activés par les récepteurs tyrosine kinase. Suite à l'activation d'un récepteur par son ligand, des voies de signalisation sont activées. Il existe des mécanismes permettant de stopper ces signaux et dépendants de la rapidité d'exécution. Les mécanismes de rétrocontrôle négatif précoce sont les PTP (Protein Tyrosine Phosphatase) comme par exemple PTEN qui va jouer le rôle opposé à PI3K en déphosphorylant le PIP_3 pour obtenir du PIP_2 , l'endocytose va permettre l'internalisation des récepteurs puis leur dégradation (ou recyclage) et l'ubiquitination qui induit la dégradation des récepteurs. Les mécanismes tardifs nécessitent la transcription de nouvelles protéines, Mig6 et Sprouty, qui vont inhiber le récepteur directement ou en séquestrant d'autres protéines nécessaire à l'activation du récepteur (Grb2 par exemple).

Il existe plusieurs contrôles précoces des récepteurs tyrosine kinase dont les protéines tyrosine-phosphatase (PTP = Protein Tyrosine Phosphatase), l'endocytose et l'ubiquitination. Comme leur nom l'indique, les phosphatases sont des protéines ayant une action opposée aux kinases : elles permettent de déphosphoryler une protéine sur un résidu tyrosine afin de la rendre inactive. Un des exemples les plus connus est PTEN (Phosphatase and Tensin homologue). Cette protéine permet de contrecarrer l'effet de PI3K, inhibant alors la voie de

signalisation PI3K/PDK1/AKT (Stambolic et al., 1998). D'autres tyrosine-phosphatases inhibent directement les phosphorylations du récepteur tyrosine kinase, comme la PTP1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B) : la stimulation de fibroblastes murins dépourvus de PTP1B (issus de souris *PTP1B*^{-/-}) par l'EGF ou par le PDGF induit une phosphorylation soutenue des récepteurs comparés aux fibroblastes contrôles (Haj et al., 2003). Le second mécanisme précoce est l'endocytose. L'endocytose est un phénomène clé dans la diminution du nombre de récepteurs tyrosine kinase et de ligands au niveau de la membrane plasmique. En effet, suite à l'activation d'un récepteur par son ligand, l'endocytose est rapidement déclenchée et va permettre sa régulation numérique en initiant soit son recyclage soit sa dégradation par les lysosomes (Zwang et Yarden, 2009 ; Goh et Sorkin, 2013). L'endocytose est dépendant des clathrines ; ces protéines vont permettre l'invagination de la membrane plasmique contenant les récepteurs activés au niveau de puits de clathrines. Cependant, dans certaines conditions, comme par exemple une concentration importante de ligand qui sature l'endocytose dépendante des clathrines (Wiley, 1988), l'endocytose devient indépendante des clathrines. Bien que l'endocytose permette de diminuer le nombre de récepteurs tyrosine kinase activés, il paraît important de préciser que certains récepteurs semblent devoir être internalisés pour transmettre certains signaux. En effet, la localisation subcellulaire semble important pour les EphR (Sadowski et al., 2009). Enfin, l'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui permet la dégradation d'une protéine cible en lui ajoutant une ou plusieurs ubiquitine(s). Trois enzymes sont mises en jeu : l'enzyme E1 recrute une ubiquitine sur un de ses résidus cystéines puis cette ubiquitine sera transférée sur une cystéine de l'enzyme E2 ; enfin, l'enzyme E3 (ou ligase) va faire le lien entre l'enzyme E2 et la protéine à dégrader en catalysant le transfert de l'ubiquitine sur cette protéine (Pickart, 2001). Parmi la grande diversité d'E3 existantes, il y a Cbl (famille contenant les domaines à doigts de zinc ou RING) et NEDD4 (famille contenant les domaines

HECT ; Homologous to E6-associated protein C-Terminus). Bien que le rôle de l'ubiquitination dans l'endocytose reste mal compris, le complexe Cbl/Grb2 semble avoir une importance clé (Goh et Sorkin, 2013). En effet, ce complexe permettrait la localisation du récepteur au niveau du puits de clathrines. De plus, des études ont montré que des mutations dans le site de fixation de l'ubiquitine n'empêchaient pas l'internalisation (Huang et al., 2006) alors que la déplétion en Cbl l'inhibe (Zeng et al., 2005 ; Huang et al., 2006). Ceci mettrait en avant la possible existence d'un facteur indéterminé X, ubiquitiné par Cbl qui serait médiateur de l'internalisation (Goh et Sorkin, 2013). Enfin, si le rôle de l'ubiquitination reste non-élucidé pour l'endocytose, elle est néanmoins indispensable dans la dégradation des récepteurs tyrosine kinase, comme le montre des travaux où des mutations inhibant l'ubiquitination de l'EGFR ne permettent pas de diminuer la quantité de ces récepteurs et par conséquent remettent en cause leur dégradation (Huang et al., 2006 ; Pennock et Wang, 2008).

A l'inverse de l'atténuation rapide du signal, il existe des atténuations beaucoup plus tardives. Les protéines Mig6 (ou RALT) et Sprouty sont qualifiées d'atténuateurs tardifs car leur présence dans le cytoplasme de la cellule est due à leur transcription et traduction « de novo ». Mig6 est une protéine de 58 kDa. Sa transcription est activée par des facteurs de croissance qui signalisent par la voie RAS/RAF/MAPK. En retour, Mig6 va inhiber directement les récepteurs tyrosine kinase, dont les récepteurs à l'EGF et à l'HGF (Hackel et al., 2001 ; Pante et al., 2005), mais aussi des effecteurs du récepteur tels que Grb2 ou la sous-unité p85 de PI3K. De plus, Mig6 active également l'endocytose de l'EGFR en le couplant à AP-2 (Ying et al., 2010). Les protéines Sprouty (ou Spry) sont au nombre de 4 et régulent les voies de signalisation de nombreux récepteurs. Leur expression est induite par ERK (Ozaki et al., 2001). Lorsque Spry2 est phosphorylée sur la tyrosine 55 (par Src) en réponse à un facteur de transcription, dont l'EGF, Spry2 peut alors se fixer à Grb2, ce qui

limite la voie Ras en aval. De plus, Spry4 peut inhiber directement Raf (Sasaki et al., 2003). Parallèlement, Spry2 peut se fixer et séquestrer c-Cbl, ce qui diminue le pouvoir atténuateur et de Spry2 et de c-Cbl en limitant l'internalisation et la dégradation des récepteurs tyrosine kinase (Wong et al., 2002). Enfin, d'autres protéines dont LRIG-1 (Leucin-Rich repeats ImmunoGlobulin-like domains protein-1) participent également dans la régulation tardive de ces récepteurs, notamment en activant l'endocytose et la dégradation (Gur et al., 2004 ; Zhu et al., 2005).

E. La voie de signalisation PI3K/AKT

Les enzymes PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) sont des kinases impliquées dans la génération de lipides intracellulaires, les phosphoinositides, qui vont engendrer un ensemble très large de phénomènes biologiques cellulaires. Les phosphoinositides sont des phosphatidylinositol possédant 1 ou plusieurs phosphate(s) inorganique(s). L'activité des PI3K repose sur la phosphorylation du groupement hydroxyl (-OH, 1 oxygène + 1 hydrogène) en position 3 du PtdIns (Phosphatidylinositol ou PI), du PtdIns(4,5)P₂ [Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ou PI(4,5)P₂] et du PtdIns4P (Phosphatidylinositol 4-monoPhosphate ou PI4P). La phosphorylation de ces substrats génère des seconds messagers, indispensables dans la signalisation en aval de ces enzymes. Selon les similitudes de structure et de préférence pour les substrats, les PI3K sont réparties en 3 classes bien distinctes (Figure 19) : les classes I, II et III, la classe I étant actuellement la mieux caractérisée (Tableau 2).

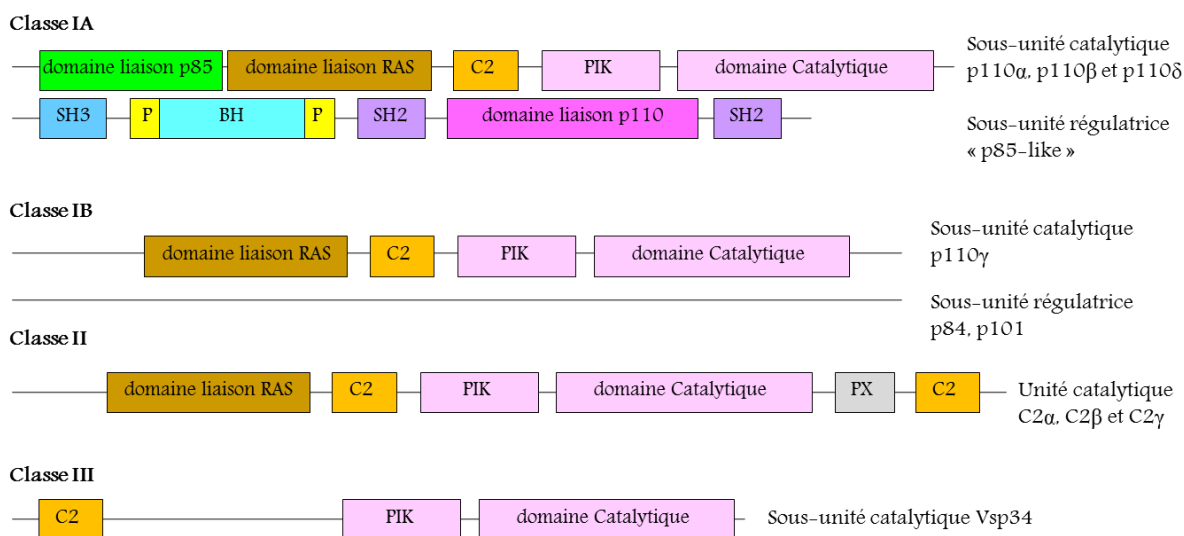


Figure 19 : Structure des protéines PI3K des classes I, II et III. Les PI3K sont regroupées en 3 classes distinctes selon leur structure et leur préférence de substrats. La classe IA regroupe les sous-unités catalytiques p110α, p110β et p110δ et les sous-unités régulatrices « p85-like » dont p85α/p55α/p50α, p85β, p55. La sous-unité-catalytique p110γ (classe IB) est similaire à celles de la classe IA mais possède d'autres sous-unités régulatrices : p84/p101. Le substrat privilégié de la classe I est le PI(4,5)P₂ pour former du PI(3,4,5)P₃. La classe II ne possède pas de sous-unité connue régulant les unités catalytiques. C2α, C2β et C2γ. Les substrats privilégiés de la classe II sont les PI et le PI4P pour former le PI3P et le PI(3,4)P₂. Enfin, la classe III possède la sous-unité catalytique Vsp34. D'après Engelman et al., 2006. BH : domaine homologue à BCR, PIK = domaine PI3K homologue Le substrat privilégié du Vsp34 est le PI pour former du PI3P.

	Sous-unités catalytiques		Sous-unités régulatrices	
	Gènes	Protéines	Gènes	Protéines
Classe IA	<i>PIK3CA</i> <i>PIK3CB</i> <i>PIK3CD</i>	p110α p110β p110δ	<i>PIK3R1</i> <i>PIK3R2</i> <i>PIK3R3</i>	p85α p55α p50α p85β p55γ
Classe IB	<i>PIK3CG</i>	p110γ	<i>PIK3R4</i> <i>PIK3R5</i>	p101 p84
Classe II	<i>PIK3C2A</i> <i>PIK3C2B</i> <i>PIK3C2G</i>	C2α C2β C2γ		
Classe III	<i>PIK3C3</i>	Vsp34	<i>PIKCR4</i>	Vsp15

Tableau 2 : Récapitulatif des gènes et protéines selon la classe de PI3K.

La classe II regroupe trois enzymes monomériques de haut poids moléculaire appelées C2 α , C2 β et C2 γ , respectivement codées par les gènes *PIK3C2A*, *PIK3C2B* et *PIK3C2G*. Ces enzymes sont très proches de la structure des enzymes de la classe I mais ne possèdent pas de site de liaison pour une sous-unité régulatrice. Les substrats préférentiels de ces enzymes sont le PI et le PI4P et peuvent générer les seconds messagers suivants : le PtdIns3P (Phosphatidylinositol 3-monoPhosphate ou PI3P) et le PtdIns(3,4)P₂ [Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate ou PI(3,4)P₂]. Cependant, le PI3P reste le second messenger majoritairement produit, et le seul produit en présence de Ca²⁺ (Arcaro et al., 1998 ; Arcaro et al., 2000). Diverses études ont montré que les isoformes C2 α et C2 β peuvent être stimulés, entre autre, par les récepteurs tyrosine kinase (Falasca et Maffucci, 2007) et par les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG ; Maffucci et al., 2005). Très peu d'études ont porté sur l'isoforme C2 γ .

La classe III est la protéine Vps34 (Vacuolar Protein Sorting 34), codée par le gène *PIK3C3*. Cette protéine phosphoryle uniquement le PtdIns pour obtenir du PtdIns3P (Backer, 2008). Vps34 est une protéine impliquée dans le contrôle de l'endocytose, de la phagocytose (endocytose spécifique) et de l'autophagie dans de nombreux types cellulaires, ainsi que fortement impliquée dans la cytokinèse (Thoresen et al., 2010). Vps34 est associée à sa protéine régulatrice Vps15, une protéine sérine/thréonine kinase, qui régule Vps34 et la lie à la membrane. Vps34 et Vps15 sont exprimées de façon ubiquitaire. Il existe plusieurs complexes différents permettant l'activité de Vps34, mettant en jeu différents acteurs tels que Beclin-1, impliqué dans l'autophagie, Rab5 et MTM1 (myotubularine), impliqués dans l'endocytose. De plus, il existerait un lien entre Vps34 et mTOR (mammalian Target Of Rapamycine), protéine clé dans l'intégration de signaux métaboliques (Nobukuni et al., 2005). L'activation de la classe III peut être induite par des nutriments, tels que le glucose ou les acides aminés (Byfield et al., 2005) et par les RCPG (Slessareva et al., 2006).

La classe I, composée d'une sous-unité catalytique (p110) et d'une sous-unité régulatrice, est divisée en deux classes distinctes, les classes IA et IB. La classe IA comprend les sous-unités catalytiques p110 α , p110 β et p110 δ alors que la classe IB possède la sous-unité p110 γ . Ces classes sont définies selon leurs différentes sous-unités régulatrices. En effet, la classe IA est activée et associée avec les sous-unités « p85-like » comprenant les sous-unités p85 α , p55 α , p50 α , codées par *PIK3R1*, p85 β codée par *PIK3R2* et p55 γ codée par *PIK3R3*. La classe IB, elle, s'associe avec les sous-unités régulatrices p101 ou p84, codées par les gènes *PIK3R4* et *PIK3R5*. L'expression de la classe I de PI3K est ubiquitaire, avec cependant un enrichissement en p110 δ et p110 γ dans les leucocytes (Vanhaesebroeck et al., 1997). Le substrat des PI3K de classe I est le PtdIns(4,5)bisphosphates (PIP₂) qui donnera du PtdIns(3,4,5)triphosphates (PIP₃) sous l'effet de l'enzyme. A l'inverse, PTEN (Phosphatase and TENsin homologue) est une phosphatase permettant de catalyser la réaction inverse en déphosphorylant le PIP₃ ce qui aboutit au PIP₂.

F. Activation de la classe I de PI3K

D'un point de vue structural, tous les isoformes de p85 (classe IA) possèdent 2 domaines SH2, interrompus par le domaine de liaison à la sous-unité p110. De plus, les isoformes p85 α et p85 β possèdent un domaine SH3, 2 régions riches en proline ainsi qu'un domaine BH (BCR Homology où BCR = Breakpoint Cluster Region). Contrairement aux isoformes p85, les sous-unités p101 et p84 ne possèdent pas de domaine d'homologie et n'ont pas de domaine de reconnaissance identifié. Au niveau des sous-unités catalytiques, la classe IA est caractérisée par la présence d'un domaine de liaison à la sous-unité p85 en position N-terminal, suivi d'un domaine de liaison à RAS (RDB), d'un domaine C2 et d'un

domaine kinase. Le domaine de liaison à p85 mis à part, la sous-unité p110 γ a la même structure que les p110 de la classe IA.

A l'état basal, l'activité PI3K est inhibée par l'interaction entre les sous-unités p110 et leur sous-unité régulatrice respective, le complexe est cytoplasmique. L'activation des PI3K de classe I se fait par 3 voies majeures : les récepteurs tyrosine kinase, les RCPG et RAS. Les récepteurs tyrosine kinase activent uniquement la classe IA de PI3K, grâce aux domaines SH2 présents dans les isoformes p85. Comme décrit précédemment, lorsqu'un RTK est activé, il s'autophosphoryle sur des résidus tyrosines du domaine intracytoplasmique. Ainsi, le domaine SH2 de p85 va permettre la fixation de p85 à un résidu tyrosine phosphorylé (P-Tyr) ou bien à une protéine adaptatrice, comme Gab1 ou IRS (Insulin Receptor Substrate protein) par exemple, qui recrutera à son tour le complexe p85/p110. Ainsi, p110 étant lié à p85, l'interaction P-Tyr/SH2 permet le recrutement de p110 à la membrane. La fixation P-Tyr/SH2 permet également un changement de conformation qui va alors permettre l'activité kinase de PI3K : formation de PIP₃ membranaire à partir de PIP₂ membranaire qui va alors activer une protéine effectrice, la PDK1. De plus, l'activité PI3K peut être modulée par la phosphorylation de p85 par des membres de la famille SRC (Pleiman et al., 1994), par la PKA (Protéine Kinase A) ou la PKC (Protéine Kinase C). Ainsi, la phosphorylation de la Tyr688 dans le domaine SH2 de p85 par Lck (appartenant à la famille des protéines kinase Src) activerait PI3K, et sa déphosphorylation par SHP-1 (ou PTPN6 ; Protéine Tyrosine Phosphatase, type Non-récepteur, 6) en diminuerait son activité (Cuevas et al., 1999 ; Cuevas et al., 2001). Le second mode d'activation repose sur les RCPG. En effet, suite à l'activation d'un RCPG, une hydrolyse du GDP en GTP, couplé à une sous-unité appelée G α , permet la libération d'un hétérodimère appelé G $\beta\gamma$. Cet hétérodimère va alors être capable d'activer les sous-unités p110 β et p110 δ (Stoyanov et al., 1995). Enfin, RAS et d'autres petites protéines GTPases (Rab5, RHO) jouent également un rôle dans l'activation de PI3K.

Ainsi, dans une étude de 2004, les auteurs ont montré que HRAS, NRAS, KRAS, RRAS et TC21 induisent l'activité de p110 α et p110 γ (Rodriguez-Viciano et al., 2004). De plus, seuls RRAS et TC21 sont capables d'activer p110 δ ; leurs expérimentations ont montré qu'aucun membre de la famille de RAS n'active p110 β . D'autres études ont cependant mis en avant l'activation de p110 β par Rab5, GTPase appartenant à une famille différente de RAS (Christoforidis et al., 1999) ainsi que par RAC1 et CDC42 (famille RHO GTPases).

G. Signalisation de la voie PI3K

Bien que les isoformes de PI3K de classe I aient des régulations très différentes, leur activation induit la formation de PIP₃ qui va activer la voie PDK1/AKT (Figure 20). Le PIP₃ membranaire néoformé va recruter AKT (= PKB ou Protéine Kinase B) par son domaine PH, puis va être phosphorylé par PDK1 (Phosphatidylinositol-Dependent Kinase 1) sur sa Thr308 (Thréonine) mais aussi sur sa Ser473 (Sérine) par le complexe mTORC2 (mammalian Target of Rapamycin Complex 2) ou par la DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase). Notons qu'il existe des phosphatases qui vont réaliser l'effet opposé : PP2A va déphosphoryler la Thr308 et PHLPP1/2 va déphosphoryler la Ser473. Une fois activé, AKT va phosphoryler de nombreux effecteurs en aval et par conséquent influencer un grand nombre de processus biologiques divers. Parmi ces effecteurs, nombreux sont ceux qui vont réguler la prolifération cellulaire et la survie cellulaire.

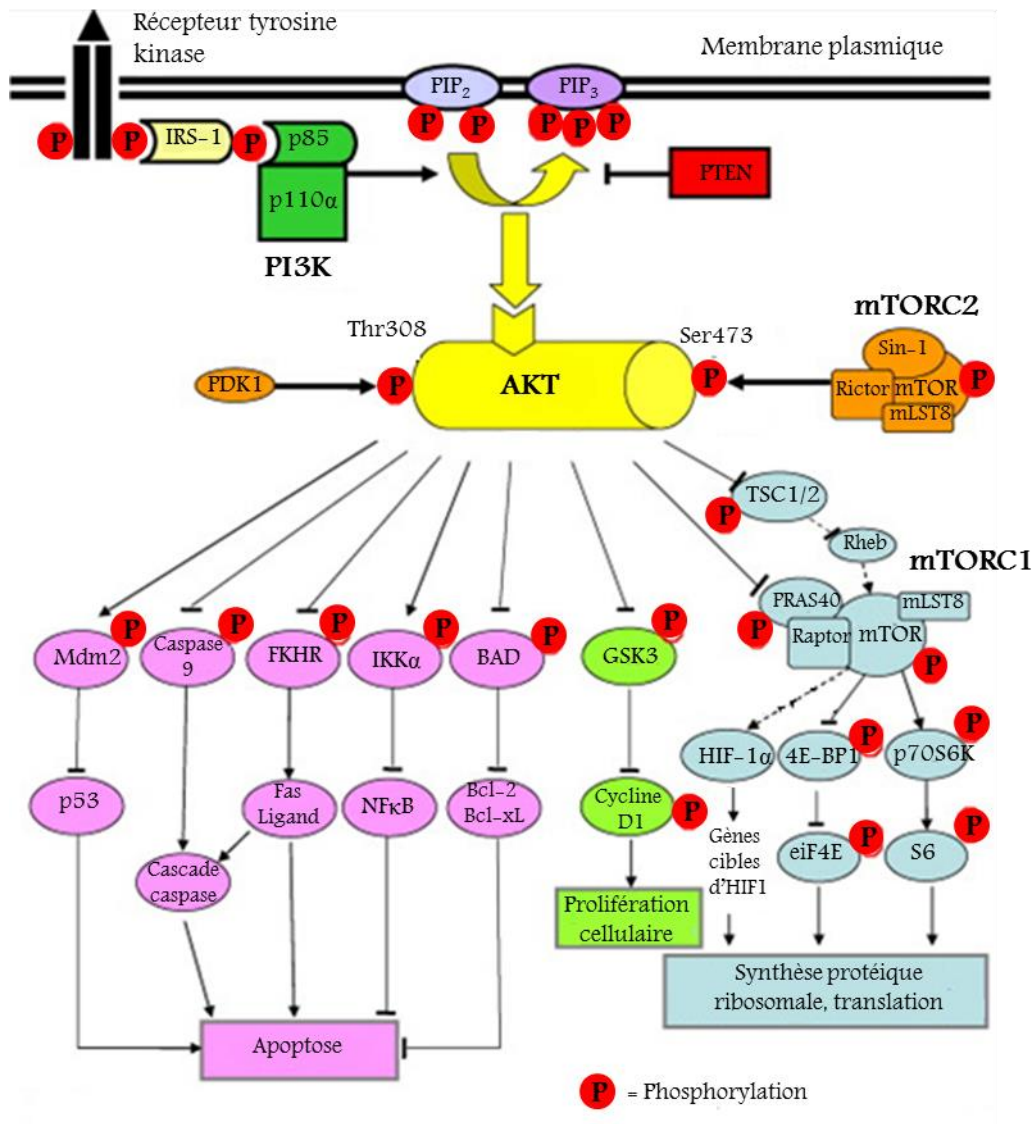


Figure 20 . La voie de signalisation PI3K. L'activation des PI3K de la classe I induit la formation de PIP₃ à partir du substrat PIP₂ (phosphorylation en position 3 du cycle). Le PIP₃ active directement, ou via PDK1, la protéine AKT, carrefour important dans la voie de signalisation PI3K. AKT va activer/inhiber de nombreux effecteurs qui contrôlent la prolifération/survie/mort cellulaire. D'après Yap et al., 2008.

Survie cellulaire. La survie cellulaire repose surtout sur l'inhibition de la mort programmée ou apoptose. Soit l'activation d'AKT engendre une activation d'inhibiteur de l'apoptose, soit une inhibition de protéines pro-apoptotiques. Ainsi, AKT va activer les XIAP (appartient aux protéines inhibitrices de l'apoptose ou IAP) en les protégeant de l'ubiquitination et donc de la dégradation. De plus, AKT active l'enzyme E3-ligase MDM2 (Mouse Double Minute 2

homolog) qui va alors induire l'ubiquitination et la dégradation de p53, protéine importante dans la régulation de gènes cibles induisant, entre autre, l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (Sasaki et al., 2011). Parallèlement, AKT va inhiber BAD (Bcl-2 Antagonist of cell Death), BIM et BAX (Bcl-2 Associated X protein), qui sont des protéines pro-apoptotiques. Le facteur de transcription CREB (Cyclic AMP response element binding protein) est aussi phosphorylé par AKT, ce qui induit l'augmentation de la transcription de gènes anti-apoptotiques codants pour Bcl-2, Mcl-1 et AKT lui-même (Pugazhenthhi et al., 2000; Wang et al., 1999). AKT peut également activer la NOS (Nitric Oxide Synthase) et la voie NFκB qui va empêcher l'apoptose.

Prolifération cellulaire. Afin d'optimiser la prolifération cellulaire, AKT va cibler les protéines impliquées dans le cycle cellulaire (Hers et al., 2011 ; Martelli et al., 2012). AKT va inhiber la protéine GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) qui ne peut donc plus réprimer la cycline D, ce qui a pour conséquence la progression du cycle cellulaire. De plus, AKT inhibe directement p21, p27, Myt1 (appartient à la famille Wee), induisant également la progression du cycle cellulaire.

Métabolisme du glucose et autres voies métaboliques. Outre l'inhibition de l'apoptose, l'inhibition de la GSK-3 par AKT lève l'inhibition existant sur la glycogène synthase et induit donc la synthèse de glycogène. De plus, l'activation d'AKT induit le contrôle des transporteurs du glucose et notamment GLUT3 et GLUT4. En effet, AKT induit la translocation de ces transporteurs présents dans des vésicules de transport au niveau de la membrane plasmique, permettant *in fine* la séquestration du glucose dans les cellules (Shepherd, 2005). De plus, l'activation de mTOR engendre une régulation positive du métabolisme des lipides et du cholestérol.

Synthèse protéique. AKT lève les inhibitions qui existent sur mTORC1, soit en « inhibant des inhibiteurs » tels que PRAS40 (Prolin-Rich AKT Substrate 40 kDa) ou TSC1/2 (Tuberous Sclerosis Complex 1/2), soit en activant directement mTOR. L'activation de mTORC1 permet l'activation de p70S6K (S6 Kinase) ou alors l'inactivation de 4E-BP1 (4E-Binding Protein 1) qui, une fois phosphorylé, va relarguer eIF4E (facteur de transcription). *In fine*, la synthèse protéique est activée. Parmi cette néoproduction protéique, on trouve VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et HIF-1 α (Hypoxia Inductible Factor 1 α) qui vont contrôler l'angiogenèse (Graupera et Potente, 2013).

Les facteurs de transcription FOXO. Les protéines FOXO (Forkhead box) peuvent moduler l'apoptose, les transitions dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la différenciation cellulaire ainsi que le métabolisme du glucose. AKT peut hyperphosphoryler les facteurs de transcription FOXO1a, FOXO3a et FOXO4 nucléaires, ce qui engendre soit l'ubiquitination de ces derniers par SKP2 (E3-ligase) et donc leur dégradation, soit leur fixation à la protéine 14-3-3 qui induit le transport nucléaire vers le cytoplasme et donc inhibe la transcription de gènes cibles (Huang et Tindall, 2007 ; Huang et Tindall, 2011).

L'autophagie. L'activation de mTORC1 induit l'inhibition de l'autophagie (Shanware et al., 2013), correspondant à un processus par lequel les cellules sont en mesure de créer et d'utiliser l'énergie intracellulaire en dégradant des protéines cytoplasmiques et des organites dans les lysosomes, notamment pendant les périodes des carences nutritionnelles.

H. La voie PI3K dans le cancer

L'altération de la voie PI3K a été montrée dans de nombreux cancers. Elle est caractérisée par plusieurs aberrations génétiques, qui vont induire une suractivation de la voie PI3K. De

nombreuses amplification/mutations ont été décrites pour le gène *PIK3CA*, codant pour la sous-unité p110 α . Ces mutations sont fréquentes dans l'exon 9 (E542K et E545K) et dans l'exon 20 (H1047R) et engendrent une activation constitutive de la voie PI3K (Samuels et al., 2004). En 2005, Bader et son équipe ont montré que l'inoculation de membrane chorioallantoïque d'un embryon de poule avec des fibroblastes embryonnaires de poule transformés par les mutant H1047R, E542K et E545K *in vivo* induit des tumeurs chez l'animal de type hémangiosarcome (tumeur vasculaire ; Bader et al., 2006). Récemment, 2 de ces 3 mutations fréquentes ont été détectées dans l'ostéosarcome, H1047R et E545K (Choy et al., 2012). La suractivation de la voie PI3K peut également être due à une perte de régulateurs négatifs dont PTEN, phosphatase ayant un rôle strictement opposé à PI3K (déphosphorylation du PIP₃ en PIP₂). Dans plusieurs lignées d'ostéosarcome, le micro-ARN 221 (miR-221), ciblant PTEN, est surexprimé par rapport à son expression dans les ostéoblastes ; l'inhibition de ce miR-221 diminue la prolifération et la survie des cellules d'ostéosarcome (Zhao et al., 2013). De plus, la surexpression du miR-221 a été détectée dans 42/60 ostéosarcomes de patients (60 dont 36 primaires et 24 récurrents) par RT-qPCR. Ils ont également montré que 81 % des ostéosarcomes surexprimant le miR-221 avaient un taux faible de PTEN. Enfin, d'autres protéines clés dans la voie PI3K peuvent être amplifiées ou mutées dont AKT, la sous-unité p85 de PI3K ou certains récepteurs à activité tyrosine kinase [PDGFR dans l'ostéosarcome (Kubo et al., 2008)] ou bien mutés/sous-exprimés dont TSC (tuberous sclerosis).

IV. Objectifs de la thèse

Le tissu osseux est un tissu conjonctif en perpétuel remaniement, le remodelage osseux, qui repose sur un équilibre entre l'apposition et la résorption osseuse. Tout déséquilibre engendre des pathologies osseuses bénignes ou malignes qui peuvent être soit ostéocondensantes, soit ostéolytiques, soit mixtes. Parmi ces pathologies, l'ostéosarcome est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente. Elle touche préférentiellement l'enfant et les jeunes adultes, avec un second pic de survenue vers 60 ans. Par définition, l'ostéosarcome est caractérisé par la formation de substance ostéoïde tumorale associée à une ostéolyse. Le protocole thérapeutique actuel repose sur une polychimiothérapie pré et post-opératoire, associée à l'exérèse de la pièce tumorale en « bloc large ». Bien que les avancées dans les protocoles de chimiothérapie aient permis d'améliorer le taux de survie des patients, la forte toxicité de ces molécules, un mauvais pronostic si des métastases pulmonaires sont détectées lors du diagnostic ou encore une récurrence/résistance de la pathologie sont des arguments indiscutables dans la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques des ostéosarcomes.

Depuis la découverte du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) en 1978 (Carpenter et al., 1978), de nombreuses études ont mis en avant l'importance des récepteurs tyrosine kinase (RTK) aussi bien d'un point de vue physiologique que pathologique. Répartis en 20 familles, les récepteurs à activité tyrosine kinase sont des récepteurs membranaires ayant une activité tyrosine kinase intrinsèque. Ainsi, ces récepteurs sont impliqués dans la prolifération cellulaire, la progression dans le cycle cellulaire, la mort cellulaire, l'angiogenèse, le métabolisme glucidique, etc, mais également dans la tumorigenèse et progression tumorale de nombreux cancers. L'activation de ces récepteurs par différents facteurs de croissance spécifiques engendre un ensemble de voies de signalisation

extrêmement régulées et complexes, dont la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Ainsi, la dérégulation (sur-activation) des récepteurs tyrosine kinase ainsi que de la voie de signalisation PI3K étant admise comme étant un phénomène clé dans la survenue de cancers et dans leur progression, de nombreux inhibiteurs spécifiques ont été développés.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'imatinib mésylate (Glivec®). L'imatinib mésylate est une molécule active inhibitrice de l'activité tyrosine kinase incluant BCR-Abl, c-KIT, les récepteurs au PDGF et au M-CSF. D'un point de vue clinique, l'imatinib mésylate a fait ces preuves dans le traitement de Leucémies Myéloïdes Chroniques (LMC) positives pour la protéine de fusion BCR-Abl mais aussi dans le traitement de Tumeurs Stromales Gastro-Intestinales (GIST) ayant des mutations de c-KIT. D'un point de vue osseux, de nombreuses études ont mis en évidence un impact de cette molécule sur les cellules souches mésenchymateuses/ostéoblastes (par le récepteur au PDGF) et sur les ostéoclastes (par le récepteur au M-CSF), avec notamment des rapports cliniques montrant un effet de l'imatinib mésylate sur le volume osseux de patients ayant reçu ce traitement. Cet effet osseux reste néanmoins controversé selon les études. Une augmentation de la densité osseuse, soit trabéculaire (O'Sullivan et al., 2009), soit corticale (Jönsson et al., 2008 ; Fitter et al., 2008) a pu être observée dans certaines études. Cependant, une diminution de la densité osseuse corticale après au moins 2 ans de traitement a également été rapportée dans une étude récente (Berman et al., 2013). Etant donné les résultats obtenus dans la LMC et dans les GIST attestant l'effet anti-tumoral de la molécule, ajouté à son effet décrit sur la physiologie osseuse et notamment dans l'ostéoblaste, notre hypothèse de travail a donc été de tester l'effet de l'imatinib mésylate dans l'ostéosarcome.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés de plus près à la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Dans de nombreux cancers incluant le cancer du sein ou de la prostate, la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est fréquemment dérégulée,

consécutivement à une surexpression, à des mutations gain de fonction, à la perte de molécules clés telle que PTEN (phosphatase, effet opposé à celui de PI3K) ou à la suractivation de récepteurs tyrosine kinase. Ainsi, depuis quelques années, de nombreux inhibiteurs (spécifique – dual – pan) de cette voie ont été développés, ciblant principalement PI3K, AKT et mTOR. La deuxième partie de ce travail de thèse a donc porté sur l'étude de l'effet du NVP-BEZ235, inhibiteur des isoformes p110 de PI3K et de mTOR, ainsi que du BYL719, inhibiteur spécifique de l'isoforme p110 α , dans l'ostéosarcome. Enfin, l'effet du BYL719 a également été étudié sur la physiologie osseuse.

En résumé, ce travail de thèse a porté sur l'étude de l'effet de l'imatinib mésylate, du NVP-BEZ235 et du BYL719 dans l'ostéosarcome *in vitro* ainsi que *in vivo*, afin de déterminer le potentiel thérapeutique ou adjuvant de ces molécules qui pourraient améliorer, à terme, la prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome. De plus, l'effet du BYL719 sur la physiologie osseuse a également été étudié *in vitro* et *in vivo*.

MATERIELS & METHODES

I. Molécules

Les inhibiteurs de voies de signalisation cellulaire (imatinib mésylate, BYL719, NVP-BEZ235) utilisés dans ce travail ont été fournis par le Laboratoire Novartis Pharma (Bâle, Suisse). Pour les expérimentations *in vitro*, les trois molécules sont solubilisées à une concentration de stockage de 10 mM, l'imatinib mésylate est reconstitué dans de l'eau stérile, le BYL719 et le NVP-BEZ235 sont repris dans 100 % de DMSO (DiMéthylSulfOxide, Sigma, France). Pour les expérimentations *in vivo*, l'imatinib mésylate est reconstitué dans de l'eau, le BYL719 dans de l'eau contenant 0,5 % de méthylcellulose (Sigma) et le NVP-BEZ235 dans 1 volume de NMP (N-Méthyl-2-Pyrrolidinone ; Sigma) pour 9 volumes de PEG300 (PolyEthylène Glycol ; Sigma).

II. Effet des molécules dans l'ostéosarcome

A. Cellules d'ostéosarcome et conditions de culture

Lors des expérimentations *in vitro*, 5 lignées adhérentes d'ostéosarcome ont été utilisées : deux lignées humaines (MG-63 et HOS), deux lignées de souris (MOS-J et POS-1) et une lignée de rat (OSRGA). Les cellules MG-63 et HOS proviennent de l'ATCC (American Tissue Cell Collection, Promochem, France). Les cellules MOS-J, de nature ostéogène, dérivent d'un ostéosarcome murin développé spontanément chez des souris de souche C57BL/6J (Joliat et al., 2002). Ces cellules ont été fournies au laboratoire par le Dr Shultz (Jackson Laboratory, USA). Les cellules POS-1 sont des cellules adhérentes qui dérivent d'un ostéosarcome murin développé spontanément chez des souris de souche C3H/HeN (Uesugi

et al., 2000). Enfin, les cellules OSRGA dérivent d'un ostéosarcome radio-induit chez le rat (Klein et al., 1977).

La culture des cellules a été réalisée dans des conditions de normoxie (37°C, 5 % de CO₂). Les cellules humaines et de rat ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza, Belgique) supplémenté par 10 % de SVF (Sérum de Veau Foetal, Hyclone, USA). Les cellules des souris ont été cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium, Lonza) supplémenté par 10 % de SVF.

B. Expérimentations *in vitro*

Viabilité cellulaire. Les cellules ont étéensemencées en plaques 96 puits selon une densité spécifique à chaque lignée : 1000 cellules par puits pour la lignée MOS-J, 1500 cellules par puits pour les lignées MG-63 et OSRGA, 2000 cellules par puits pour les lignées HOS et POS-1. Les cellules ont été cultivées pendant 72 heures en présence ou en absence de la molécule puis la viabilité cellulaire a été déterminée par un test colorimétrique ou kit XTT [Sodium 3'-[1-(phénylaminocarbonyl)-3,4-tétrazolium]-bis (4-méthoxy-6-nitro) benzenesulfonicacidhydrate ; Roche, Allemagne]. Les résultats ont été obtenus par la lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 490 nm (VICTOR 2 ; Beckman Coulter), puis normalisés par rapport au contrôle.

En parallèle, un comptage manuel basé sur l'exclusion du bleu trypan a été réalisé. Les cellules ont étéensemencées en plaques 24 puits selon une densité spécifique à chaque lignée : 10x10³ cellules par puits pour la lignée MOS-J, 15x10³ cellules par puits pour les lignées MG-63 et OSRGA, 20x10³ cellules par puits pour les lignées HOS et POS-1. Les cellules ont été cultivées pendant 24 et 48 heures en présence ou en absence de la molécule

à étudier. Les cellules adhérentes ont été décollées après incubation pendant 5 min à 37°C avec de la trypsine-EDTA [BioWhittaker, trypsine : 0,5 g/L; EDTA (Ethylene Diamine TetraaceticAcid) : 0,2 g/L] et ajoutées aux cellules surnageantes. Le comptage des cellules vivantes (translucides) et mortes (bleues) a été réalisé sur une cellule de Malassez, après dilution dans le bleu trypan.

Vidéo-microscopie « Time Lapse ». Cette expérimentation a été réalisée en collaboration avec Philippe Hulin, responsable du Plateau d'Imagerie Cellulaire (PICell ; Nantes). Les cellules ont étéensemencées en plaques 24 puits selon la densité décrite précédemment. Les cellules sont cultivées en présence ou non de la molécule pendant 72 heures et suivies par vidéo-microscopie dans une chambre respectant les conditions de normoxie. Deux acquisitions par puits (photographie par contraste de phase) sont réalisées toutes les 10 minutes dans un système d'imagerie combinant un microscope Leica DMI 6000B (objectif x10 ; Wetzlat, Allemagne) à une caméra Coolsnap HQ2 (Roper Scientific, Evry, France). Les films ont été assemblés et convertis en format AVI à l'aide du logiciel Métamorphe 7.5 (Roper Scientific). Le nombre de divisions cellulaires et de cellules mortes a été évalué par comptage manuel sur Image J.

Cycle cellulaire. Les cellules ont étéensemencées en plaques 6 puits selon une densité spécifique à chaque lignée : 100×10^3 cellules par puits pour la lignée MOS-J, 150×10^3 cellules par puits pour la lignée MG-63 et 200×10^3 cellules puits pour les lignées HOS et POS-1. Les cellules sont cultivées en présence ou non de la molécule pendant 18 à 24 heures selon les molécules (imatinib mésylate = 5 à 40 μ M selon les lignées ; NVP-BEZ235 = 200 nM ; BYL719 = 25 μ M). Les cellules adhérentes sont décollées par de la trypsine/EDTA et poolées aux cellules surnageantes, centrifugées 5 min à 1200 g, puis lavées au dPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline ; Lonza). Après 30 min de fixation à l'éthanol 70 % à 4°C, les cellules sont incubées dans le tampon PC (Phospho-Citrate) pendant 30 min à

température ambiante puis dans une solution « PIB-RNase » contenant 0,12 % de Triton X-100 (Sigma), 0,12 mM d'EDTA et 100 µg de RNase (Promega) pendant 30 min à 37°C. Enfin, 50 µg/ml d'iodure de propidium (Sigma) sont ajoutés pendant 20 min à 4°C à l'abri de la lumière. Le cycle cellulaire est étudié par cytométrie en flux (Cytomics FC500, Beckman Coulter, France), basé sur la quantité d'ADN 2N et 4N, puis est analysé par le logiciel « Multicycle DNA content ».

Test de migration. Les cellules sontensemencées en plaques 6 puits jusqu'à confluence. Afin de bloquer la prolifération cellulaire, 4 µg/ml de mitomycine C (Sigma) sont ajoutés pendant 1 heure. Une blessure du tapis cellulaire (monocouche) est réalisée à l'aide d'un cône plastique puis les cellules sont cultivées en présence ou non des molécules d'intérêt pendant 24 heures. Des photographies en contraste de phase sont prises à 0 et 24 heures afin de suivre l'évolution migratoire des cellules.

Voie de signalisation. Les cellules sontensemencées en plaques 6 puits selon les densités déjà décrites et sont mises en présence des molécules à étudier pendant un temps maximal de 48 heures. Après un lavage au dPBS, les cellules sont lysées avec du tampon de lyse RIPA (Radio-Immuno Precipitation Assay) contenant 150 mmol/L de NaCl, 1 % NP-40, 0,25 % sodium deoxycholate, 5 % Tris pH 7,4, 1 mmol/L de Na₃VO₄ (sodium orthovanadate), 0,5 mmol/L de PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) et du PIC (Protease Inhibitor Cocktail). Après 30 minutes d'incubation à 4°C, les lysats sont centrifugés pendant 10 minutes à 9 000 g afin d'éliminer les débris cellulaires. La quantité de protéines est déterminée avec le kit BCA (Sigma). En plaque 96 puits, 10µL de lysat cellulaire total dilué au 1/10^{ème} ou d'une gamme étalon de BSA (Bovin Serum Albumin) sont mis en présence de 200 µl de réactif BCA (Sulfate de cuivre dilué au 1/50^{ème} dans une solution d'acide bicinchoninique ; Sigma). Après 30 minutes d'incubation, les densités optiques sont mesurées à 570 nm par le lecteur de plaques VICTOR 2. Le western blot est réalisé sur 40 µg

de lysat protéique total. Les échantillons sont dilués dans du Laemmli 4X, portés à ébullition pendant 5 minutes puis chargés dans un gel 10 % de polyacrylamide. Les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse dans un tampon dénaturant pendant approximativement 2 heures. Lorsque la migration est achevée, les protéines sont transférées sur la nuit sur une membrane PVDF (PolyVinylideneFluoride, Immobilion-P, Millipore) dans une cuve contenant du tampon de transfert, avec un courant de 40 mA. Après plusieurs lavages au PBS-Tween 0,05 % et saturation dans du PBS-Tween 0,05 % + 3 % de BSA, les membranes sont incubées toute la nuit avec l'anticorps primaire (cell signaling technology ; Tableau 3) dilué dans la solution de saturation (PBS-Tween 0,05 % + 3 % de BSA). Après plusieurs lavages, les membranes sont incubées pendant 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés à la HRP (Horse Radish Peroxydase ; Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) dilués dans du PBS-Tween 0,05 % + 5 % de lait écrémé. La révélation des protéines se fait par l'ajout d'une solution ECL (Enhanced Chemi Luminescent, Pierce, Rockford, USA) qui réagit avec la HRP. La luminescence est détectée par une caméra G-Box (Syngene, Cambridge, USA).

Protéine cible	Phosphorylation	Dilution	Anticorps secondaire	Référence
P-mTOR	Ser 2448	1:1000	Lapin 1:10 000	2971
mTOR		1:1000	Lapin 1:10 000	2972
P-AKT	Thr 308	1:1000	Lapin 1:10 000	2965
P-AKT	Ser 473	1:1000	Lapin 1:10 000	9271
AKT		1:1000	Lapin 1:10 000	9272

Tableau 3 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés en western blot. Tous les anticorps proviennent de cell signaling technology.

PCR semi-quantitative. Les ARN totaux ont été extraits en utilisant le kit d'extraction NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel). Les cellules sont lysées par 350 μ l de tampon RA1 additionné de 1% de β -mercaptoéthanol (BME ; Sigma). Le lysat est ensuite transféré dans un tube eppendorf et 350 μ l d'éthanol à 70% sont ajoutés pour débiter la précipitation des acides nucléiques. L'ensemble est transféré sur une colonne d'extraction qui va fixer les ARN. La colonne est lavée par 350 μ l de solution MDB afin d'éliminer les sels de la membrane de silice. Pour détruire l'ADN génomique résiduel, un traitement par 95 μ l de DNase I est effectué pendant 15 minutes à température ambiante. Trois lavages sont réalisés par respectivement 200 μ l de RA2, 600 μ l de RA3 et 250 μ l de RA3 afin de purifier les ARN fixés à la membrane. Pour finir, les ARN sont élués par 40 μ l de RNase Free Water par centrifugation. La concentration en ARN est ensuite mesurée au Nano Drop (Thermo Scientific), le rapport DO260/DO280 doit être compris entre 1,8 et 2 (pureté de l'échantillon). L'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé à partir de 5 μ g d'ARN total, en utilisant le kit de RT-PCR ThermoScript (Invitrogen), dans un volume final de 20 μ L. Le mélange réactionnel, composé de 5 μ g d'ARN + 1 μ l de random primers + 1 μ l de dNTP + eau Dnase-RNase free qsp 13 μ l (quantité suffisante pour), est incubé pendant 5 minutes à 65°C puis 5 minutes sur glace. Ensuite, 1 μ l d'enzyme Maximus + 4 μ l de tampon de « reverse-transcription » sont ajoutés aux 13 μ l. L'ensemble est incubé 30 minutes à 50°C puis 5 minutes à 85°C puis mis sur glace. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est réalisée sur 2 μ l d'ADNc + 2 μ l d'amorce sens + 2 μ l d'amorce anti-sens (Tableau 4) + 5 μ l de tampon de réaction 10X + 1,5 μ l de MgCl₂ 50 mM + 1 μ l de dNTP 10 mM + 0,25 μ l de Taq + eau DNase/RNase-free qsp 50 μ l.

Espèce	Gène ciblé	Séquence des amorces sens (S) et anti-sens (AS)		Amplicon
Humain souris	<i>PDGFRα</i>	S	5' - AAG ATA ATG ACT CAC CTG GGG	495 pb
		AS	5' - AGC CAA AAA CTC CAT TCC TCG	
Humain souris	<i>PDGFRβ</i>	S	5' - AGG TGA TTG AGT CTG TGA GC	630 pb
		AS	5' - TAT CGT AAG GGG CCA TGT AG	
Rat	<i>PDGFRα</i>	S	5' - CAG GTC TAG TGA GAA GCA AGC TC	382 pb
		AS	5' - CGA TCT CTG GAT GTC GGA GTA	
Rat	<i>PDGFRβ</i>	S	5' - GGT ACG TGT GAA GGT GTC AGA AG	275 pb
		AS	5' - GGC TCT CCT CCT TGG AAC TAT T	
Humain souris rat	<i>18S</i>	S	5' - TCA AGA ACG AAA GTC GGA GGT TCG	462 pb
		AS	5' - TTA TTG CTC AAT CTC GGG TGG CTG	

Tableau 4 . Séquence des amorces de PCR semi-quantitative. Les séquences ont été dessinées grâce au logiciel Primer3. La taille des amplicons est exprimée en paire de bases (pb).

Le protocole de PCR est le suivant : 94°C 5 minutes (x1) – 94°C 30 secondes ; 56°C 30 secondes ; 72°C 30 secondes (x35) – 72°C 5 minutes (x1). Les produits de PCR, dilués au 1/5^{ème} dans du bleu de chargement ainsi que le marqueur de taille (Invitrogen), migrent dans un gel à 2 % d'agarose pendant 30 minutes à 100 V dans une cuve remplie de TAE 1X (Tris-Acetate-EDTA). Le gel est ensuite incubé 10 à 15 minutes dans une solution de gel RED (Biotium) qui s'intercale dans l'ADN, puis exposé aux UV (InGenius, Syngene).

Activité Caspase. Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits selon une densité décrite précédemment. Les molécules sont ajoutées pendant 3 à 48 heures. Un contrôle positif est réalisé : 0,1 μ M de staurosporine pendant toute la nuit. Les cellules sont lysées dans du tampon de RIPA puis la concentration en protéines est déterminée comme décrit précédemment (BCA). L'activité caspase 3/7 se mesure par une technique fluorimétrique utilisant le kit Apo-ONE[®] homogeneous Caspases-3/7 (Promega). Ce test repose sur le clivage d'un substrat, le Z-DEVD-R110, par des caspases actives pour libérer la rhodamine 110, fluorescente. Dans une plaque 96 puits, noire à fonds transparents, 10 μ l de lysat protéique total + 40 μ l de tampon de lyse RIPA + 50 μ l de réactif (1 μ l de substrat Z-DEVD-

R110 pour 99 µl de tampon réactionnel) sont déposés. Après 30 minutes à 18 heures d'incubation, la plaque est lue à 485 et 535 nm (excitation/émission) avec le lecteur de plaque Mithras LB940 (Berthold). La fluorescence émise est normalisée par rapport à la quantité de protéines.

Phosphoprotéome des Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK). Afin de détecter les cibles potentielles de l'imatinib mésylate, une membrane commerciale contenant 49 anticorps dirigés contre des récepteurs tyrosine kinase phosphorylés a été utilisée (kit ARY001B ; R&D System, UK). Les cellules HOS sont traitées ou non pendant 45 minutes avec 50 µM d'imatinib mésylate. Les lysats protéiques sont préparés selon les recommandations du fournisseur et sont dosés comme décrit précédemment (BCA). Les membranes sont saturées pendant 1 heure à température ambiante puis les échantillons, dilués dans ce même tampon de saturation, sont déposés sur la membrane toute la nuit à 4°C. Après 3 lavages, les anticorps Phospho-Tyrosine (P-Tyr) couplés à la HRP sont dilués dans un second tampon de saturation (1/5000^{ème}) et déposés sur les membranes pendant 2 heures à température ambiante. Après 3 lavages, 1 ml de réactif type ECL (chemi reagent mix[®]) est ajouté sur les membranes pendant 1 minute puis retiré. La chimioluminescence est détectée par une caméra G-Box (Syngene, Cambridge, USA).

C. Expérimentations *in vivo*

Modèles animaux. Les effets de molécules ont été étudiés dans trois modèles murins différents. Les souris (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) sont hébergées à l'UTE (Unité Thérapeutique Expérimentale ; Faculté de Médecine, Nantes) dans des conditions exemptes de pathogènes, en conformité avec les directives du Comité d'Éthique et sous la

supervision de personnes autorisées. Les souris arrivent à l'âge de 4 semaines et sont incluses dans un protocole expérimental après 1 semaine d'acclimatation.

- **Modèle syngénique ostéoblastique** : des souris C57BL/6J mâles âgées de 5 semaines sont anesthésiées par l'inhalation d'un mélange d'isoflurane et d'air (2 % d'isoflurane pour 1 L/min d'air) avant de recevoir une injection intra-musculaire de 1 million de cellules MOS-J en site para-tibial dans un volume de 50 µl de PBS. Les tumeurs sont détectées 7 jours après l'injection.

- **Modèle syngénique ostéolytique** : des souris C3H/HeN mâles âgées de 5 semaines sont anesthésiées par l'inhalation d'un mélange d'isoflurane et d'air (2 % d'isoflurane pour 1 L/min d'air). Un fragment tumoral de 2x2x2 mm³ est transplanté au contact du tibia après avivement du périoste. Les tumeurs sont détectées 7 jours après la transplantation. Ce modèle est initialement induit par l'injection de 2 millions de cellules POS-1 dans le coussinet plantaire gauche des souris dans 50 µl de PBS. La tumeur primitive se développe au site d'injection en 2 à 3 semaines, avant d'être transplantée chez des souris naïves.

- **Modèle xénogénique ostéoblastique** : des souris Nude-NMRI femelles âgées de 5 semaines sont anesthésiées par l'inhalation d'un mélange d'isoflurane et d'air (2 % d'isoflurane pour 1 L/min d'air) avant de recevoir une injection intra-musculaire de 2 millions de cellules HOS en site para-tibial dans un volume de 50 µl de PBS. Les tumeurs sont détectées 7 jours après l'injection

Les volumes tumoraux (V), le poids et les paramètres comportementaux sont suivis au minimum 3 fois par semaine. Deux diamètres perpendiculaires (la longueur « L » et la largeur « l ») sont mesurés avec un pied à coulisse puis le volume tumoral est calculé selon la formule : $V = (L \times l^2)/2$. Les souris sont mises à mort par dislocation cervicale lorsque le

volume tumoral atteint 2000 mm³ ou si des paramètres anormaux sont détectés (perte de poids supérieure à 10 % du poids de l'animal, prostration...)

Protocoles. Dans les expérimentations *in vivo*, deux protocoles thérapeutiques peuvent être distingués : un protocole préventif, commençant le jour suivant l'induction de la tumeur, et un protocole curatif, commençant lorsque la tumeur est détectable par palpation. Trois molécules ont été étudiées : l'imatinib mésylate (Tableau), le NVP-BEZ235 (Tableau) et le BYL719 (Tableaux 5, 6 et 7). Les 3 drogues sont administrées tous les jours par gavage.

	Protocoles	Modèle animal	Groupe thérapeutique
Imatinib mésylate	Protocole n°I Préventif	C57BL/6J – MOS-J syngénique	4 groupes de 6 souris : contrôle ; 25 mg/kg ; 50 mg/kg ; 100 mg/kg
	Protocole n°II Préventif	C3H/HeN – POS-1 syngénique	3 groupes de 6 souris : contrôle ; 50 mg/kg ; 100 mg/kg
	Protocole n°III Curatif	C57BL/6J – MOS-J syngénique	3 groupes de 6 souris : contrôle ; 50 mg/kg ; 100 mg/kg

Tableau 5 : Protocoles thérapeutiques testant l'effet de l'imatinib mésylate *in vivo*.

	Protocoles	Modèle animal	Groupe thérapeutique
NVP- BEZ235	Protocole n°I Préventif	C57BL/6J – MOS-J syngénique	2 groupes de 6 souris : contrôle ; 45 mg/kg
	Protocole n°II Préventif	Nude-NMRI – HOS xénogénique	2 groupes de 6 souris : contrôle ; 45 mg/kg

Tableau 6 : Protocoles thérapeutiques testant l'effet du NVP-BEZ235 *in vivo*.

	Protocoles	Modèle animal	Groupe thérapeutique
BYL719	Protocole n°I Préventif	C57BL/6J – MOS-J syngénique	3 groupes de 6 souris : contrôle ; 12,5 mg/kg ; 50 mg/kg
	Protocole n°II Préventif	Nude-NMRI – HOS xénogénique	2 groupes de 6 souris : contrôle ; 50 mg/kg
	Protocole n°III Préventif Association	C57BL/6J – MOS-J syngénique	4 groupes de 6 souris : contrôle ; ifosfamide (IFOS) 30 mg/kg ; BYL719 (BYL) 50 mg/kg ; BYL 50 mg/kg + IFOS 30 mg/kg

Tableau 7 : Protocoles thérapeutiques testant l'effet du BYL719 *in vivo*.

Microscanner. La microarchitecture osseuse est analysée par microscanner haute résolution (μ CT) Skyscan 1076 (Skyscan, Belgique) sur des prélèvements *ex-vivo*. Les paramètres d'acquisition sont de 18 μ m (taille des pixels), 0,8° (rotation caméra), 50 kV et filtre en aluminium 0,5 mm. Les reconstructions en 3 dimensions (3D) sont réalisées à l'aide du logiciel CTvox (Skyscan). Les analyses morphométriques sont réalisées sur 200 coupes pour la zone corticale à l'aide du logiciel CTan (Skyscan) et sur 50 coupes sous la plaque de croissance pour la zone trabéculaire. Les paramètres osseux sont listés ci-après : volume tissulaire (TV, mm^3), volume osseux (BV, mm^3), pourcentage de volume osseux (BV/TV, %), surface tissulaire (TS, mm^2), surface osseuse (BS, mm^3), surface osseuse/volume osseux (BS/BV, mm^{-1}), densité osseuse (BS/TV, mm^{-1}), épaisseur trabéculaire et corticale (Tb.Th ; C.Th mm) et espace trabéculaire (Tb.Sp, mm).

Histologie. Immédiatement après la mise à mort des animaux, les tibias et tissus sont fixés dans 10 % de PFA (ParaFormAldehyde) puis décalcifiés dans une solution PBS contenant 4,13 % d'EDTA et 0,2 % de PFA à l'aide d'un automate micro-ondes multifonctionnel KOS (Mikron Instruments, USA) pendant plusieurs jours, selon le taux de calcification des prélèvements. Les prélèvements sont ensuite déshydratés dans des bains d'alcool croissants, clarifiés par un solvant intermédiaire organique (toluène) et imprégnés par la paraffine. Les échantillons sont ensuite inclus en paraffine puis coupés à 3 μ m à l'aide d'un microtome rotatif (Leica). Les coupes sont « défroissées » dans un bain-marie à 40°C puis étalées sur lame.

Les colorations histologiques ont été réalisées dans un automate de coloration (Microm[®] HMS 740) dans lequel les échantillons sont déparaffinés puis réhydratés par passages successifs dans des bains de toluène puis d'éthanol de concentrations décroissantes. Le Trichrome de Masson permet une coloration en vert des fibres de collagène de l'os, des

noyaux cellulaires en violet/noir et des hématies en orange. Le protocole de coloration est automatisé (Tableau 8).

TRICHROME DE MASSON	
SOLUTION	TEMPS
Hématoxyline de Groat	15 min
Eau distillée	5 min
Fuchsine acide-Ponceau	5 min
Eau acétifiée 1%	10 sec
Orange G molybdique	5 min
Eau acétifiée 1%	10 sec
Vert lumière	5 min
Eau acétifiée 1%	10 sec
Alcool 100°	30 sec
Alcool 100°	30 sec
Toluène	1 min
Toluène	1 min

Tableau 8 . Protocole de coloration du Trichrome de Masson.

Pour la coloration histo-enzymologique TRAP (révélant les ostéoclastes), les lames sont également déparaffinées puis réhydratées avant d'être colorées pendant 1 heure à 37°C. Pour 60 ml, la solution de coloration est composée de 60 mg de naphthol AS-TR phosphate de disodium (Sigma) + 300 µL de N-N diméthylformamide (Sigma) + 60 mL de tampon acétate à pH 5,2 (acide acétique glacial à 0,2 M et acétate de sodium à 0,2 M) + 1,38 g de sodium tartrate (Sigma) + 60 mg de Fastred TR salt (Sigma). Une contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer est ensuite réalisée. Lorsque les colorations sont terminées, le montage entre lame et lamelle est réalisé avec à un milieu de montage non-aqueux pour le Trichrome de Masson (Pertex[®] mounting medium ; Histolab) et avec un milieu de montage aqueux (Faramount Aqueous Mounting Medium ; Dako). Les surfaces marquées sont quantifiées à l'aide du logiciel Image J (NIH, USA).

Immunohistologie. Pour toutes les colorations immunohistochimiques, le principe général est le même. Les coupes sont incubées avec un anticorps primaire spécifique de la protéine étudiée (CD31, CD146, KI67 ou Ostérix ; Tableau 9) qui sera détecté par un anticorps secondaire de chèvre biotinylé ciblant l'espèce de l'anticorps primaire. Puis, le signal est amplifié grâce à la liaison d'une streptavidine couplée à la HRP. La révélation est réalisée au DAB (diaminobenzidine ; Dako), substrat de la HRP [les peroxydases endogènes ont été préalablement neutralisées par l'H₂O₂ (eau oxygénée) pendant 10 min], induisant une coloration marron localisée. Une contre-coloration à l'hématoxyline de Gill est réalisée. Pour finir, le montage entre lame et lamelle est réalisée grâce à un milieu de montage non-aqueux (Pertex). Entre chacune de ces étapes, 3 lavages de 5 min sont réalisés par une solution de PBS-Tween 0,1 %.

Protéine Cible	Espèce	Dilution	Référence
KI67	Lapin	1:50	ab16667
CD31	Lapin	1:100	ab75769
CD146	Lapin	1:200	ab175769
Ostérix	Lapin	1:800	ab22552

Tableau 9 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés en immunohistologie.

III. Effet des molécules sur les cellules du tissu osseux

A. Cellules et conditions de culture

Cellules CD14⁺. Les cellules CD14⁺ humaines ont été obtenues après centrifugation sur gradient de Ficoll (Sigma, France) des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) obtenu auprès de donneurs sains prélevés à l'EFS des Pays de la Loire (Etablissement Français du Sang, Nantes, convention avec l'INSERM UMR957). Les cellules monocytaires positives

pour le marqueur CD14 ont ensuite été isolées grâce à un tri sur billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD14 (MiltenyiBiotec, France) (Duplomb et al., 2008). Les cellules sont congelées après vérification du taux de pureté par cytométrie en flux (autour de 96 %). Les cellules sont mises en culture dans le milieu α -MEM (α -Minimum Eagle's Medium) contenant 10 % de SVF et 25 ng/ml de M-CSF humain (Macrophage-Colony Stimulating Factor ; R&D Systems, UK).

Cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM). Les CSM humaines, obtenues par aspiration de la moelle osseuse (crête iliaque) de patients, proviennent de l'EFS avec le consentement éclairé des patients du service d'orthopédie et l'approbation du comité d'éthique du CHU de Nantes. Les CSM sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10 % de SVF, 1 mg/ml de bFGF (basic Fibroblast Growth Factor, R&D Systems, UK), 100 U/ml de pénicilline, 100 U/ml de streptomycine et 2 mM de L-glutamine. Les cellules adhérentes sont congelées au passage n°2 après leur caractérisation par cytométrie en flux (négative pour les marqueurs hématopoïétiques : CD45 et CD34 ; positive pour les marqueurs mésenchymateux : CD105, CD73 et CD90 ; pureté $\geq 99\%$) avant toute expérimentation (Guihard et al., 2012).

B. Expérimentation *in vitro*

Viabilité cellulaire. Les CSM humaines (2500 par puits) et monocytes humains (40 000 par puits) sontensemencés en plaques 96 puits, en milieu de prolifération/survie, puis sont cultivés en présence ou non du BYL719 pendant 72 heures. La viabilité cellulaire est alors quantifiée par un test XTT. Pour la viabilité des ostéoclastes matures, le BYL719 est ajouté après 14 jours de culture en milieu induisant l'ostéoclastogenèse (décrit ci-après) et pendant 3 jours. Un test XTT est ensuite réalisé.

Différenciation ostéoblastique. A J=0 (J pour jour), 20×10^3 CSM sontensemencées en plaque 24 puits dans un milieu de prolifération (DMEM + 10 % SVF + 1 mg/ml de bFGF), ce qui permet d'atteindre la confluence. Puis, à J=3, le milieu de culture est changé et remplacé par un milieu de différenciation DMEM + 10 % de SVF (sans bFGF), contenant de la vitamine D3 (10^{-8} ; Sigma) et de la dexaméthasone (10^{-7} ; Sigma), en présence ou non du BYL719. A J=6, le milieu de culture est de nouveau changé par un milieu de différenciation DMEM + 10 % de SVF, contenant de la vitamine D3 et de la dexaméthasone, en présence ou non du BYL719, auquel sont ajoutés du β -glycérophosphate (10 mM ; Sigma) et de l'acide ascorbique (50 ng/ml ; Sigma) fraîchement préparés, qui vont permettre la minéralisation. Ce milieu est changé à l'identique tous les 3 jours pendant 21 jours. Une coloration au rouge alizarine pendant 10 minutes (40 mM ; Sigma) va permettre de détecter les nodules de minéralisation formés *in vitro*, après fixation des cellules à l'éthanol 70 % froid pendant 1 heure et 3 lavages à l'eau distillée. Afin de quantifier la minéralisation, les puits ont ensuite été photographiés sous loupe binoculaire (Stemi-2000 ; Zeiss) puis une analyse d'image a été réalisée grâce au logiciel Qwin TM (Leica ; Allemagne) afin de quantifier la surface minéralisée.

Ostéoclastogenèse. Les cellules CD14⁺ fraîchement triées ou décongelées sontensemencées en plaque 96 puits (40×10^3 cellules par puits) dans leur milieu de survie α -MEM contenant 10 % de SVF et 25 ng/ml de M-CSF humain (J=0). Après 3 jours de culture, le milieu est changé par un milieu identique auquel 100 ng/ml de RANKL humain (Receptor Activator NF κ B Ligand ; R&D system) ont été ajoutés, en présence ou non du BYL719. Ce milieu est changé tous les 3 jours. Après 14 jours de culture, les ostéoclastes sont détectés par un marquage TRAP (Tartrate Resistant Acid Phosphatase ; Sigma), après fixation des cellules. Les ostéoclastes sont comptés manuellement sous microscope.

Test de résorption. Les cellules CD14⁺ sont ensemencées sur des pastilles de dentine en présence de M-CSF humain. Après 3 jours de culture, le milieu est changé par du milieu contenant du M-CSF et du RANKL humains, en présence ou non de BYL719, et changé à l'identique tous les 3 jours. Au 14^{ème} jour de culture, les pastilles de dentine sont récupérées, lavées et observées au microscope électronique à balayage (TM3000, Hitachi).

RT-qPCR. Les ARN totaux ont été isolés comme précédemment décrit (NucleoSpin RNA II). Après dosage au Nano Drop, l'ADNc est synthétisé à partir de 5 µg d'ARN totaux à l'aide du kit Thermoscript RT (Invitrogen, France) et de primers oligo(dT), selon les recommandations du fournisseur. La PCR quantitative (qPCR) est réalisée dans le thermocycleur Chromo4 (Biorad, France). Deux µl d'ADNc (contenant 20ng d'ADNc) sont déposés par puits. Le mix contenant 300 nM d'amorces sens et anti-sens (Tableau 10) ainsi que le SYBR Green (Biorad) est ajouté dans chaque puits pour un volume final de 10 µl. Les gènes étudiés sont *NFATc1*, *CATHK* (cathepsine K), *MMP-9* (Matrix MetalloProteinase-9), *RUNX2* et *ALP* (Alkaline Phosphatase). Les gènes de référence utilisés comme gène non variant sont l'actine β (*ACTB*) et la GAPDH. Les résultats sont analysés selon la méthode du ddC(t).

Nom du gène	Sequene des amorces	
<i>NFATc1</i>	S	5'-GGTCTTCGGGAGAGGAGAAA
	AS	5'-TGACGTTGGAGGATGCATAG
<i>CATHK</i>	S	5'-GCCAGACAACAGATTTCCATC
	AS	5'-CAGAGCAAAGCTCACCACAG
<i>MMP-9</i>	S	5'-GAACCAATCTCACCGACAGG
	AS	5'-GCCCCAGAGATTTGACTC
<i>TRAP</i>	S	5'-AAGACTCACTGGGTGGCTTTG
	AS	5'-GGCAGTCATGGGAGTTCAGG
<i>RUNX2</i>	S	5'-GCCTAGGCGCATTTTCTCAGA
	AS	5'-GCTCTTCTTACTGAGAGTGGAAGG
<i>ALP</i>	S	5'-AACACCACCCAGGGGAAC
	AS	5'-GGTCACAATGCCACAGATT
<i>GAPDH</i>	S	5'-TGGGTGTGAACCATGAGAAGTATG
	AS	5'-GGTGCAGGAGGCATTGCT
<i>ACTB</i>	S	5'-CCAACCGCGAGAAGATGA
	AS	5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG

Tableau 10 : Amorces sens (S) et anti-sens (AS) utilisées pour la PCR quantitative. Les couples d'amorces ont été dessinés via le logiciel Primer 3.

IV. Analyses Statistiques

Chaque expérimentation a été répétée trois fois de façon indépendante. Les résultats *in vitro* sont présentés en moyenne \pm SD (écart-type) et les résultats *in vivo* en moyenne \pm SEM (Standard Error of the Mean). Les résultats statistiques ont été obtenus par le test t non-apparié ou le test ANOVA suivi du test de Bonferroni en utilisant le logiciel GraphPad-InStat v3.02. Les résultats où $p < 0,05$ sont considérés significatifs.

PARTIE I

L'IMATINIB MESYLATE DANS

L'OSTEOSARCOME

I. Introduction

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont des récepteurs membranaires ayant une activité tyrosine kinase intrinsèque permettant *in fine* l'activation de substrats et de nombreuses voies de signalisation, dont les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/ERK. Les phosphorylations de résidus tyrosines, issues du transfert du phosphate gamma ($P\gamma$) de l'ATP au niveau du site catalytique, jouent un rôle majeur dans la transmission du signal intracellulaire. Les récepteurs tyrosine kinase ont un rôle très important dans de nombreux processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation, la survie et la migration cellulaire. Malheureusement, toute suractivation de ces récepteurs engendre des pathologies, dont la survenue et la progression des cancers. Il existe au moins 4 mécanismes responsables de cette suractivation : une activation autocrine (co-expression du ligand et du récepteur), une surexpression du ou des récepteur(s), des mutations gain de fonction et des translocations chromosomiques (Lemmon et Schlessinger, 2010). Un grand nombre de récepteurs tyrosine kinase sont actuellement répertoriés comme oncogènes, c'est-à-dire impliqués dans la transformation cellulaire à l'origine du processus de tumorigenèse puis de la dissémination métastatique, comme par exemple la surexpression du récepteur ErbB2 (= HER2 ; v-ERB-B2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2) dans le cancer du sein, du poumon et dans l'ostéosarcome (Gusterson et al., 1992 ; Hirsch et al., 2009 ; Gorlick et al., 1999). En 2012, Hassan et ses collaborateurs ont publié un profil d'expression de 14 récepteurs tyrosine kinase dans 10 biopsies humaines et 4 lignées humaines établies d'ostéosarcome (Hassan et al., 2012), dont les taux d'expression ont été répartis en faible, moyen et fort respectivement pour inférieur à 25 %, entre 25 et 100 %, et supérieur à 100 % comparativement à un taux d'expression contrôle. Ainsi, l'IGF-2R (Insulin-like Growth Factor-2 Receptor) est fortement exprimé dans les 14 lignées cellulaires. De plus, le PDGFR β

(Platelet Derived Growth Factor Receptor β) ainsi que l'IR (Insulin Receptor) sont fortement exprimés dans 55 % des lignées et moyennement exprimés dans 30 et 25 % des lignées respectivement. Enfin, 20 % et 15 % des lignées, respectivement pour c-MET (ou HGFR ; Hepatocyte Growth Factor Receptor) et VEGFR3, les expriment fortement. La surexpression de VEGFR3 a été confirmée dans une seconde étude où elle corrèle avec un mauvais pronostic (Lugowska et al., 2011). Enfin, une étude de 2012 a révélé les récepteurs Axl, IGF-1R, FGFR2 (Fibroblast Growth Factor Receptor 2), Ret et EphB2 (Récepteur aux Ephrines) comme étant impliqués dans le phénotype *in vitro* de cellules d'ostéosarcomes métastatiques (Rettew et al., 2012). L'expression de c-KIT a également été montrée dans l'ostéosarcome, où sur 18 biopsies, 15 sont positives pour c-KIT (83 %) dont 39 % ayant un marquage fort et diffus (Smithey et al., 2002). Wei et ses collaborateurs ont également montré cette surexpression de c-KIT dans 62,5 % des biopsies, sans détecter de mutations du gène (Wei et al., 2008). Ainsi, pour une même pathologie, plusieurs récepteurs tyrosine kinase peuvent être impliqués. De même, un récepteur peut être impliqué dans de multiples pathologies (leucémies, cancers du sein, poumon, prostate etc...). Suite au nombre important de pathologies induites par des dysfonctionnements des récepteurs tyrosine kinase et des protéines à activité tyrosine kinase, les inhibiteurs les ciblant se sont considérablement diversifiés ces deux dernières décades.

Plus connu sous le nom de Glivec[®] (ou STI571), l'Imatinib Mésylate (Novartis Pharma) est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de première génération ou plus précisément un compétiteur de la fixation de l'ATP. En effet, cette molécule se fixe à la poche initialement prévue pour l'ATP au niveau du site catalytique du récepteur tyrosine kinase, empêchant ainsi toute phosphorylation de la protéine et par conséquent sa signalisation en aval (Figure 21).

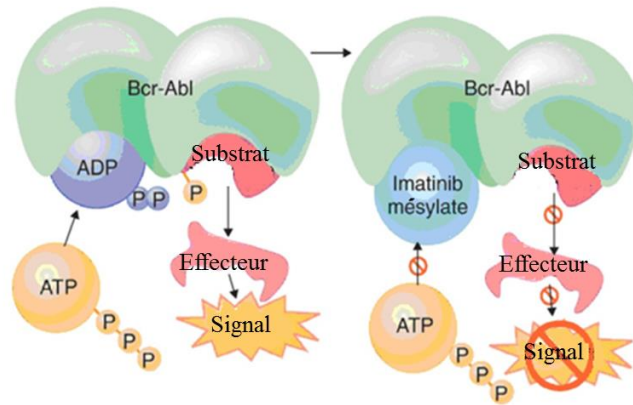


Figure 21 . Mode d'action de l'imatinib mésylate. L'imatinib mésylate est un compétiteur de l'ATP. Dans la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), il va cibler la protéine de fusion aberrante BCR-Abl, en se fixant au site initialement prévu pour l'ATP. L'ATP ne peut plus se fixer : la signalisation en aval est inhibée.

L'imatinib mésylate est un agent anti-cancéreux, originalement développé pour le traitement de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) où il va cibler la protéine de fusion aberrante BCR-Abl, issue d'une anomalie génétique appelé chromosome de Philadelphie (Ph1) (Deininger et al., 2005). Cette anomalie repose sur la translocation t(9 ;22) d'ABL (chromosome 9 ; Abelson proto-oncogène) avec BCR (chromosome 22 ; Breakpoint Cluster Region), donnant naissance à la protéine de fusion BCR-ABL constitutivement active, responsable de la prolifération anarchique et hors de contrôle de globules blancs immatures. Plus récemment, l'imatinib mésylate a montré son efficacité dans le traitement des GIST (Gastro Intestinal Stromal Tumor) où il cible la protéine kinase c-KIT, mutée dans 90 % des cas (Demetri et al., 2002). De plus, Hoepfer et son équipe ont montré un avantage à utiliser l'imatinib mésylate en tant qu'adjuvant dans un protocole thérapeutique contre l'hypertension artérielle pulmonaire, où il cible alors le PDGFR impliqué dans le remodelage vasculaire (Hoepfer et al., 2013 ; Ten Freyhaus et al., 2012).

Ces dernières années, des études portant sur l'impact de l'imatinib mésylate sur la physiologie osseuse ont été rapportées. L'imatinib mésylate inhibe la prolifération et la survie des précurseurs ostéoblastiques en inhibant le récepteur au PDGF mais augmente la différenciation et la minéralisation par l'inhibition de ce même récepteur (O'Sullivan et al., 2007 ; Tibullo et al., 2009). En 2005, Dewar et son équipe ont montré que l'imatinib mésylate pouvait également cibler un autre récepteur tyrosine kinase, le récepteur au M-CSF, affectant la lignée monocyte/macrophage (Dewar et al., 2005). De plus, l'imatinib mésylate inhibe la différenciation ostéoclastique (Dewar et al., 2006) ainsi que l'activité de résorption des ostéoclastes matures en induisant leur apoptose (El Hajj Dib et al., 2006). Dans le cancer du sein, l'imatinib mésylate a permis de réduire les métastases osseuses en ciblant le récepteur au M-CSF, inhibant ainsi l'activité ostéoclastique (Hiraga et Nakamura, 2009).

Etant donné l'impact qu'ont les récepteurs tyrosine kinase dans l'ostéosarcome, ainsi que l'effet de l'imatinib mésylate dans le sarcome (GIST) et sur la physiologie osseuse, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets de l'imatinib mésylate *in vitro* sur des lignées humaines (MG-63 ; HOS), de souris (MOS-J et POS-1) et de rat (OSRGA) d'ostéosarcome ainsi que *in vivo* dans deux modèles murins syngéniques d'ostéosarcome.

II. Résultats

L'imatinib mésylate inhibe la voie PI3K/AKT/mTOR

Comme décrit précédemment, une voie majeure découlant de l'activation des RTK est la voie PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase). Afin de s'assurer de l'inhibition de cette voie de signalisation par l'imatinib mésylate, un western blot a été réalisé. Après 12 et 24h de traitement par 25 μ M (HOS) ou 20 μ M d'imatinib mésylate (MOS-J), les phosphorylations de mTOR (Ser2448) et d'AKT (Thr308 et Ser473) diminuent (Figure 22). Cette expérimentation a été faite en parallèle d'un inhibiteur spécifique de mTOR, le RAD001 (Everolimus[®]). A l'inverse du RAD001 (25 nM) qui réactive la phosphorylation d'AKT par une boucle de rétrocontrôle, l'imatinib mésylate abolit complètement les phosphorylations d'AKT.

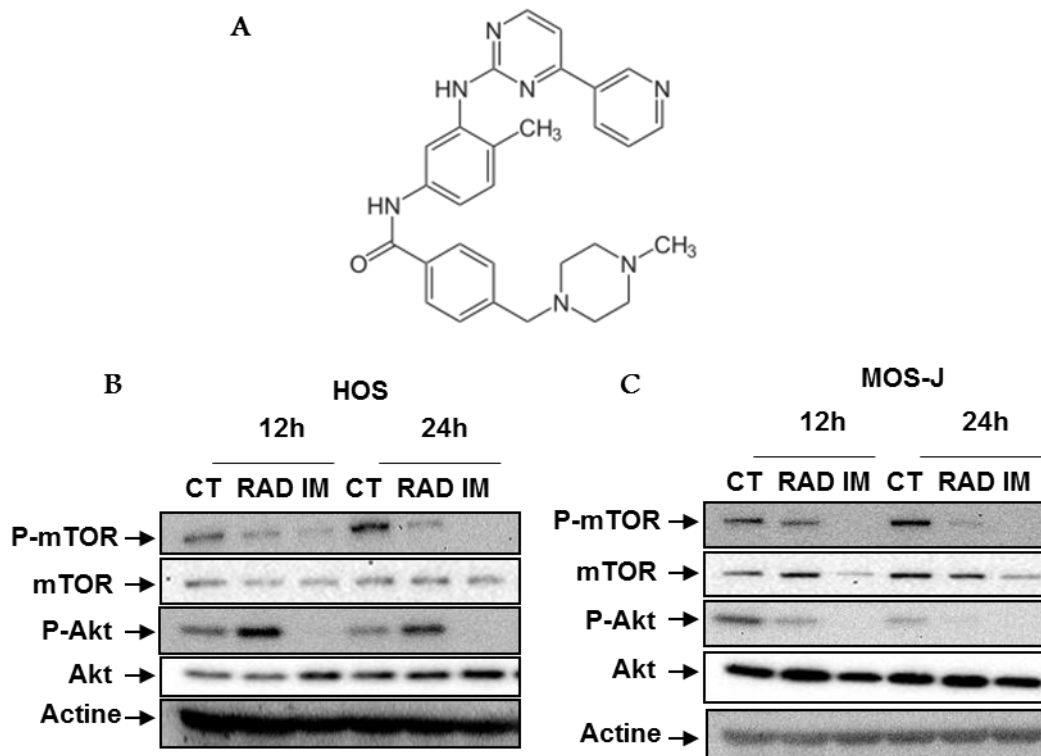


Figure 22. L'imatinib mésylate inhibe la voie de signalisation PI3K/AKT dans 2 lignées d'ostéosarcome. (A) Formule chimique de l'imatinib mésylate. Les cellules humaines HOS (B) et de souris MOS-J (C) ont été exposées à 25 ou 20 μ M d'imatinib mésylate (IM) pendant 12 et 24 heures. Le RAD001 (RAD) est utilisé en tant que contrôle positif de l'inhibition de la voie mTOR (25 nM).

L'imatinib mésylate a un effet anti-prolifératif sur les lignées d'ostéosarcome *in vitro*

Afin de déterminer les effets de l'imatinib mésylate sur la prolifération cellulaire, deux lignées humaines (MG-63 et HOS), deux lignées de souris (MOS-J et POS-1) et une lignée de rat (OSRGA) d'ostéosarcome ont été cultivées en présence de doses croissantes d'imatinib mésylate pendant 72h. L'effet de l'imatinib mésylate sur la viabilité cellulaire a été déterminé par un test colorimétrique au XTT. Les résultats montrent que l'imatinib mésylate diminue fortement la viabilité cellulaire des 5 lignées testées de manière dépendante de la dose, avec une sensibilité propre à chaque lignée (Figure 23).

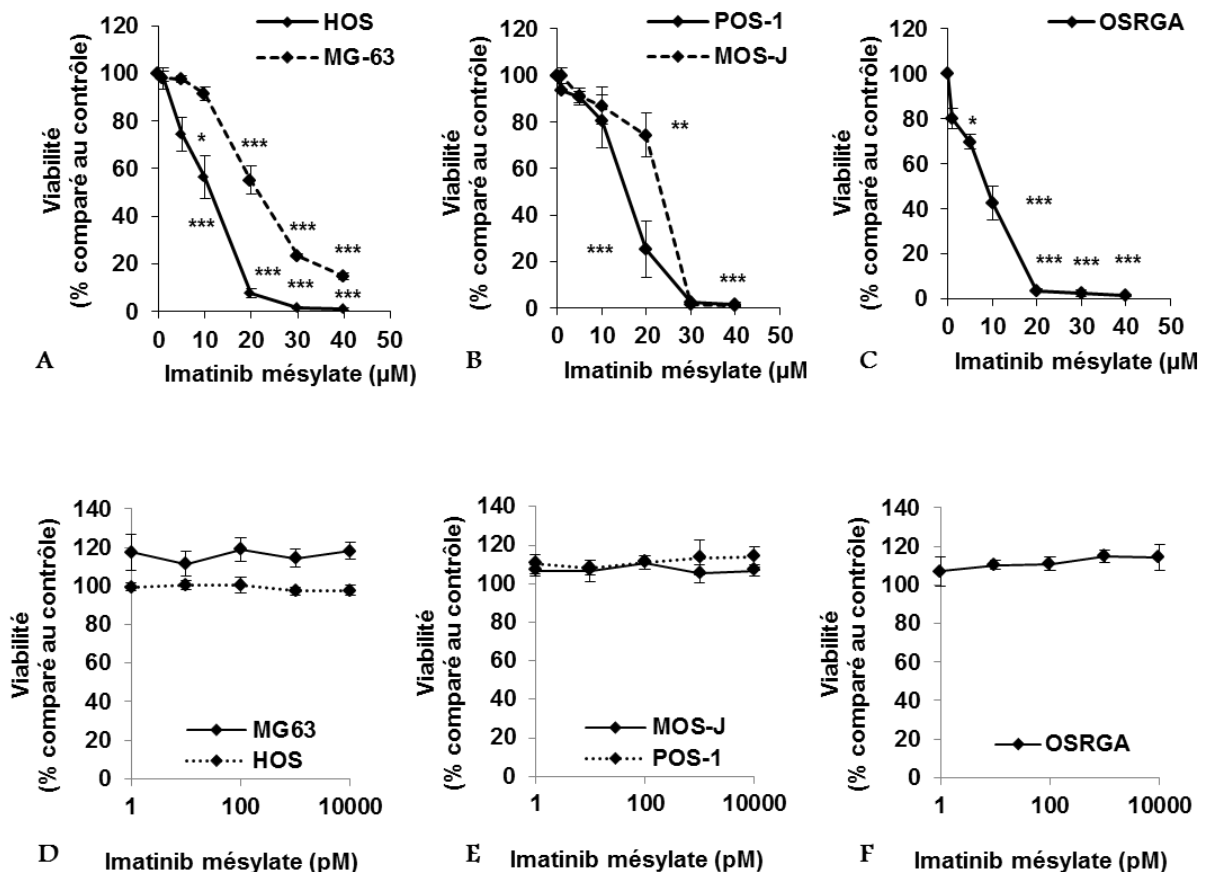


Figure 23. L'imatinib mésylate diminue la viabilité cellulaire des cellules d'ostéosarcome. Les cellules humaines (A), de souris (B) ou de rat (C) sont traitées pendant 72 heures avec des concentrations croissantes d'imatinib mésylate. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparé au contrôle. (D) De faibles doses d'imatinib mésylate n'affecte pas la viabilité cellulaire (72h).

Les IC₅₀ (IC₅₀ = concentration permettant la diminution de 50 % de l'effet maximal) calculés pour chaque lignée sont de 20 µM, 11 µM, 23 µM, 15µM et 9 µM respectivement pour MG-63, HOS, MOS-J, POS-1 et OSRGA. Les IC₉₀ (IC₉₀ = concentration inhibant 90 % de l'effet maximal) sont de 30 µM, 19 µM, 28 µM, 24µM 16 µM respectivement pour MG-63, HOS, MOS-J, POS-1 et OSRGA. L'imatinib mésylate induit une inhibition maximale dans 4 lignées sur 5 (HOS, MOS-J et POS-1 = 30µM ; OSRGA= 20µM). Des concentrations d'imatinib mésylate inférieures au µM (1 pM à 10nM) n'ont pas d'effet sur la viabilité cellulaire (Figure 23D).

Dans un second temps, un suivi par vidéo-microscopie Time Lapse a été réalisé sur une durée de 72h ; le nombre de divisions cellulaires a été déterminé par comptage manuel. L'analyse met en avant une diminution du nombre de divisions cellulaires dépendante de la dose et du temps de traitement comparativement au contrôle (Figure 24).

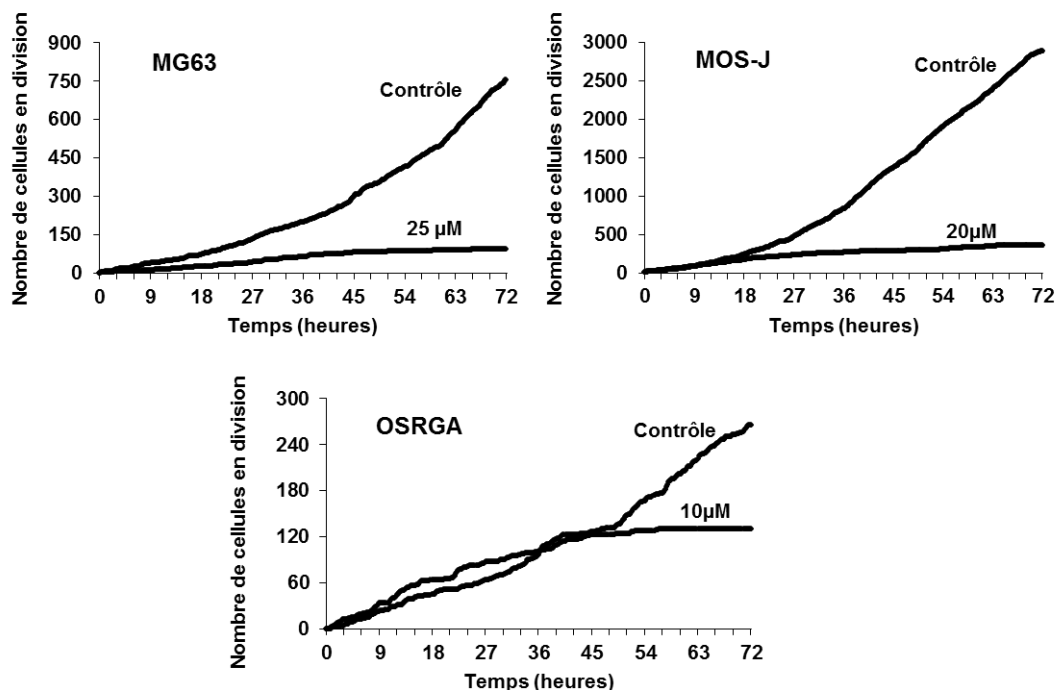


Figure 24 : L'imatinib mésylate diminue la prolifération des cellules d'ostéosarcome. Les cellules humaines MG63 (A), de souris MOS-J (B) et de rat OSRGA (C) sont cultivées en présence ou en absence d'imatinib mésylate pendant 72 heures avec 25, 20 ou 10 µM respectivement. Des acquisitions en contraste de phase sont effectuées toutes les 10 minutes. Les cellules en mitose sont comptées manuellement.

Afin de compléter ces observations, le cycle cellulaire de chaque lignée a été étudié en présence d'imatinib mésylate pendant 24h. L'imatinib mésylate induit une accumulation des cellules en phase G0/G1 pour les lignées MG-63, MOS-J et OSRGA alors que les lignées HOS et POS-1 sont arrêtées dans la phase S-G2/M (Figure 25).

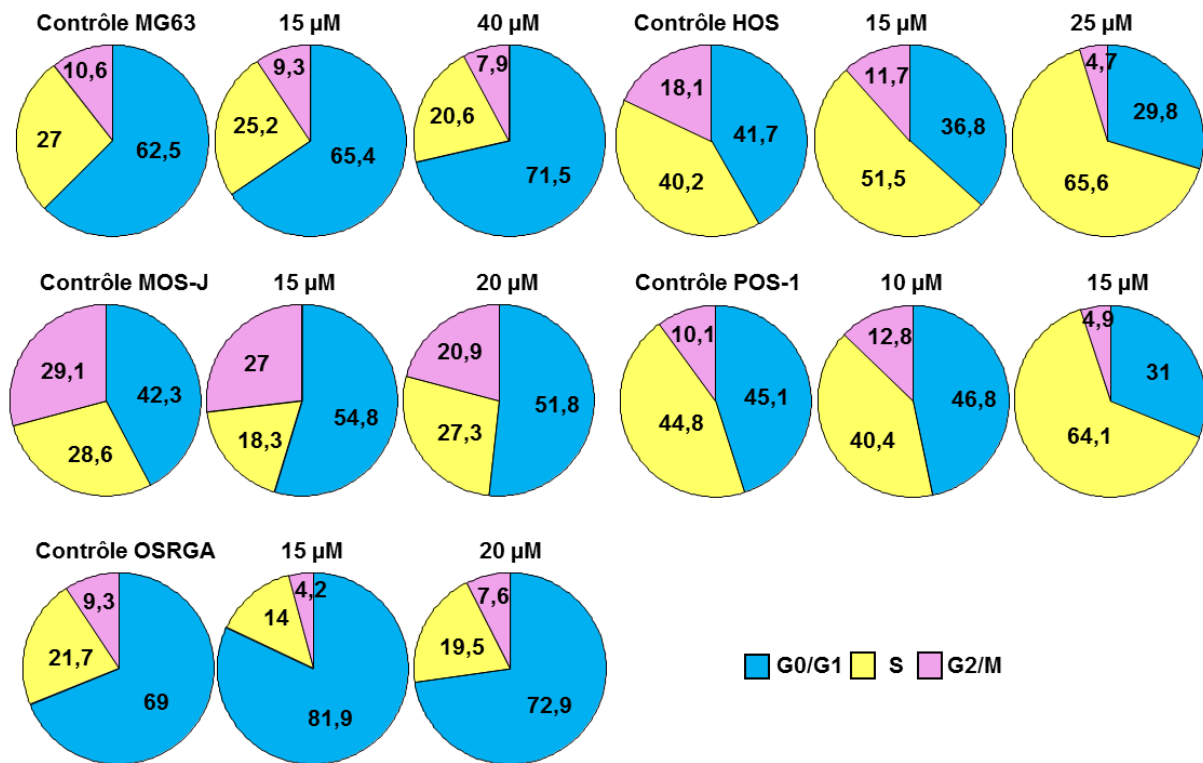


Figure 25 : L'imatinib mésylate induit l'accumulation des cellules d'ostéosarcome en phase G0/G1 ou S/G2M. Les cellules humaines (MG63), de souris (MOS-J et POS-1) et de rat (OSRGA) sont traitées pendant 24 h avec l'imatinib mésylate (IM) puis l'ADN est marqué au iodure de propidium avant lecture en cytométrie en flux.

En effet, les pourcentages des cellules augmentent de 62 à 72 % pour MG-63, de 42 à 55 % pour MOS-J et de 69 à 82 % pour OSRGA avec des doses respectives de 40, 15 et 15 µM. Pour les lignées HOS et POS-1, le pourcentage de cellules en phase S augmente de 40 à 66 % et de 45 à 64 % avec 25 et 15 µM d'imatinib mésylate respectivement, avec en parallèle une induction d'évènements en phase SubG0, c'est-à-dire une augmentation de débris cellulaires, dépendante et de la dose et du temps de traitement (Figure 26).

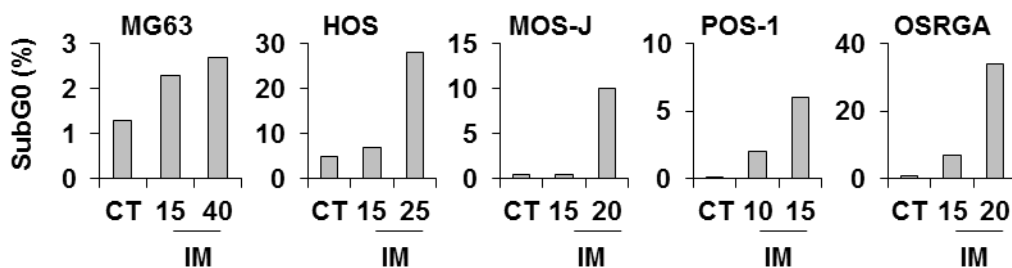


Figure 26 . L'imatinib mésylate induit l'accumulation des cellules d'ostéosarcome en phase SubG0. Répartition des cellules dans la phase SubG0.

L'imatinib mésylate induit la mort cellulaire des cellules d'ostéosarcomes

Afin de déterminer si l'effet anti-prolifératif de l'imatinib mésylate sur les cellules d'ostéosarcome est associé à une induction de mort cellulaire, un suivi par vidéo-microscopie Time Lapse a été réalisé pendant 72h. Le comptage manuel des cellules mortes a permis de mettre en évidence une augmentation dépendante et de la dose et du temps du nombre de cellules mortes pour chaque lignée (Figure 27A). En parallèle, le comptage manuel basé sur l'exclusion du bleu trypan a permis de confirmer cette induction de mort cellulaire (Figure 27B). Un test caspase a révélé une augmentation de l'activité caspase qui a été confirmé par l'utilisation d'un inhibiteur chimique des caspases (Z-VAD). Ainsi, alors que le Z-VAD seul n'induit aucun effet sur la viabilité cellulaire, les résultats montrent que l'association Imatinib mésylate + Z-VAD restaure en partie la viabilité comparativement à l'imatinib mésylate seul (Figure 27C et 27D). Ainsi, de par l'ensemble de ces résultats, la mort cellulaire induite par l'imatinib mésylate serait liée à un mécanisme dépendant, en partie, de l'activité caspase.

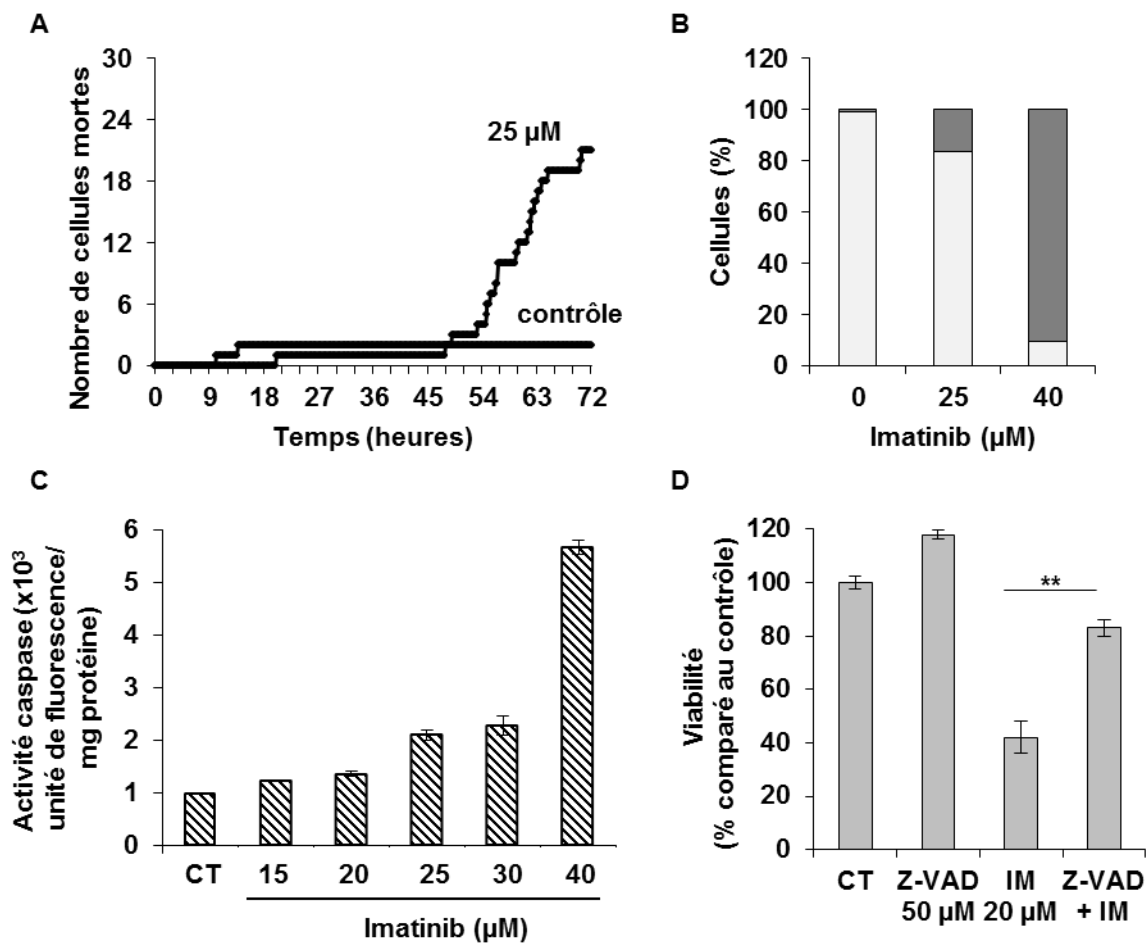


Figure 27 : L'imatinib mésylate induit la mort cellulaire des cellules d'ostéosarcome : exemple des cellules MG63 (humaines). (A) Les cellules sont cultivées en présence de 25 μM d'imatinib mésylate pendant 72 heures. Des acquisitions en contraste de phase sont réalisées toutes les 10 minutes. Les cellules mortes sont comptées manuellement. (B) Comptage au bleu trypan après 72 heures de traitement. (C) L'activité caspase est déterminée par fluorimétrie après 72 heures de traitement par des doses croissantes d'imatinib mésylate (D) Les cellules sont cultivées en présence ou en absence d'imatinib mésylate (IM), de Z-VAD (50 μM) ou de l'association de l'imatinib mésylate avec le Z-VAD pendant 72 heures. La viabilité est déterminée par un test XTT. ** p<0,01.

L'imatinib mésylate diminue la migration des cellules d'ostéosarcomes

Afin de compléter cette étude, des tests de migration cellulaire ont été réalisés en présence de mitomycine C. Cet antibiotique va permettre de bloquer la prolifération cellulaire, permettant ainsi d'étudier uniquement la migration des cellules. L'imatinib

mésylate ralentit la migration des cellules d'ostéosarcomes humains, de souris et de rat. Ainsi, ces résultats indiquent que l'imatinib mésylate exerce une activité cytostatique sur l'ostéosarcome (Figure 28).

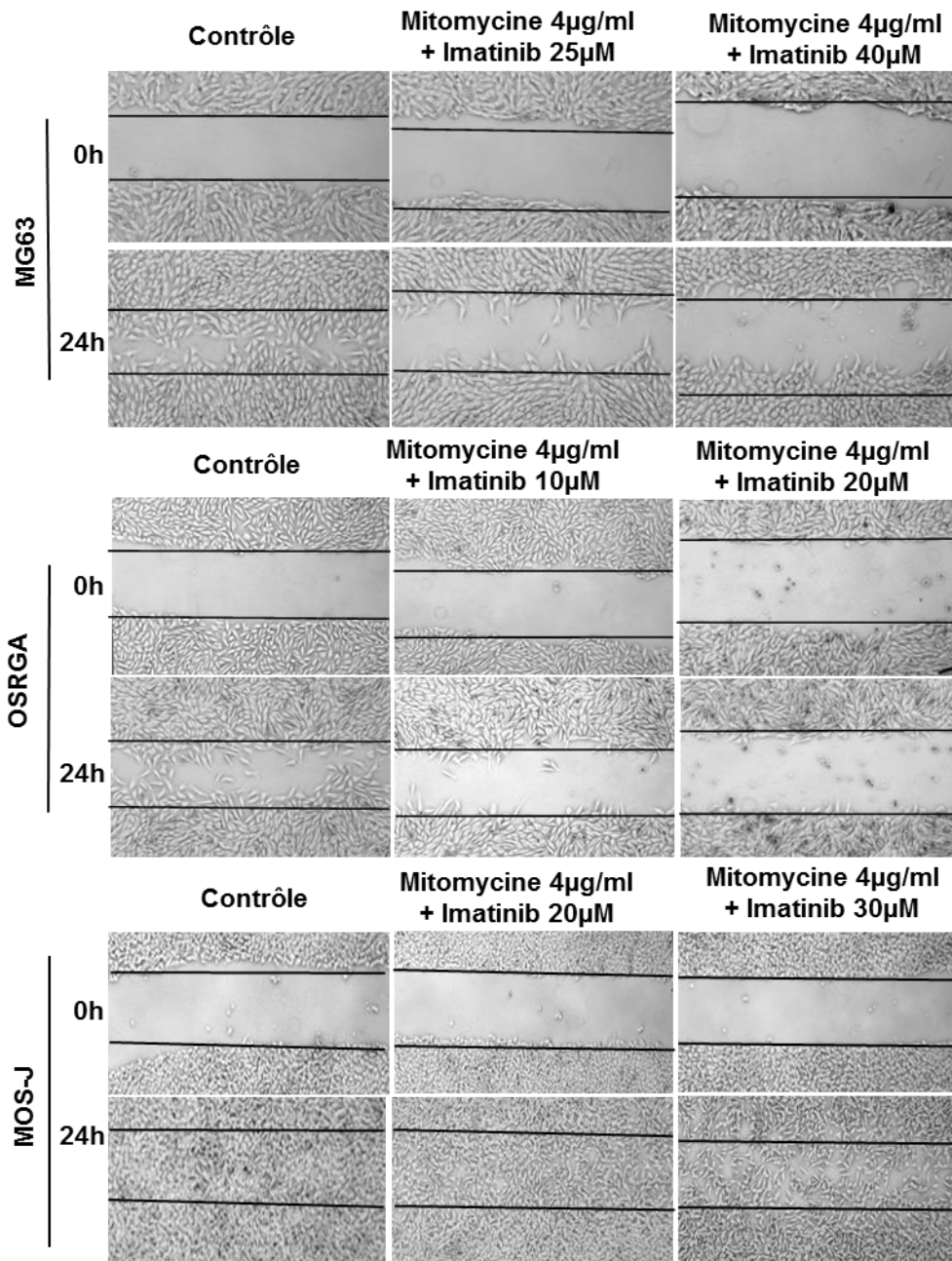


Figure 28 . L'imatinib mésylate inhibe la migration cellulaire. Lorsque les cellules sont à confluence, le tapis cellulaire des lignées MG63 (humaine), OSRGA (rat) et MOS-J (souris) a été endommagé avec un cône stérile. Les cellules sont prétraitées pendant 1 heure avec de la mitomycine C puis mis en présence ou non d'imatinib mésylate pendant 24 heures. Les photos sont réalisées à 0 et 24 heures afin de suivre la mobilité cellulaire.

Le PDGFR α , une des cibles clés de l'imatinib mésylate

Dans le but d'identifier des cibles potentielles de l'imatinib mésylate dans l'ostéosarcome, une approche protéomique par membrane pré-hybridée de 49 RTK phosphorylés a été réalisée (Tableau 11). L'échantillon testé est un lysat de cellules HOS +/- 50 μ M d'imatinib mésylate pendant 45 minutes. Les résultats ont été obtenus selon les recommandations du fournisseur. Dans le cas de la cellule HOS, les résultats montrent que l'imatinib mésylate permet de diminuer la phosphorylation de 7 protéines (PDGFR α , Axl, PDGFR β , Ryk, EphA2, EphA10 et IGF-1R) avec une plus forte inhibition du PDGFR α (Figure 29). En parallèle, un PCR semi-quantitative a été réalisée dans les 5 lignées afin de déterminer l'expression des récepteurs PDGFR α et PDGFR β . Leur expression a été confirmée dans les 5 lignées étudiées (Figure 30).

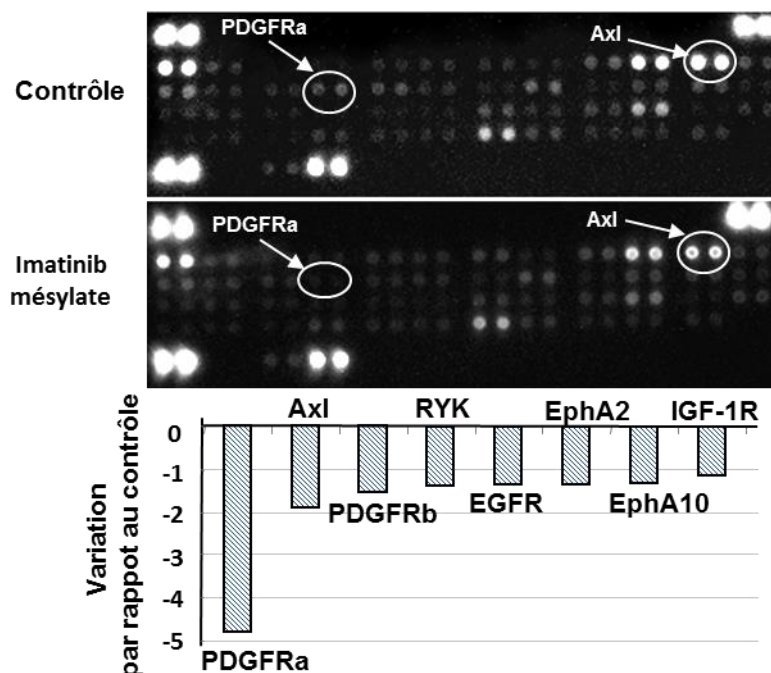


Figure 29 . Le PDGFR α , cible de l'imatinib mésylate dans la lignée HOS. (A) Les cellules HOS sont cultivées pendant 45 minutes en présence ou en absence d'imatinib mésylate (50 μ M). L'imatinib mésylate diminue la phosphorylation du PDGFR α d'un facteur 5 comparé au contrôle. Les récepteurs Axl, PDGFR β , Ryk, EGFR, Eph A2, EphA10 et IGF-1R (diminution d'un facteur 1 à 2 par rapport au contrôle).

CT pos											CT pos
EGFR	ErbB2	ErbB3	ErbB4	FGFR1	FGFR2 α	FGFR3	FGFR4	InsulinR	IGF1R	Axl	Dtk
Mer	HGFR	MSPR	PDGFR α	PDGFR β	SCFR	Flt3	MSCFR	c-Ret	ROR1	ROR2	Tie1
Tie2	TrkA	TrkB	TrkC	VEGFR1	VEGFR2	VEGFR3	MuSK	EphA1	EphA2	EphA3	EphA4
EphA6	EphA7	EphB1	EphB2	EphB4	EphB6	ALK	DDR1	DDR2	EphA5	EphA10	---
Ct pos	EphB3	RYK									CTneg

Tableau 11 . Représentation schématique de l'organisation de la membrane préhybridée par 49 récepteurs tyrosine kinase. CT pos = contrôle positif ; CT neg = contrôle négatif.

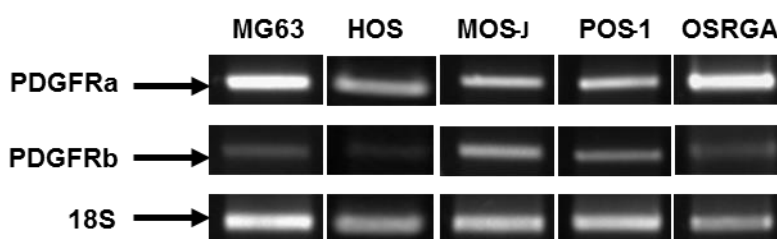


Figure 30 . Les ARN des PDGFR α et PDGFR β sont exprimés dans les cellules d'ostéosarcome. Expression des ARN codants pour les isoformes du récepteur au PDGF dans les 5 lignées d'ostéosarcomes en PCR semi-quantitative.

L'imatinib mésylate ralentit la croissance tumorale

Suite aux résultats obtenus *in vitro* sur 5 lignées de 3 espèces différentes, l'imatinib mésylate a été testé *in vivo* dans deux modèles murins syngéniques d'ostéosarcomes.

Dans un premier temps, la stratégie thérapeutique a été évaluée dans un contexte préventif. Le traitement journalier a commencé le lendemain de l'injection de cellules tumorales. Dans le modèle ostéoblastique MOS-J chez la souris C57Bl/6J, l'imatinib mésylate diminue la croissance tumorale de 55 %, 57 % et 63 % respectivement pour les doses de 25, 50 et 100 mg/kg d'imatinib mésylate ($p < 0,01$) (Figure 31). La progression tumorale entre les jours 18 et 43 diminue de $2436 \pm 405 \text{ mm}^3$ (contrôle) à $1070,5 \pm 193 \text{ mm}^3$, $1036 \pm 97 \text{ mm}^3$ et $902 \pm 115 \text{ mm}^3$ respectivement pour les doses de 25, 50 et 100 mg/kg.

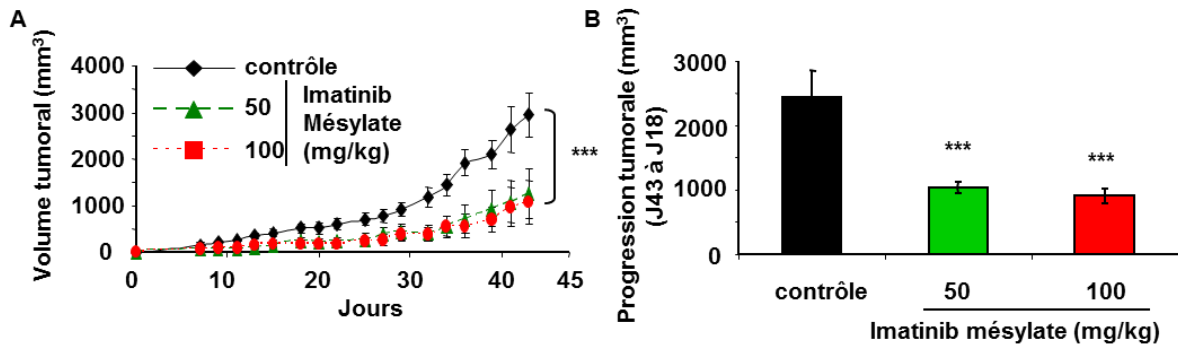


Figure 31 . L'imatinib mésylate ralentit la croissance tumorale dans un modèle murin syngénique d'ostéosarcome MOS-J chez la souris C57BL/6J dans un protocole préventif. Un million de cellules MOS-J ont été injectées en site para-tibial chez la souris C57BL/6J (n=6 par groupe). Les souris sont randomisées selon 4 groupes : contrôle ou imatinib mésylate 25, 50 ou 100 mg/kg. Le traitement débute un jour après l'injection de cellules. Croissance tumorale (A). Progression tumorale entre les jours 18 et 43 (B). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (erreur standard) ; * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001.

Dans le second modèle murin ostéolytique, POS-1 chez la souris C3H/HeN, l'effet de l'imatinib mésylate a également été évalué dans un protocole préventif. L'imatinib mésylate ralentit la croissance tumorale de 27 %, 45 % et 71 % respectivement pour les doses 25, 50 et 100 mg/kg (p<0,05) (Figure 32). La progression tumorale entre les jours 12 et 21 diminue de $1542 \pm 282 \text{ mm}^3$ (contrôle) à $1205 \pm 314 \text{ mm}^3$, $853 \pm 264 \text{ mm}^3$ et $447 \pm 124 \text{ mm}^3$ respectivement pour les doses de 25, 50 et 100 mg/kg.

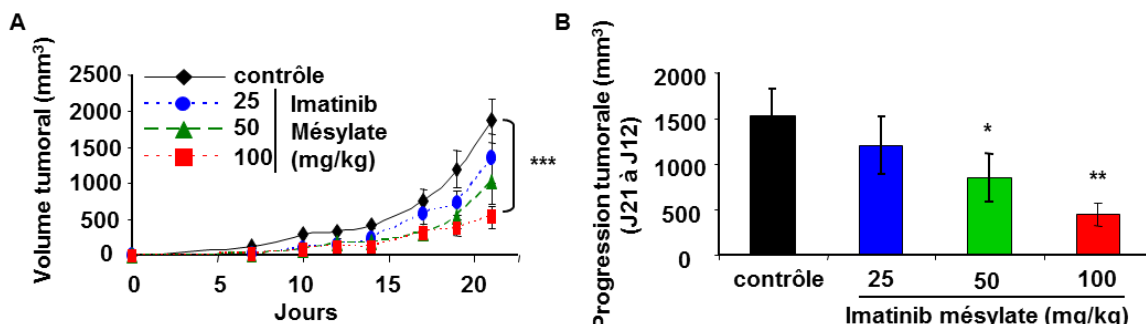


Figure 32 . L'imatinib mésylate ralentit la croissance tumorale dans un modèle murin syngénique d'ostéosarcome POS-1 chez la souris C3H/HeN dans un protocole préventif. Un fragment tumoral POS-1 de $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ a été transplanté chez la souris C3H/HeN (n=6 par groupe). Les souris sont randomisées selon 3 groupes : contrôle ou imatinib mésylate 50 ou 100 mg/kg. Le traitement débute un jour après l'injection de cellules. Croissance tumorale (A). Progression tumorale entre les jours 12 et 24 (B). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (erreur standard) ; *** p<0,001.

Afin de mimer un contexte clinique, l'imatinib mésylate a été testé dans le modèle MOS-J chez la souris C57BL/6J dans un protocole curatif ; le traitement par l'imatinib mésylate a débuté lorsque la tumeur était palpable, soit 7 jours après l'induction de la tumeur. Deux concentrations ont été testées : 50 et 100 mg/kg (Figure 33). Les résultats montrent que seule la dose 100 mg/kg permet de diminuer significativement la croissance tumorale de 35 % ($p < 0,05$). La progression tumorale entre les jours 18 et 43 diminue de $1950 \pm 172 \text{ mm}^3$ (contrôle) à $1246 \pm 111 \text{ mm}^3$ pour le groupe traité par 100 mg/kg d'imatinib mésylate ($p < 0,05$).

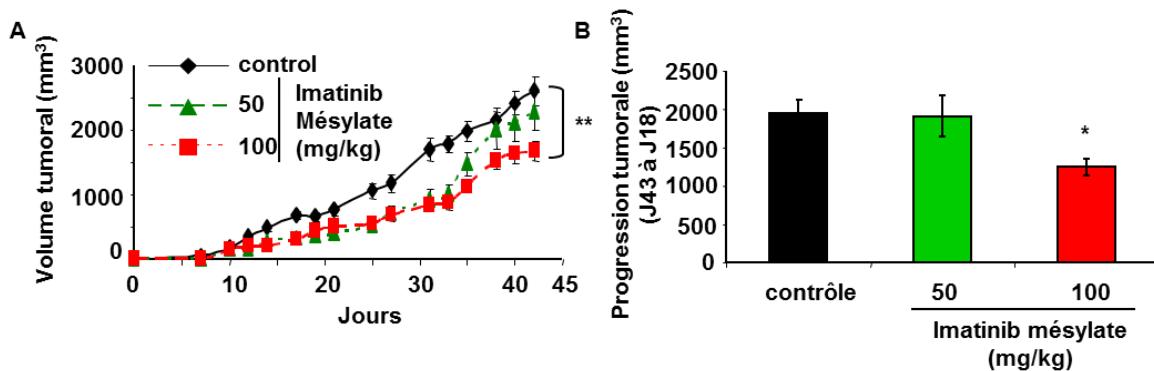


Figure 33 . L'imatinib mésylate ralentit la croissance tumorale dans un modèle murin syngénique d'ostéosarcome MOS-J chez la souris C57BL/6J dans un protocole curatif. Les cellules MOS-J (1 million) ont été injectées en site para-tibial chez la souris C57BL/6J ($n=6$ par groupe). Les souris sont randomisées selon 3 groupes : contrôle ou imatinib mésylate 50 ou 100 mg/kg. Le traitement débute lorsque la tumeur est palpable. Croissance tumorale (A). Progression tumorale entre les jours 18 et 43 (B). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (erreur standard) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Le nilotinib, inhibiteur de deuxième génération des récepteurs tyrosine kinase, diminue la viabilité cellulaire des lignées d'ostéosarcome

L'imatinib mésylate est un inhibiteur des récepteurs tyrosine kinase de première génération. Suite à la survenue de résistance au traitement, notamment dans la LMC, des inhibiteurs de seconde génération ont été développés, dont le nilotinib. Des résultats préliminaires montrent que le nilotinib diminue la viabilité des cellules d'ostéosarcomes

humains et de souris avec des IC50 à 72h de 8, 1, 13 et 3 μM respectivement pour MG-63, HOS, MOS-J et POS-1, soit inférieurs à ceux de l'imatinib mésylate (pour rappel : 20, 11, 23 et 15 μM pour MG-63, HOS, MOS-J et POS-1) (Figure 34). De plus, des résultats très préliminaires sembleraient indiquer un blocage des cellules en phase G0/G1 (données non-montrées).

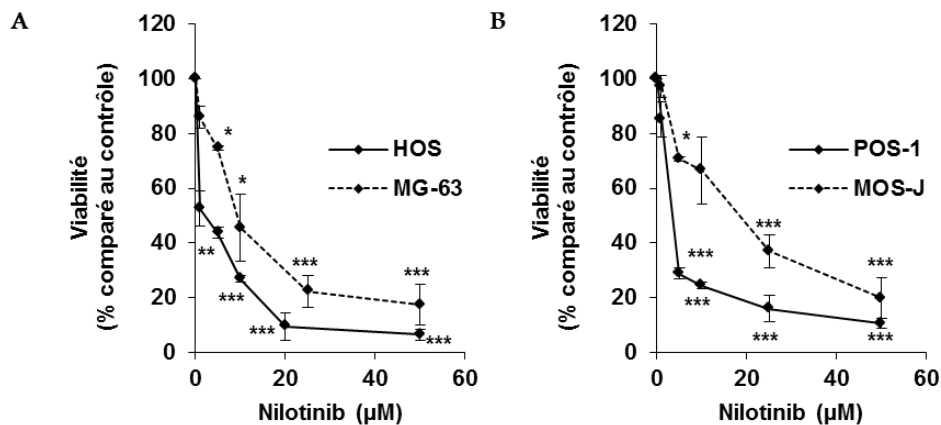


Figure 34 : Résultats préliminaires : le nilotinib inhibe la viabilité cellulaire des cellules d'ostéosarcome. Les cellules humaines (A) ou murines (B) sont traitées pendant 72 heures avec des concentrations croissantes de nilotinib. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparé au contrôle.

III. Discussion et perspectives

Depuis son développement original il y a plus de 10 ans, l'imatinib mésylate est devenu un traitement incontournable de la leucémie myéloïde chronique et des GIST et a également fait ses preuves dans d'autres pathologies. L'imatinib mésylate est un compétiteur de l'ATP qui va cibler un très large ensemble de protéines tyrosine kinase, et notamment les récepteurs tyrosine kinase. Bien qu'initialement développé dans le but de cibler spécifiquement BCR-Abl, protéine de fusion aberrante dans la leucémie myéloïde chronique,

l'imatinib mésylate possède d'autres cibles ; la famille III des récepteurs tyrosine kinase (famille PDGF) est fortement ciblée par cet inhibiteur (PDGFR α , PDGFR β , c-KIT, M-CSFR) (Buchdunger et al., 2000 ; Dewar et al., 2005) ainsi que des membres de la famille des anhydrases carboniques (CA), dont la CA II (Parkkila et al., 2009).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux effets potentiels de l'imatinib mésylate dans l'ostéosarcome *in vitro* dans 5 lignées cellulaires, dont 2 lignées humaines, 2 lignées de souris et une de rat ainsi que *in vivo*, dans deux modèles syngéniques murins. L'imatinib a un effet anti-prolifératif dans l'ensemble des lignées testées avec un effet sur le cycle cellulaire (arrêt en G0/G1), une induction de mort cellulaire dépendante des caspases et un effet inhibiteur sur la migration cellulaire. L'imatinib mésylate a également un effet inhibiteur dans deux modèles murins d'ostéosarcome, dans un protocole préventif et curatif, à des doses en adéquation avec les données cliniques humaines. Dans un dernier temps, 8 récepteurs tyrosine kinase sont ressortis dans une approche de membrane pré-hybridée par 49 récepteurs tyrosine kinase, détectant les phosphorylations de ces récepteurs. Ainsi, PDGFR α , Axl, PDGFR β , RYK, EGFR, EphA2, EphA10 et IGF-1R pourraient être des cibles de l'imatinib mésylate, du fait de leur diminution de phosphorylation par l'imatinib mésylate.

Durant la dernière décade, les effets de l'imatinib mésylate sur la physiologie osseuse ont été étudiés. L'imatinib mésylate inhibe la prolifération des cellules souches mésenchymateuses (CSM) ainsi que la prolifération des ostéoblastes et des cellules stromales, en inhibant le PDGFR (O'Sullivan et al., 2007 ; Jonsson et al., 2012), et par conséquent en inhibant la voie de signalisation PI3K/AKT (Fierro et al., 2007). A des concentrations de 5 μ M et plus, l'imatinib mésylate induit la mort des pré-ostéoblastes (O'Sullivan et al., 2007). De plus, 1 μ M d'imatinib mésylate favorise la différenciation ostéoblastique, la minéralisation et augmente la sécrétion d'ostéocalcine (marqueur de l'activité ostéoblastique) et le ratio OPG/RANKL (OstéoProtéGérine/Receptor Activator of NF κ B Ligand) dans le surnageant après

21 jours de culture (Tibullo et al., 2009). En parallèle, l'imatinib mésylate a un effet dramatique sur l'ostéoclastogenèse. En effet, l'imatinib mésylate va inhiber la survie des précurseurs ostéoclastiques en inhibant le récepteur au M-CSF (El Hajj Dib et al., 2006), ce qui diminue l'ostéoclastogenèse directement (Dewar et al., 2006). Cependant, l'ostéoclastogenèse va également être inhibée indirectement par l'action de l'imatinib mésylate sur les ostéoblastes et les cellules stromales. En effet, comme décrit précédemment, l'imatinib mésylate augmente le ratio OPG/RANKL, en diminuant la sécrétion de RANKL par les ostéoblastes et les cellules stromales et en augmentant la sécrétion d'OPG (O'Sullivan et al., 2007). La diminution du RANKL disponible va donc limiter l'ostéoclastogenèse. Ajouté à cet effet, l'imatinib mésylate va inhiber la survie des ostéoclastes matures en induisant l'apoptose des ostéoclastes par l'inhibition du récepteur au M-CSF (El Hajj Dib et al., 2006) ainsi que la résorption. De plus, l'imatinib mésylate étant capable d'inhiber l'anhydrase carbonique II, indispensable à l'acidification de la zone de résorption, il va donc diminuer l'activité de résorption. *In vitro*, l'ensemble de ses données indique que l'imatinib mésylate permet l'ostéogénèse, selon le stade de maturation des cellules souches mésenchymateuses, au détriment de la résorption, laissant imaginer un déséquilibre osseux chez les patients. En clinique, l'effet de l'imatinib mésylate sur le remodelage osseux semble biphasique. Chez les patients adultes, si l'imatinib mésylate perturbe le métabolisme osseux (hypophosphatémie, hypocalcémie et hyperparathyroïdisme secondaire), son rôle sur la densité osseuse et le remodelage osseux semble divergent. En effet, plusieurs études cliniques ont mis en évidence une augmentation de la densité osseuse soit trabéculaire (O'Sullivan et al., 2009), soit corticale (Jönsson et al., 2008 ; Fitter et al., 2008). Cependant, dans une étude récente (Berman et al., 2013), la densité osseuse corticale est diminuée après au moins 2 ans de traitement. En parallèle de la densité osseuse, des paramètres biochimiques et du remodelage osseux ont été étudiés. Dans l'étude de O'Sullivan et de ses collaborateurs, 3 points de

contrôles sont réalisés, après 3 mois, 6 mois et 18 mois de traitement. Après 3 et 6 mois d'imatinib, l'ostéocalcine en moyenne augmente alors qu'après 18 mois, le taux se stabilise. Inversement, 2 études montrent qu'après plus de 24 mois de traitement, le taux d'ostéocalcine diminue par rapport au groupe sain (Berman et al., 2013 ; Jönsson et al., 2008). L'hypothèse de l'effet biphasique de l'imatinib mésylate paraît possible : en début de thérapie, l'imatinib mésylate augmenterait la minéralisation osseuse (en activant l'activité des ostéoblastes), tout en inhibant la résorption osseuse (inhibition de l'activité ostéoclastique et de l'ostéoclastogénèse), créant une hypophosphatémie et une hypocalcémie, associée à une hyperparathyroïdie secondaire (compensation de l'absence de résorption). L'imatinib mésylate inhibant la prolifération des CSM, lorsque les « stocks » de précurseurs ostéoblastiques sont épuisés, la minéralisation diminue, et s'additionne au défaut de résorption, résultant en une diminution de la masse osseuse. Cette hypothèse serait en adéquation avec les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*. Enfin, l'imatinib mésylate a un effet dramatique sur la croissance des enfants traités avant leur puberté (Bansal et al., 2012 ; Jaeger et al., 2012), notamment par une interruption de l'axe GH/IGH-1 (Growth Hormone/Insulin-like Growth Hormone-1 ; Narayanan et al., 2013) mais également par une diminution de l'épaisseur de la plaque de croissance en inhibant, via le PDGFR, la prolifération et l'activité des chondrocytes (Vandyke et al., 2010).

L'ostéosarcome aurait une origine mésenchymale. En effet, sous le contrôle de divers facteurs, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) peuvent se différencier, entre autre, en chondrocytes (Sox-9), en adipocytes (PPAR γ 2) ou en ostéoblastes (Runx2) (Pittenger et al., 1999). Les ostéosarcomes, exprimant Runx2, l'alkaline phosphatase et autres marqueurs ostéoblastiques, résulteraient ainsi d'une dérégulation du programme de différenciation des CSM. Selon le degré de différenciation atteint par la cellule transformée, les ostéosarcomes

ont des stades de différenciation différents, avec une possibilité de corrélation inverse entre le stade de dédifférenciation et le pronostic (Wagner et al., 2010).

Deux études sur l'effet de l'imatinib mésylate dans l'ostéosarcome ont été réalisées il y a une dizaine d'années (McGary et al., 2002 ; Yoshitani et al., 2003). McGary et ses collaborateurs ont mis en évidence un effet anti-prolifératif et pro-apoptotique de l'imatinib mésylate, associés à une diminution de phosphorylation de PDGFR α et β ainsi que de AKT, molécule incontournable dans la signalisation en aval de ces 2 récepteurs tyrosine kinase. De plus, deux récentes études ont mis en évidence d'autres récepteurs exprimés dans l'ostéosarcome, les récepteurs IGF-2R, PDGFR, IR, VEGFR3 et c-MET dans 14 lignées (Hassan et al., 2011) et EphB2, FGFR2, IGF-1R, Ret et Axl dans 2 lignées métastatiques LM7 et 143B (Rettew et al., 2012). Dans notre étude, l'utilisation d'une approche « phosphoprotéomique » permettant de sonder un panel de phosphorylations de protéines tyrosine kinase, nous avons mis en évidence que l'imatinib mésylate inhibe la phosphorylation de 8 récepteurs tyrosine kinase différents appartenant à 6 familles différentes : la famille PDGF (PDGFR α et PDGFR β), la famille des TAM (Axl), la famille Ryk (Ryk), la famille de ErbB (EGFR), la famille Eph (EphA2 et A10) et la famille Ins (IGF-1R).

Les récepteurs au PDGF est une famille hautement impliquée et étudiée dans l'ostéosarcome, ainsi que dans d'autres cancers osseux (sarcome d'Ewing ; Wang et al., 2010). Différentes études ont montré l'expression de ces récepteurs dans l'ostéosarcome sur des biopsies de patients atteints d'ostéosarcome ; ainsi, dans une étude portant sur 57 patients, 56 biopsies expriment le PDGFR α , sous-divisés en faible (>34%) et fort taux d'expression (< 34%), le taux de 34 % étant basé sur la moyenne d'expression (Sulzbacher et al., 2003). Cette étude a montré qu'il y aurait une corrélation entre le taux d'expression et la survie des patients. De plus, cette étude a également révélé une expression élevée de l'un des isoformes du PDGF, le PDGF-AA, sous-entendant une régulation autocrine ou paracrine

PDGFR/PDGF. En 2008, Kubo et ses collaborateurs ont étudié l'expression du PDGFR α et du PDGF-A chez 51 patients. PDGFR α est exprimé à 80,4 % dont 35,3 % fortement et le PDGF-A est exprimé à 79,4 % dont 30,6 % exprimé fortement (Kubo et al., 2008). De plus, il s'est avéré que leur co-expression survient dans 75,5 % et que, selon les auteurs, il existe une corrélation entre cette co-expression et une diminution de la survie. Cependant, aucune corrélation n'a été décrite pour le PDGFR β et son ligand dans l'ostéosarcome. L'expression du PDGFR serait un marqueur de pronostic. A l'inverse, une étude plus récente réfute cette corrélation entre l'expression du PDGFR α et le pronostic (Sulzbacher et al., 2010). L'ensemble de ces résultats montre la réelle importance de la présence des récepteurs et de leurs ligands dans l'ostéosarcome.

Axl est un récepteur tyrosine kinase appartenant à la famille des TAM. Il joue un rôle important dans le développement et la progression de nombreux cancers de par son action sur la survie cellulaire, l'apoptose (inhibition), la croissance cellulaire, la migration cellulaire et l'angiogenèse (Linger et al., 2008). Ce récepteur a été décrit dans les métastases pulmonaires provenant d'un ostéosarcome en 2003 (Nakano et al., 2003). Axl reste très peu étudié dans l'ostéosarcome mais récemment, des travaux ont montré que la surexpression d'Axl dans l'ostéosarcome protège les cellules de l'apoptose et induit leur migration/invasion par la voie AKT (Han et al., 2013). De plus, l'étude de biopsies de patients a révélé qu'il existe une corrélation entre l'hyperphosphorylation d'Axl, une faible survie et la présence de la MMP-9. Enfin, l'inhibition d'Axl dans des cellules d'ostéosarcome a montré une diminution de prolifération, par la voie PI3K/AKT (Zhang et al., 2013). Axl est donc pro-prolifératif, anti-apoptotique et aurait un rôle dans le développement de métastases.

Ryk est un récepteur tyrosine kinase orphelin et atypique : il n'aurait pas d'activité tyrosine kinase connue. En revanche, Ryk peut s'associer aux récepteurs de la famille Eph (Eph2/3 ; Trivier et Ganesan, 2002) ainsi qu'à Src (Wouda et al., 2008). Ce récepteur est

important dans la voie de signalisation Wnt, dépendant ou non de la β -caténine. Ryk contribue fortement au dialogue entre les cellules tumorales et l'environnement stromal, notamment dans l'ostéosarcome (Macheda et Stacker, 2008 ; Lin et al., 2013). De plus, inhiber la voie Wnt diminue la progression tumorale et la dissémination métastatique dans l'ostéosarcome.

Il existe des interactions cellules-cellules possibles au travers des ephrines (Eph Receptor INtegrating protein) et de leurs récepteurs Eph. EphA2 est exprimé variablement au cours des différenciations ostéoblastique et ostéoclastique (Matsuo et Otaki, 2012). De plus, l'EphA2 est surexprimé dans l'ostéosarcome, ainsi que son ligand, ephrin A2 (Fritsche-Guenther et al., 2010). Au sujet de l'Eph10, celui-ci n'est que très peu étudié.

Le récepteur à l'EGF, impliqué dans de nombreux processus biologiques, a fait l'objet de nombreuses études quant à son expression dans l'ostéosarcome. L'EGFR, une fois activé par son ligand, peut en effet activer des voies majeures de signalisations dont PI3K, RAS/RAF/ERK, JAK/STAT, ainsi que la voie des survivines, appartenant aux IAP (Inhibitor of Apoptosis), qui devient un facteur négatif s'il est surexprimé (Do et al., 2009) et favorise donc la survie cellulaire. L'EGFR induit la migration, la formation de colonies et l'invasion des cellules (Messerschmitt et al., 2008). De plus, une des études les plus récentes montrent que ce récepteur est fréquemment exprimé dans l'ostéosarcome, avec un score de 27/30 biopsies immunomarquées et réparties en 3 groupes de 6, 12 et 9 respectivement pour faible, moyen et fort marquage (Lee et al., 2012). Le rôle de l'EGFR en tant que marqueur dans l'ostéosarcome reste néanmoins controversé. De plus, l'inhibition de ce récepteur induit l'acquisition de résistance. En effet, l'utilisation du gefitinib (inhibiteur de l'EGFR) dans le cancer du poumon a montré un effet anti-cancéreux. Cependant, une résistance à cet inhibiteur irréversible de l'EGFR est observée et dans 50 % des cas est due à la survenue d'une nouvelle mutation de l'EGFR (Kosaka et al., 2006). Une seconde étude a mis en

évidence un second mécanisme de résistance : une amplification de c-MET permet de rétablir une signalisation par le récepteur ErbB3, appartenant à la même famille que l'EGFR, et permet la résistance au gefitinib (Engelman et al., 2007). La co-expression de c-MET et de ErbB2 dans le cancer du sein a également montré une résistance innée aux inhibiteurs de tyrosine kinase (Paulson et al., 2013).

Enfin, le dernier récepteur dont la phosphorylation est inhibée par l'imatinib mésylate est l'IGF-1R. Il a également été montré comme impliqué dans l'ostéosarcome. En effet, une étude de 2013 a mis en évidence une sous-régulation de gènes-clés dans l'inhibition de ce récepteur, les gènes *GAS6* et *IGFBP4* (Kuijjer et al., 2013). Une étude *in vitro* a également montré que l'inhibition de ce récepteur dans des cellules d'ostéosarcome inhibait leur formation de colonies (Messerschmitt et al., 2008). Malheureusement, l'utilisation d'un inhibiteur de l'IGF-1R, le cituxumumab, en monothérapie ne permet pas d'obtenir une réponse thérapeutique satisfaisante dans le sarcome d'Ewing (Malempati et al., 2012). Une stratégie associant un inhibiteur de l'IGF-1R, le cituxumumab, à un inhibiteur de mTOR, le tensirolimus, est actuellement en cours et montre une activité anti-cancéreuse durable dans le sarcome d'Ewing (Naing et al., 2012).

L'ensemble de ces données montre le réel intérêt clinique des inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase mais également l'importance de connaître leur mode de fonctionnement spécifique et de compensation. Bond et son équipe ont rapporté que l'utilisation de l'imatinib mésylate dans l'ostéosarcome ne paraissait pas être la bonne stratégie en monothérapie dans un essai clinique de phase 2 (Bond et al., 2008). Dans cette étude portant sur des tumeurs pédiatriques réfractaires à la chimiothérapie conventionnelle ou en rechute, et connues pour exprimées c-KIT ou le PDGFR, 59 patients ont été recrutés, dont 10 ayant un ostéosarcome. L'étude a mis en évidence une absence de réponse à l'imatinib mésylate (440 mg/m²/jour pendant 28 jours). Cependant, nos travaux ont mis en

évidence un intérêt de l'imatinib mésylate comme agent anti-tumoral *in vitro* et dans deux modèles d'ostéosarcome *in vivo*. L'étude d'expression d'autres récepteurs/protéines tyrosine kinase dans des biopsies de patients atteints d'ostéosarcome paraît non seulement envisageable mais indispensable, afin de mieux cibler et d'appréhender chaque cas clinique. De plus, l'approche par phosphoprotéomique n'a été réalisée que sur la lignée cellulaire HOS. Il conviendrait de reproduire cette approche sur d'autres lignées humaines d'ostéosarcome afin de collecter des données spécifiques à chaque lignée mais qui, par recoupement, pourrait définir une ou plusieurs cibles privilégiées de l'imatinib mésylate, en plus du PDGFR.

La voie PI3K/AKT/mTOR est une voie majeure en aval des récepteurs tyrosine kinase, qui contrôle un grand nombre de processus biologiques. Cependant, la voie PI3K/AKT/mTOR est loin d'être la seule voie de signalisation connue pour transmettre les signaux intracellulaires issus de ces récepteurs. En effet, grâce à différents domaines d'interactions présents dans leur domaine intracytoplasmique, ces récepteurs sont connus pour signaler au travers des voies RAS/RAF/MAPK, JAK/STAT, PLC γ , Wnt et d'autres protéines, telles que Src. Lors de notre étude, nous nous sommes focalisés sur la voie de signalisation PI3K. En effet, l'imatinib mésylate permet une totale inhibition de la phosphorylation d'AKT, ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de mTOR. Cependant, l'étude d'autres voies potentielles paraît indispensable. En effet, ce complément d'étude pourrait mettre en évidence, par exemple, un système de compensation des voies de signalisation suite au traitement par l'imatinib mésylate, ce qui pourrait expliquer en partie une absence de réponse thérapeutique, voire l'apparition de phénomènes de résistance au traitement. Ce phénomène de résistance a été décrit dans la leucémie myéloïde chronique, où l'imatinib mésylate n'avait pas ou plus d'effet. Afin de mieux appréhender la survenue de résistance, il paraît indispensable de réaliser une étude comparative du phosphoprotéome (des

récepteurs/protéines tyrosine kinase) de cellules initialement sensibles à l'imatinib mésylate avec ces mêmes cellules ayant acquis une résistance *in vitro*.

Suite au problème de résistance, des inhibiteurs tyrosine kinase de seconde génération ont été développés, comme par exemple le nilotinib (Tasigna[®]) ou le dasatinib (Sprycel[®]), afin de contrer cette résistance. Des résultats préliminaires obtenus montrent l'efficacité du nilotinib dans les lignées d'ostéosarcome humaines (MG-63, HOS) et de souris (MOS-J et POS-1) contre leur prolifération. Le mode d'action reste cependant à approfondir. Le dasatinib, inhibiteur de Abl et de Src, inhibe *in vitro* l'adhésion et la migration des cellules d'ostéosarcome en inhibant les FAK, mais n'a pas d'effet *in vivo* sur la dissémination métastatique (Hingorani et al., 2009). Cette dernière étude semble donc indiquer que les protéines Src et Abl ne soient pas impliquées prioritairement dans la dissémination métastatique.

En conclusion, notre travail a démontré que l'imatinib mésylate a un intérêt thérapeutique dans l'ostéosarcome mais qu'il reste à mieux caractériser l'ensemble de patients pouvant être répondeur. Cependant, il paraît évident que l'utilisation d'un inhibiteur tyrosine kinase en monothérapie ne soit pas suffisant pour obtenir une réponse thérapeutique stable en clinique, notamment à cause des phénomènes de résistance acquise suite à des boucles de rétrocontrôle dans la signalisation ou bien à des compensations d'inhibition d'un récepteur par un autre récepteur. Il paraît intéressant d'étudier une éventuelle combinaison de traitement, que ce soit avec un agent de chimiothérapie conventionnelle contre l'ostéosarcome ou bien un inhibiteur de voie de signalisation (mTOR, ERK) ou encore un inhibiteur de l'endocytose et des clathrines, protéines impliquées dans l'internalisation/dégradation des récepteurs tyrosine kinase et pouvant participer au phénomène de résistance. Enfin, si l'imatinib mésylate trouve sa place en clinique dans l'ostéosarcome, un suivi de son effet sur la physiologie osseuse devra être mis en place,

prioritairement pour les patients diagnostiqués avant leur puberté et dont le risque d'affecter la croissance reste important.

PARTIE II

CIBLAGE DE LA VOIE

PI3K/AKT/mTOR DANS

L'OSTEOSARCOME

I. Introduction

Les PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase) sont des enzymes clés dont le rôle est de phosphoryler leur substrat lipidique et ainsi de contrôler la transduction de signaux intracellulaires. Basées sur leur préférence de substrat et sur leur homologie de structure, les PI3K sont divisées en 3 classes bien distinctes, dont une classe est majoritairement étudiée : la classe I. La classe I regroupe 4 enzymes hétérodimériques composées d'une sous-unité catalytique (classe IA : p110 α , p110 β et p110 δ ; classe IB : p110 γ) et d'une sous-unité régulatrice (p85 α , p85 β , p85 γ , p50 α , and p55 α). Les sous-unités p110 α et p110 β sont ubiquitaires, alors que les sous-unités p110 δ et p110 γ sont principalement exprimées dans les leucocytes. L'activation de ces enzymes est possible par trois mécanismes différents incluant le recrutement des PI3K par les résidus tyrosines autophosphorylés suite à l'activation d'un récepteur tyrosine kinase (RTK) par un facteur de croissance, l'interaction des PI3K avec les sous-unités G β / γ des protéines G hétérodimériques et enfin l'interaction avec les protéines RAS. Ces enzymes sont transitoirement activées afin de phosphoryler des lipides membranaires en position 3 de leur cycle, créant ainsi de nouveaux produits lipidiques capables de transmettre les signaux régulant de nombreuses fonctions biologiques : prolifération, migration, survie/apoptose, angiogenèse et métabolisme du glucose (contrôlé par l'insuline ; Sopasakis et al., 2010). De plus, les PI3K sont impliquées dans la croissance, dans la différenciation des adipocytes et des cellules musculaires (Yu et al., 2008 ; Kaliman et al., 1996), dans l'homéostasie osseuse (Guntur et Rosen, 2011) et dans les fonctions neurologiques (Bandaru et al., 2010). D'un point de vue pathologique, les sous-unités p110 δ et p110 γ sont principalement impliquées dans les maladies inflammatoires et hématologiques, de par leur distribution tissulaire spécifique, alors que les sous-unités p110 α et p110 β sont généralement associées à un ensemble de maladies, dont les cancers. Dans les cancers, la dérégulation de la voie PI3K peut être consécutive à une inactivation du

gène suppresseur de tumeur *PTEN* (Phosphatase and TENSin homolog), à une amplification/surexpression de certains récepteurs à activité tyrosine kinase, à des mutations les rendant constitutivement actifs, à une amplification de régions codant pour p110 α (*PIK3CA*), pour p110 β (*PIK3CB*) et pour AKT (*AKT*) induisant une surexpression de ces protéines et donc une suractivation, à des mutations de p110 α et de p110 β qui les rendent constitutivement actives.

La voie PI3K est donc une voie complexe, contrôlant un très large panel de fonctions biologiques. Bien que composée de nombreux effecteurs, deux acteurs clés de cette voie sont importants dans la transmission du signal : AKT et mTOR. Lorsque PI3K est activée, celle-ci va permettre la production de PIP₃, indispensable au recrutement d'AKT par son domaine PH (Pleckstrin Homolog) et à son activation par la phosphorylation de sa thréonine 308. Afin d'atteindre son activation maximale, AKT est également phosphorylé par le complexe mTORC2 (Sarbassov et al., 2005). Une fois activé, AKT phosphoryle directement de multiples protéines : p21, p27, GSK β 3 (induit la progression dans le cycle cellulaire et donc la prolifération), BAD, BAX (inhibe l'apoptose), CREB (induit la transcription de gènes pro-survie), FOXO (inhibe la transcription de gènes pro-apoptotique), MDM2 (stabilise la protéine qui va alors dégrader p53), induit la translocation de vésicules contenant un transporteur du glucose ou GLUT4 à la membrane (augmente l'importation de glucose dans la cellule, sous dépendance du taux d'insuline) et d'autres effecteurs dont mTOR.

La protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin ou FRAP1) représente un carrefour de signalisation très complexe ; mTOR appartient à une famille de kinases appelée PIKK (PI3K Related Kinase), composée de 6 protéines Ser/Thr kinases ayant des similitudes de structure avec les PI3K [dont ATR (ATaxia- and Rad3-related) et ATM (ATaxia-telangiectasia Mutated)]. Il existe deux complexes mTOR différents selon leur composition et leur sensibilité à la rapamycine : mTORC1 et mTORC2 (Figure 35).

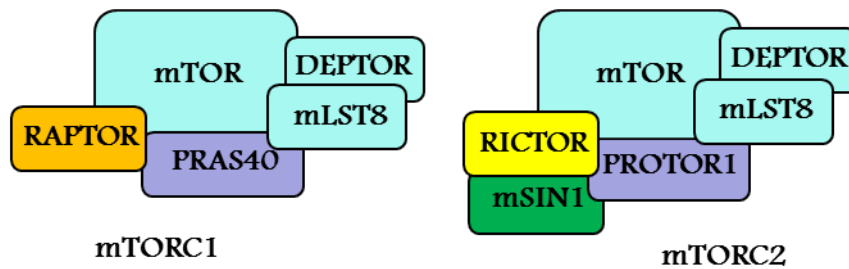


Figure 35 : Composition des complexes mTORC1 et mTORC2. Les deux complexes se distinguent par leur composition protéique et par leur sensibilité à la rapamycine : mTORC1 est sensible, mTORC2 ne l'est pas.

Le complexe mTORC2 est composé de 6 protéines : mTOR, RICTOR (Rapamycin Insensitive Companion of mTOR), mSIN1 (mammalian Stress activated protein kinase INteracting protein 1), PROTOR (observée avec Rictor), mLST8 (ou GβL) et DEPTOR (DEP-domain-containing mTOR interacting protein). Ce complexe est indispensable à l'activation complète d'AKT et est insensible à la rapamycine. De plus, il est impliqué dans le contrôle du cytosquelette d'actine (Jacinto et al., 2004). Le stress mécanique imposé sur des CSM active mTORC2, qui active AKT, qui inhibe GSK3β (Case et al., 2011). Le complexe mTORC1 est composé de 5 protéines : mTOR, RAPTOR (protéine régulatrice de mTOR), PRAS40 (Proline-Rich AKT Substrate 40 kDa), mLST8 (ou GβL) et DEPTOR. De manière générale, l'activation de mTOR passe par l'inhibition du complexe TSC1/TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex). En effet, le complexe TSC actif maintient Rheb (Ras-related GTPase) lié au GDP, ce qui empêche sa fixation à mTORC1. La phosphorylation du complexe TSC engendre son inactivation et par conséquent Rheb-GTP néoformé va activer mTORC1 (Tee et al., 2003). Le complexe mTORC1 est une protéine très impliquée dans la détection d'éléments indispensables au bon fonctionnement de la cellule et permet une augmentation de la durée de vie cellulaire en limitant le gaspillage dans des conditions extrêmes [hypoxie (HIF1α), déplétion en acides aminés, faible énergétique cellulaire (AMPK), inflammation, stress]. Excepté pour la

détection en acides aminés, l'inhibition de mTORC1 est induite par l'activation du complexe TSC (Figure 36).

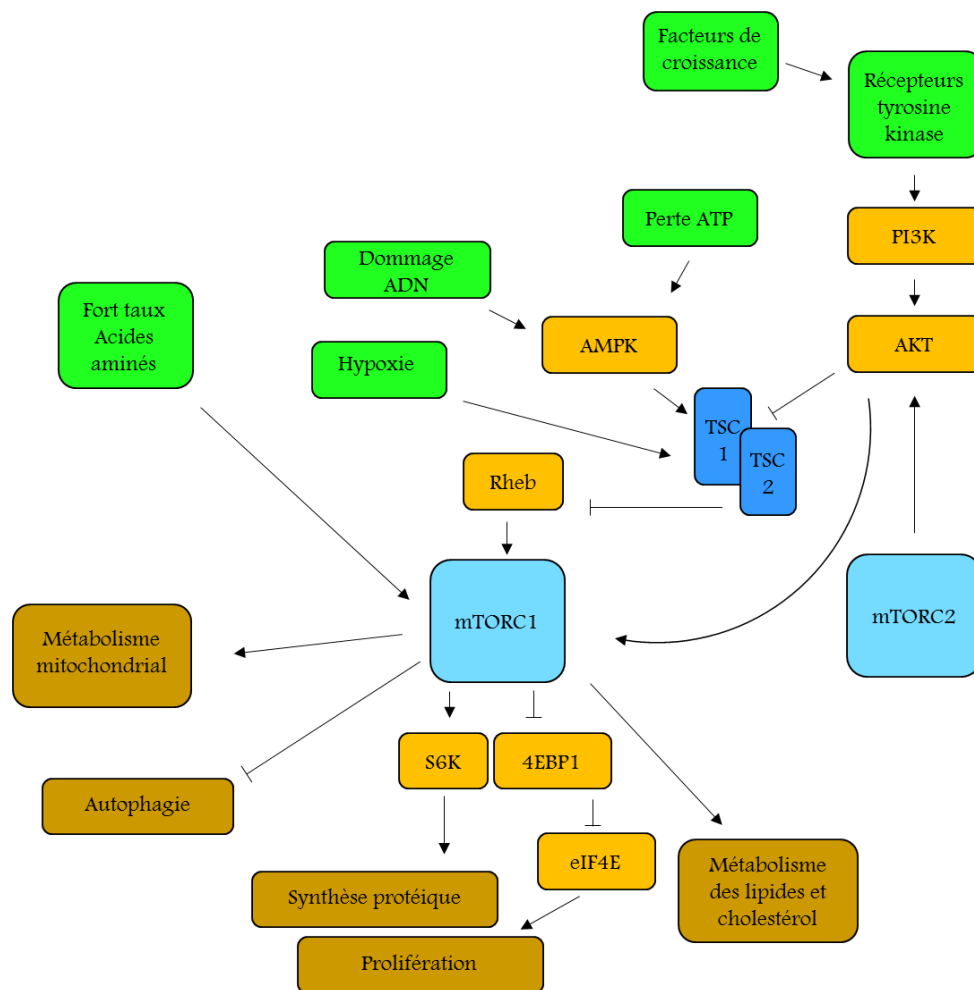


Figure 36 . Voie de signalisation de mTOR. L'activation de mTOR contrôle de nombreux processus cellulaires dont la prolifération, la synthèse protéique, le métabolisme lipidique, du cholestérol et mitochondrial, ainsi que l'autophagie. Les facteurs de croissance activent AKT, qui inhibe le complexe TSC1/TSC2, levant son inhibition sur mTORC1. De plus, la présence d'acides aminés active directement mTORC1. En revanche, l'hypoxie, les dommages à l'ADN et la perte énergétique inhibent mTORC1 en activant le complexe TSC1/TSC2.

De plus, mTORC1 est activé par AKT et ERK, eux-mêmes activés par l'interaction récepteurs tyrosine kinase/facteurs de croissance, qui vont inhiber le complexe TSC. Une fois activé, mTORC1 va induire la synthèse protéique et la prolifération cellulaire en inhibant 4E-BP1, qui va libérer eIF4E (facteur de transcription ; Gingras et al., 2001) et en activant S6K

(Wang et al., 2001 ; Choo et al., 2008). S6K et 4EBP1 sont également impliqués dans la migration des cellules (Zhou et al., 2010). De plus, mTORC1 joue un rôle important dans l'autophagie qui est inhibée lorsque mTOR est activé (Codogno et Meijer, 2005), dans les voies métaboliques où mTOR active le facteur de transcription SREBP-1 (Sterol Regulatory Element binding Proteins-1 ; Porstmann et al., 2008) et PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activator- γ ; Kim et Chen, 2004) et induit la synthèse de lipides et du cholestérol. La protéine mTOR régule également le métabolisme mitochondrial en augmentant le nombre et la fonction des mitochondries lorsqu'il est activé (Schieke et al., 2006). La protéine mTOR est donc à la tête d'un réseau complexe de fonctions cellulaires ; sa dérégulation est impliquée dans de nombreux cancers humains, dont le cancer du poumon, du sein et de la peau (Dazert et Hall, 2011).

Depuis que l'altération de la voie de signalisation PI3K est reconnue comme étant l'une des causes majeures de la tumorigenèse mais également d'autres pathologies (pour exemple : le diabète), un grand nombre d'inhibiteurs ont été développés dans le but de cibler PI3K directement, mais également de nombreux effecteurs de la voie, tels que mTOR (dérivés de la rapamycine : RAD001, AZD805) ou AKT (MK-2206, Perifosine). Selon leurs propriétés pharmacocinétiques et leur sélectivité d'inhibition des différents isoformes en se fixant au site de liaison de l'ATP, les inhibiteurs de PI3K sont répartis en plusieurs groupes : les inhibiteurs « pan-PI3K », « PI3K-spécifique » et « dual-PI3K/mTOR ». Les inhibiteurs « pan-PI3K » sont des molécules chimiques ciblant plusieurs isoformes de PI3K, voire plusieurs classes de PI3K. Les premiers prototypes de cette catégorie d'inhibiteurs sont la wortmannin et le LY294002. Ayant montré des effets toxiques dans des modèles précliniques suite à leur faible spécificité, ces deux inhibiteurs sont surtout utilisés comme outil de recherche afin de mieux appréhender les fonctions de PI3K dans l'activité biologique. Depuis, d'autres pan-PI3K, plus sélectifs, ont été développés comme par exemple le BKM120 (Nanni et al., 2012 ;

Bendell et al., 2012) et le GDC-0941 (Folkes et al., 2008 ; Salphati et al., 2011), qui ont des propriétés anti-tumorales dans plusieurs modèles précliniques. Des études cliniques de phase I ont par ailleurs révélé leur bonne tolérance (bon profil pharmacocinétique, effets secondaires acceptables, détermination des doses maximales tolérées). Un autre inhibiteur, le BAY 80-6946, semble également prometteur (Patnaik et al., 2012). Les inhibiteurs « PI3K-spécifiques » sont des inhibiteurs qui vont être spécifiques d'un seul isoforme lorsque leur concentration est optimale. Ces inhibiteurs ont été initialement développés afin de diminuer la toxicité observée avec les « pan-PI3K ». Parmi ces inhibiteurs, il existe le CAL-101 (p110 δ), le GSK2636771 (p110 β) et le GDC-0032 (p110 α). Les inhibiteurs « dual-PI3K/mTOR » sont des molécules ciblant à la fois les isoformes PI3K de la classe I et les complexes mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) 1 et 2. Cette double inhibition est basée sur une homologie de structure des sous-unités catalytiques et permet une forte efficacité contre l'extinction de la voie PI3K. Parmi ces inhibiteurs, il existe le GDC-0980, le NVP-BGT226 et le NVP-BEZ235.

Dans l'ostéosarcome, l'implication de la voie PI3K/AKT/mTOR a été confirmée. L'utilisation du LY294002 (inhibiteur pan-PI3K) a montré sa capacité à réduire les phosphorylations d'AKT dans les cellules humaines MG-63 (ostéosarcome), ce qui induit leur blocage en G0/G1 et une induction de l'apoptose où les caspases 3 et 9 ainsi que PARP (Poly(ADP-Ribose) Polymerase) sont activés (Gong et al., 2012). Une étude récente d'un micro-ARN (miR) ciblant PTEN, le miR-221, a confirmé l'implication de PI3K dans la prolifération de cellules d'ostéosarcomes humains *in vitro* (Zhao et al., 2013). L'extinction de ce miR-221, rétablissant l'activité phosphatase de PTEN, entraîne une inhibition de la prolifération, ainsi qu'un blocage en G0/G1 et une induction de l'apoptose. Cette étude a également montré que l'absence de PTEN, ce qui augmente l'activité PI3K, induit une résistance des cellules au cisplatine. Dans une étude mécanistique de c-MET, l'inhibition de

PI3K par le LY294002 a également révélé une sensibilisation des cellules MG-63 et SAOS2 au cisplatine (Wang et al., 2012). En 2012, une étude de « screening » à haut débit sur 98 échantillons d'ostéosarcome a mis en évidence trois mutations de *PIK3CA* dans l'ostéosarcome : H1047R (exon 20), E545K (exon 9) et H701P (exon 13) (Choy et al., 2012). Dans de nombreux cancers, les mutations de *PIK3CA* les plus très fréquentes sont H1047R, dans la partie C terminale du domaine catalytique et E542K / E545K dans le domaine hélicoïdal (Samuels et al., 2004). La mutation H701P est plus rare et est située en N terminal du domaine kinase, éloignée du domaine catalytique (Gymnopoulos et al., 2007). Cependant, outre les mutations de *PIK3CA*, la suractivation de PI3K a également été associée à une augmentation d'activité de certains récepteurs tyrosine kinase (IGF-1R, PDGFR, EGFR ; Kubo et al., 2008). Concernant mTOR, une étude récente a montré que mTOR est exprimé dans plus de 75 % des ostéosarcomes avec un fort marquage immunohistologique dans près de 50 % d'entre eux (Zhou et al., 2010). De plus, la surexpression de mTOR et de S6K, un de ses effecteurs, est corrélée avec la survenue de métastases et la mauvaise réponse au traitement pré-opératoire. Au laboratoire, Moriceau et ses collaborateurs ont montré que le RAD001 a un effet cytostatique dans des lignées d'ostéosarcomes sensibles, et que RAD001 présente une activité synergique avec un bisphosphonate (l'acide zolédronique) *in vitro* ainsi que *in vivo*, dans un modèle murin résistant au RAD001 (Moriceau et al., 2010). Le rôle de mTOR a également été étudié dans 2 lignées de souris dérivant d'un même ostéosarcome spontané murin : K7M2, hautement métastatique, et K12, moins métastatique (Mu et al., 2013). L'inhibition de mTOR par le RAD001 inhibe la prolifération, la migration et l'invasion des cellules K7M2 ainsi que l'expression des gènes codants pour BMP-2 (activé pendant l'hypoxie dans les ostéoblastes), VEGF (angiogenèse) et ALDH (ALdéhyde DeHydrogenase) dont l'activité est impliquée dans les métastases, la résistance de l'ostéosarcome aux drogues et engage le pronostic (Honoki et al., 2010).

L'ensemble de la littérature indique donc que la voie PI3K est une voie très impliquée dans le développement et la progression de cancers, dont l'ostéosarcome. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux inhibiteurs de la voie PI3K/AKT : le NVP-BEZ235 et le BYL719 (Figure 37).

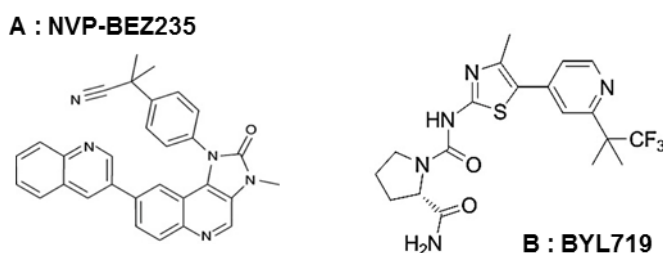


Figure 37 : Structures chimiques du NVP-BEZ235 et du BYL719. Le NVP-BEZ235 est un inhibiteur dual-PI3K/mTOR (A) et le BYL719 est un inhibiteur spécifique de p110 α (B).

Le NVP-BEZ235, est un inhibiteur réversible « dual-PI3K/mTOR », ciblant donc à la fois PI3K et mTOR, il va bloquer les sites de liaison à l'ATP, y compris la sous-unité p110 α mutée. Le NVP-BEZ235 a déjà montré une efficacité anti-tumorale dans plusieurs modèles précliniques de tumeurs solides : le cancer du sein (Brünner-Kubath et al., 2011), le cancer colorectal (Roper et al., 2011) et les sarcomes (Manara et al., 2010), dont le chondrosarcome (Zhang et al., 2013). Des résultats de phases I en clinique montre que le NVP-BEZ235 est bien toléré avec des effets secondaires maîtrisables (nausée, fatigue, etc) (Juric et al., 2012). La seconde molécule est le premier inhibiteur spécifique de la sous-unité catalytique p110 α , le BYL719, capable de cibler la fixation de l'ATP sur p110 α sauvage ou muté. Des résultats préliminaires chez des patients atteints de tumeurs solides avancées montrent que le BYL719 est bien toléré, avec des effets secondaires gérables (nausée, hyperglycémie, fatigue, etc).

Les effets du NVP-BEZ235 et du BYL719 ont été étudiés *in vitro* dans des lignées d'ostéosarcomes humains (MG-63 et HOS) et de souris (MOS-J et POS-1) ainsi que *in vivo* dans deux modèles murins : MOS-J chez la souris C57BL/6J (modèle syngénique) et HOS

chez la souris Nude-NMRI (modèle xénogénique). L'effet du BYL719 a également été étudié en combinaison avec un agent de chimiothérapie conventionnelle dans l'ostéosarcome, l'ifosfamide. Enfin, les effets du BYL719 ont été testés *in vitro* sur la viabilité et l'activité des cellules osseuses impliquées dans le remodelage osseux : les cellules souches mésenchymateuses / ostéoblastes ainsi que les monocytes / ostéoclastes.

II. Résultats

A. Effet du NVP-BEZ235 et du BYL719 *in vitro*

Le NVP-BEZ235 et le BYL719 inhibent la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR

Dans un premier temps, une cinétique de temps d'exposition (0 à 24 h) au NVP-BEZ235 (200 nM) ou au BYL719 (25 μ M) sur les cellules d'ostéosarcome HOS et MOS-J a été réalisée afin de déterminer leurs effets sur la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR par détection de protéines spécifiques par western blot (Figure 38).

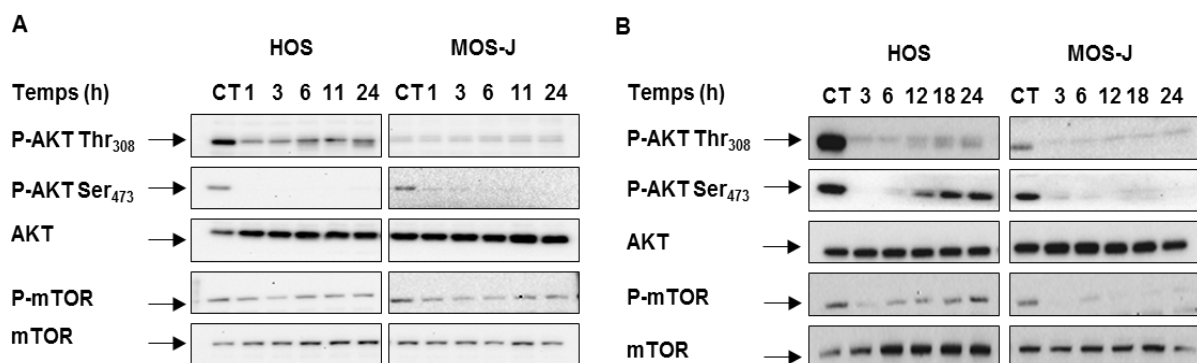


Figure 38. Effet du NVP-BEZ235 et du BYL719 sur la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Les cellules ont été exposées à 200 nM de NVP-BEZ235 (A) ou à 25 μ M de BYL719 (B) pendant 1 à 24 heures.

Le NVP-BEZ235 inhibe stablement dans le temps les phosphorylations d'AKT (Thr308 et Ser473) et de mTOR (Ser2448), confirmant ainsi son effet inhibiteur double PI3K/AKT. Le BYL719, inhibiteur spécifique de la sous-unité p110 α de PI3K, inhibe également les phosphorylations d'AKT (Thr308 et Ser437) et de mTOR (Ser2448) après 3 et 6 heures d'exposition dans les lignées HOS et MOS-J. Cependant, alors que cette inhibition est stable pour la lignée MOS-J jusqu'à 24 h d'exposition, les phosphorylations d'AKT et de mTOR sont de nouveau détectées à partir de 12 h d'exposition, et ce jusqu'à 24 h, dans la lignée HOS. La signalisation AKT/mTOR semble donc être réactivée dans les cellules HOS.

Le NVP-BEZ235 et le BYL719 inhibent la prolifération des cellules d'ostéosarcome

Après 72 h d'exposition, ou non, avec le NVP-BEZ235 ou avec le BYL719, des tests XTT ont été réalisés afin de déterminer les effets des molécules sur la viabilité cellulaire. Le NVP-BEZ235 inhibe significativement la viabilité cellulaire des lignées humaines (MG-63 et HOS) et de souris (MOS-J et POS-1) (Figure 39A) avec des IC₅₀ de 8, 20, 36 et 38 nM respectivement pour les lignées MG-63, HOS, MOS-J et POS-1 et des IC₉₀ de 44, 90, 98 et 84 nM (Tableau 12). Le BYL719 inhibe également significativement la viabilité cellulaire des lignées humaines et de souris (Figure 39B). Les IC₅₀ calculés sont de 6, 15, 10 et 8 μ M respectivement pour les lignées MG-63, HOS, MOS-J et POS-1 (Tableau 12). L'exposition des cellules à de faibles doses de chaque molécule (NVP-BEZ235 < 1 nM ; BYL719 < 1 μ M) n'a révélé aucun effet sur leur prolifération (données non-montrées). Enfin, ces résultats ont été confirmés par comptage manuel, suite à un test d'exclusion du bleu trypan (résultats non-montrés).

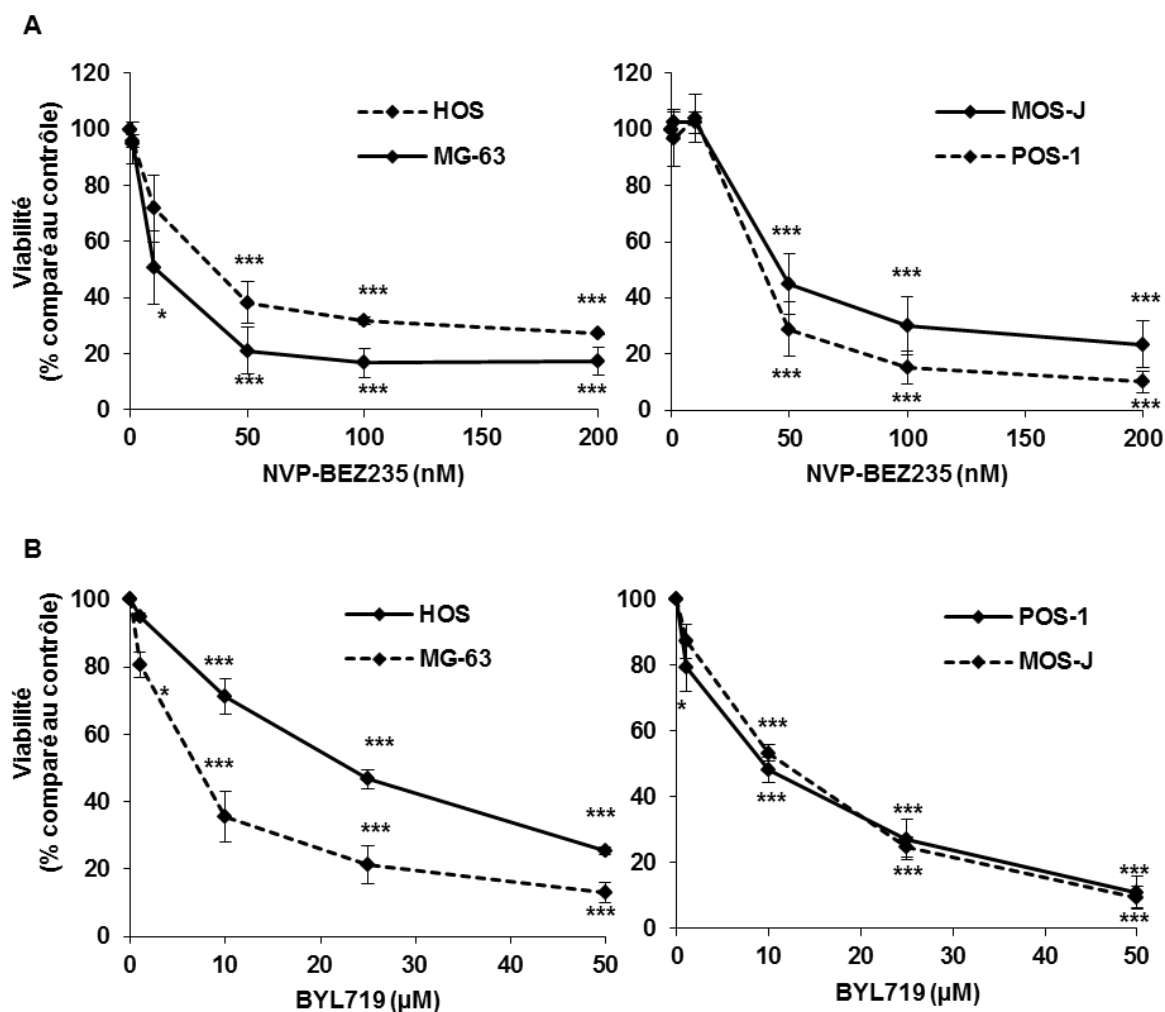


Figure 39 . Le NVP-BEZ235 et le BYL719 diminuent la viabilité des cellules d'ostéosarcome. Les cellules humaines (MG63 et HOS) et de souris (MOS-J et POS-1) sont traitées pendant 72 h avec des doses croissantes de NVP-BEZ235 (A) ou de BYL719 (B). La viabilité cellulaire est déterminée par un test XTT. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ comparé au contrôle.

	Cellules	MG-63	HOS	MOS-J	POS-1
NVP-BEZ235	IC ₅₀ (nM)	8	20	38	36
	IC ₉₀ (nM)	44	90	98	84
BYL719	IC ₅₀ (µM)	6	15	10	8
	IC ₉₀ (µM)	24	42	36	36

Tableau 12 . Récapitulatif des IC50 et des IC90 du NVP-BEZ235 et du BYL719 à 72 heures sur les lignées d'ostéosarcome. Les cellules humaines (MG63 et HOS) et de souris (MOS-J et POS-1) sont traitées pendant 72 h avec des doses croissantes de NVP-BEZ235 ou de BYL719.

Dans un second temps, afin de déterminer si l'effet sur la viabilité est associé à une altération du cycle cellulaire, l'effet des molécules a été étudié sur la répartition des cellules d'ostéosarcome dans le cycle cellulaire, après 24 h et 18 h de traitement, respectivement pour le NVP-BEZ235 et le BYL719. Les résultats mettent en évidence une accumulation des cellules dans la phase G0/G1 induite par 200 nM de NVP-BEZ235 (Figure 40). Ainsi, les proportions de cellules augmentent de 16, 49, 24 et 31 % pour les lignées MG-63, HOS, MOS-J et POS-1 après 24 h de traitement (Tableau 13). La perte de cellules dans les phases S et G2/M est concomitante à cette augmentation en G0/G1. De plus, très peu voire aucune accumulation de cellules en phase SubG0 n'a été détectée.

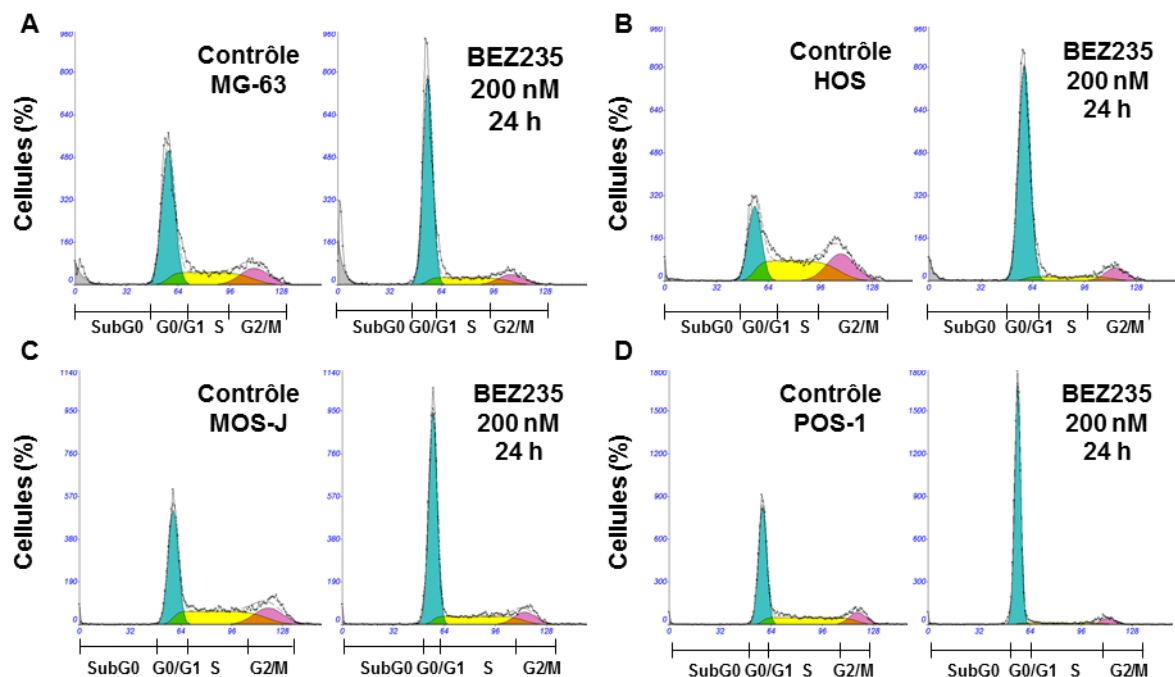


Figure 40 . Le NVP-BEZ235 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 des cellules d'ostéosarcome. Les cellules humaines (MG63 et HOS ; A et B) et de souris (MOS-J et POS-1 ; C et D) sont traitées pendant 24 h avec 200 nM de NVP-BEZ235 puis l'ADN est marqué au iodure de propidium avant lecture en cytométrie en flux.

Lignées	Conditions	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	SubG0 (%)
MG63	Contrôle	57	27	15	5
	NVP-BEZ235	73	17	9	8
HOS	Contrôle	32	44	25	2
	NVP-BEZ235	81	10	9	5
MOS-J	Contrôle	44	37	18	2
	NVP-BEZ235	65	22	10	2
POS-1	Contrôle	57	31	12	2
	NVP-BEZ235	88	6	6	3

Tableau 13 . Répartition des cellules d'ostéosarcome dans le cycle cellulaire après traitement au NVP-BEZ235. Les cellules humaines (MG63 et HOS) et de souris (MOS-J et POS-1) sont traitées pendant 24 h avec 200 nM de NVP-BEZ235. Les résultats sont exprimés en %.

Pour le BYL719, 25 μ M induisent également une augmentation des cellules en phase G0/G1, de 57 à 70 % pour les cellules MG-63, de 44 à 73 % pour les cellules HOS, de 45 à 70 % pour les cellules MOS-J et de 58 à 70 % pour les cellules POS-1 (Figure 41). De même, peu d'accumulation de cellules en phase SubG0 a été détectée (Tableau 14).

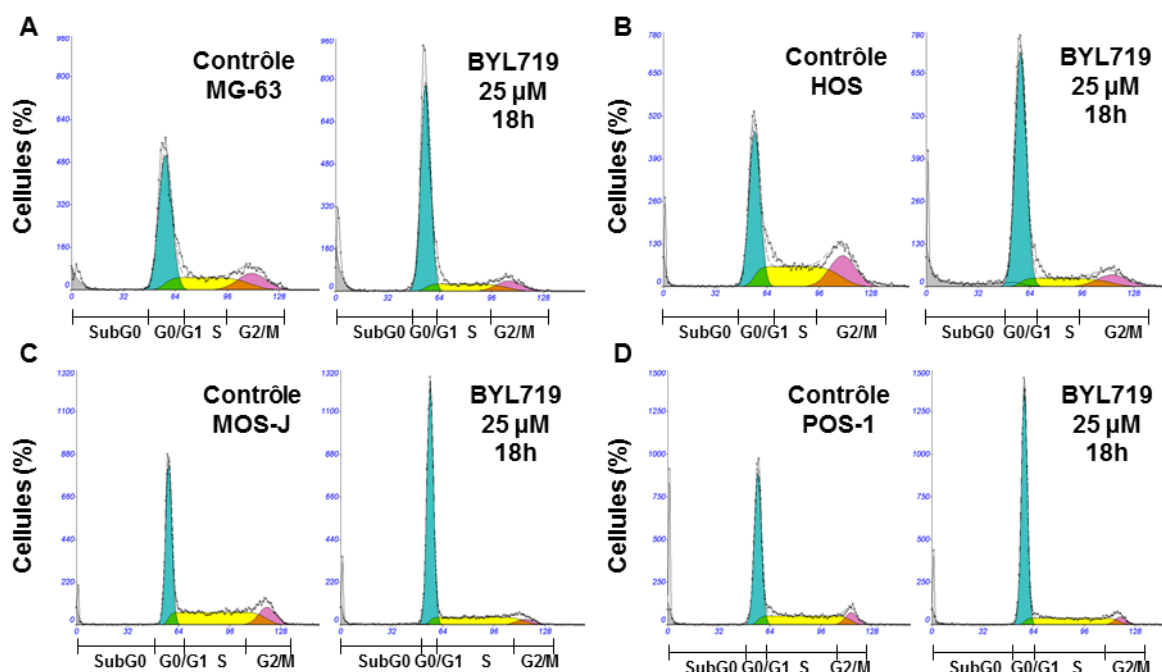


Figure 41 : Le BYL719 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 des cellules d'ostéosarcome. Les cellules humaines (MG63 et HOS ; A et B) et de souris (MOS-J et POS-1 ; C et D) sont traitées pendant 18 h avec 25 μ M de BYL719 puis l'ADN est marqué au iodure de propidium avant lecture en cytométrie en flux.

Lignées	Conditions	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	SubG0 (%)
MG63	Contrôle	57	29	14	4
	BYL719	70	22	8	12
HOS	Contrôle	44	36	20	4
	BYL719	73	17	14	11
MOS-J	Contrôle	45	43	13	4
	BYL719	70	26	5	6
POS-1	Contrôle	58	34	8	5
	BYL719	70	25	5	4

Tableau 14 . Répartition des cellules d'ostéosarcome dans le cycle cellulaire après traitement au BYL719. Les cellules humaines (MG63 et HOS) et de souris (MOS-J et POS-1) sont traitées pendant 18 h avec 25 μ M de BYL719. Les résultats sont exprimés en %.

En conclusion, le NVP-BEZ235 ainsi que le BYL719 inhibent la prolifération cellulaire des 4 lignées d'ostéosarcomes étudiées, en altérant leur cycle cellulaire, aboutissant à une accumulation de cellules en phase G0/G1.

Le NVP-BEZ235 et le BYL719 sont des inhibiteurs cytostatiques

Les résultats précédents ont mis en évidence une inhibition de la prolifération des cellules d'ostéosarcome. Cependant, il est apparu important de déterminer si cette inhibition était associée à une induction de mort cellulaire. Afin de répondre à cette question, des comptages manuels au bleu trypan ont été réalisés (résultats non-montrés) ainsi que des tests d'activité caspases. Lors des comptages manuels, très peu de cellules mortes ont été comptées suite au traitement, et au NVP-BEZ235, et au BYL719. Dans un second temps, les cellules ont été traitées par 200 nM de NVP-BEZ235 ou par 25 μ M de BYL719 pendant 3 h à 48 h. En parallèle, un contrôle positif de l'induction de l'activité caspase a été réalisé (staurosporine = STS ; 0,1 μ M pendant 10 heures). Les résultats montrent que ni le NVP-BEZ235 (Figure 42A), ni le BYL719 (Figure 42B) n'induit l'activité des caspases des cellules

d'ostéosarcome. Les résultats montrent donc que le NVP-BEZ235 ainsi que le BYL719 se comportent comme des agents cytostatiques.

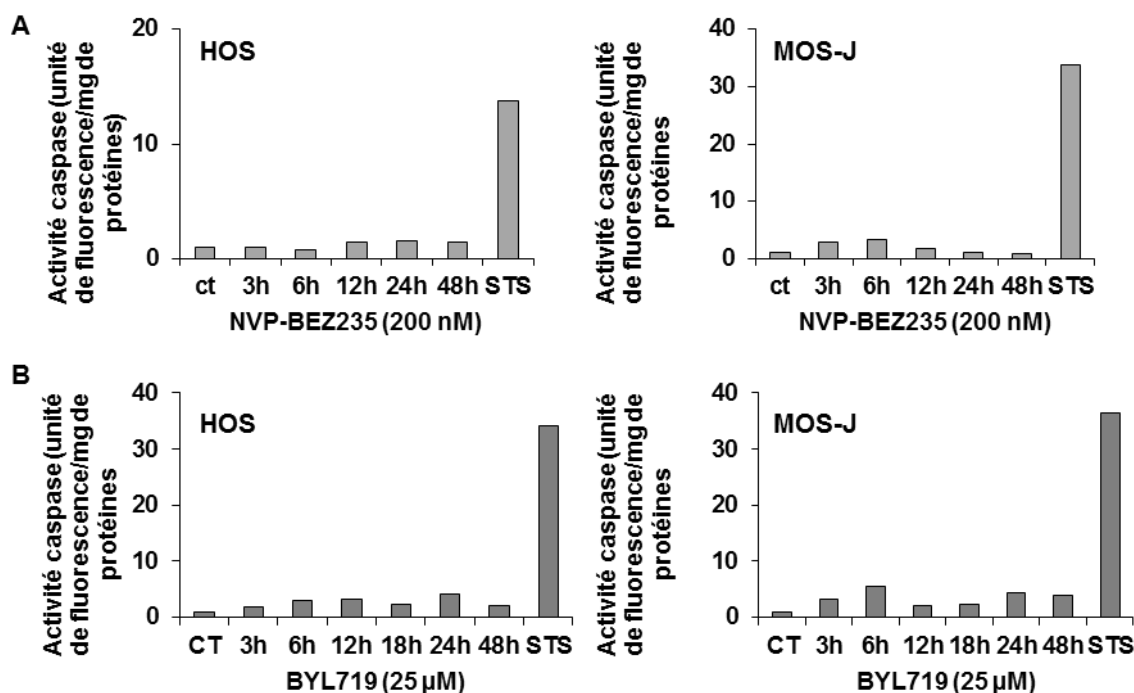


Figure 42 . Le NVP-BEZ235 et le BYL719 n'induisent pas d'activité caspase. Les cellules humaines HOS et de souris MOS-J sont traitées pendant 3 à 48 h avec 200 nM de NVP-BEZ235 (A) ou avec 25 μ M de BYL719 (B). L'activité caspase est testée sur 10 μ l de lysat cellulaire total selon une méthode de fluorimétrie (clivage d'un substrat fluorescent lorsque l'activité caspase est induite). STS (staurosporine) est utilisé en tant que contrôle positif de l'induction de l'activité caspase.

B. Effet du NVP-BEZ235 *in vivo*

Le NVP-BEZ235 inhibe la croissance tumorale ainsi que la formation d'os ectopique tumoral dans deux modèles murins d'ostéosarcome

Suite aux résultats obtenus *in vitro* sur l'effet inhibiteur du NVP-BEZ235, le potentiel de cet inhibiteur a été testé *in vivo* dans deux modèles murins d'ostéosarcome. Dans la première étude préclinique, des tumeurs MOS-J ont été induites chez des souris C57BL/6J.

Les souris sont traitées dès le lendemain de l'injection de cellules MOS-J par un gavage quotidien de 45 mg/kg de NVP-BEZ235 ou d'une solution contrôle (NMP/PEG). Le suivi tumoral et du bien-être des souris (poids, comportement) est réalisé au minimum 3 fois par semaine. Aucun effet indésirable n'a été constaté. Le NVP-BEZ235 ralentit la croissance tumorale de $2026 \pm 108 \text{ mm}^3$ pour le groupe contrôle à $1424 \pm 124 \text{ mm}^3$ pour le groupe traité, soit une diminution significative de 30 % ($p < 0,01$; Figure 43A). La progression tumorale entre les jours 5 et 22 a été calculée et diminuée de $1730 \pm 101 \text{ mm}^3$ pour le groupe contrôle à $1222 \pm 121 \text{ mm}^3$ pour le groupe traité ($p < 0,01$; Figure 43B).

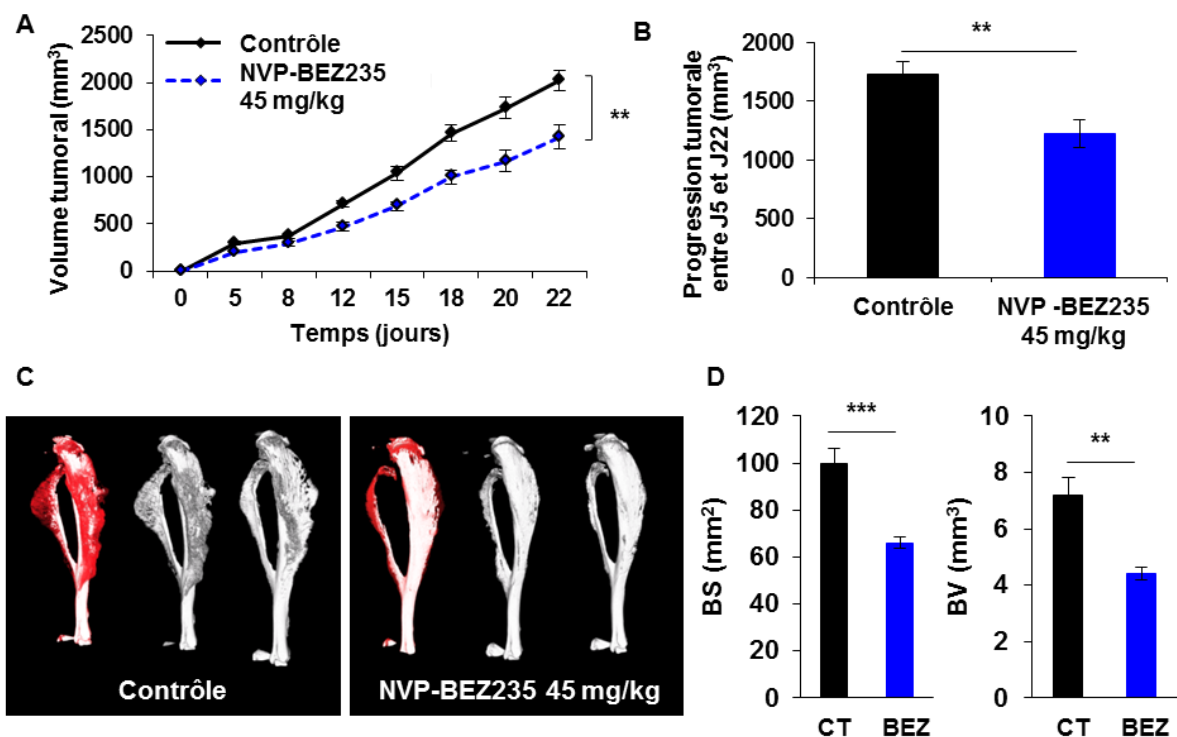


Figure 43. Le NVP-BEZ235 a un effet anti-tumoral dans un modèle syngénique murin d'ostéosarcome. Les cellules MOS-J (1 million) ont été injectées en site para-tibial chez la souris C57BL/6J (n=6 par groupe). Les souris sont randomisées selon 2 groupes : contrôle ou NVP-BEZ235 45 mg/kg/jour (BEZ). Le traitement débute un jour après l'injection de cellules. Croissance tumorale (A). Progression tumorale entre les jours 5 et 22 (B). Reconstruction en 3D des tibias au contact de la tumeur (*ex-vivo*) ; rouge = os ectopique (C). Analyses de la surface (BS) et du volume (BV) de l'os associé à la masse tumorale, cortical + ectopique (D). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (erreur standard). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Après la mise à mort des animaux, des acquisitions par microscanner ont été effectuées sur les prélèvements *ex-vivo*. Les tibias portant la tumeur ont été analysés dans le but d'évaluer l'impact du NVP-BEZ235 sur l'os en contact avec la tumeur. Puis, les tibias controlatéraux ont été analysés afin de détecter un effet systémique du NVP-BEZ235 sur le remodelage osseux. Les reconstructions en 3D des tibias en contact de la tumeur montrent que le NVP-BEZ235 inhibe fortement la formation d'os ectopique (en rouge) induite par la tumeur (Figure 43C). De plus, l'analyse moyenne de la surface osseuse (BS) et du volume osseux (BV) au niveau de l'os cortical a été réalisée. Ainsi, une diminution significative du BS de $100 \pm 6,2 \text{ mm}^2$ à $65,9 \pm 2,4 \text{ mm}^2$ ainsi que du BV de $7,2 \pm 0,6 \text{ mm}^3$ pour à $4,4 \pm 0,2 \text{ mm}^3$ a été observée, confirmant l'effet protecteur du NVP-BEZ235 contre la néoformation osseuse ectopique tumorale (Figure 43D). Enfin, l'analyse histologique effectuée sur les prélèvements tumoraux a mis en évidence une diminution du marquage Ki67, marqueur de la prolifération, ainsi qu'une diminution des marquages CD31 et CD146, marqueurs endothéliaux et péricytaire, par le NVP-BEZ235 (Figure 44).

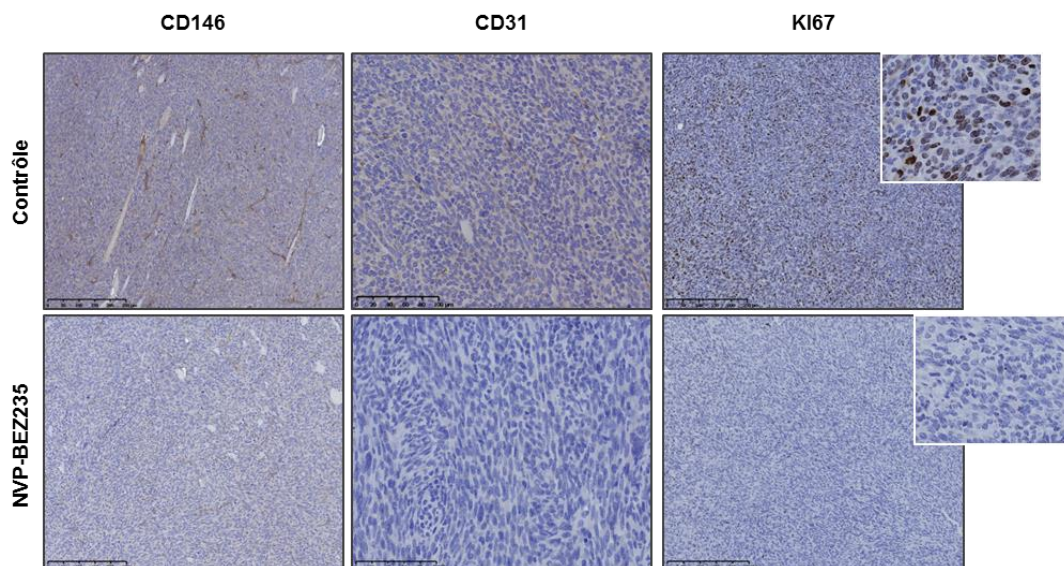


Figure 44 : le NVP-BEZ235 diminue la vascularisation et la prolifération des cellules d'ostéosarcome MOS-J *in vivo*. La vascularisation est observée par des marquages immunohistochimiques des cellules endothéliales (CD31) et des péricytes (CD146) sur des coupes en paraffine de 3 μm . La prolifération est observée par un marquage immunohistochimique Ki67.

Dans un second temps, l'analyse des paramètres morphologiques a été effectuée au niveau de l'os trabéculaire et de l'os cortical des tibias controlatéraux des animaux traités. Suite à l'analyse de l'os trabéculaire, aucun paramètre n'est modifié par le NVP-BEZ235 systémique, l'analyse de l'os cortical met en évidence une augmentation de la densité osseuse surfacique (BS/TV ; $8,05 \pm 0,17 \text{ mm}^{-1}$ à $8,61 \pm 0,12 \text{ mm}^{-1}$; $p < 0,05$) et une diminution de l'épaisseur de la corticale (C.Th ; $0,24 \pm 0,01 \text{ mm}$ à $0,22 \pm 0,005 \text{ mm}$; $p < 0,05$) (Tableau 15).

(A) Analyse os trabéculaire			(B) Analyse os cortical		
Paramètres	Contrôle	NVP-BEZ235	Paramètres	Contrôle	NVP-BEZ235
TV (mm^3)	$0,79 \pm 0,07$	$0,93 \pm 0,06$	TV (mm^3)	$7,14 \pm 0,26$	$6,73 \pm 0,12$
BV (mm^3)	$0,21 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,02$	BV (mm^3)	$4,87 \pm 0,24$	$4,51 \pm 0,12$
BV/TV (%)	$26,69 \pm 0,79$	$26,83 \pm 1,34$	BV/TV (%)	$68,00 \pm 0,90$	$67,00 \pm 0,57$
TS (mm^2)	$6,52 \pm 0,3$	$7,45 \pm 0,33$	TS (mm^2)	$55,32 \pm 0,69$	$55,31 \pm 0,62$
BS (mm^2)	$11,02 \pm 0,82$	$12,44 \pm 0,84$	BS (mm^2)	$57,21 \pm 1,21$	$57,86 \pm 0,75$
BS/BV (mm^{-1})	$45,04 \pm 1,01$	$50,76 \pm 1,25$	BS/BV (mm^{-1})	$11,86 \pm 0,41$	$12,87 \pm 0,28$
BS/TV (mm^{-1})	$14,13 \pm 0,3$	$13,51 \pm 0,38$	BS/TV (mm^{-1})	$8,05 \pm 0,17$	$8,61 \pm 0,12^*$
Tb,Th (mm)	$0,07 \pm 0,002$	$0,08 \pm 0,002$	CTh (mm)	$0,24 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,005^*$
Tb,N (mm^{-1})	$3,75 \pm 0,06$	$3,56 \pm 0,10$			
Tb,Sp (mm)	$0,14 \pm 0,003$	$0,15 \pm 0,004$			

Tableau 15 . Le NVP-BEZ235 n'a pas d'effet sur l'os trabéculaire et très peu d'effet sur l'os cortical des tibias controlatéraux de souris C57BL/6J. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. L'analyse des paramètres est réalisée sur des ROI (Region Of Interest) fixes. Paramètres de l'os trabéculaire (A). Paramètres de l'os cortical (B). Abréviations : TV = Tissu Volume ; BV = Bone Volume ; TS = Tissu Surface ; BS = Bone Surface ; Tb.Th = Trabecular Thickness ; Tb.N = Trabecular Number ; Tb.Sp = Trabecular Separation ; C.Th = Cortical Thickness. * $p < 0,05$.

Enfin, des analyses histologiques ont été réalisées sur les prélèvements controlatéraux : le NVP-BEZ235 augmente significativement la surface d'ostéoclastes TRAP⁺ ($p < 0,001$) et diminue significativement le nombre de cellules Ostérix⁺ ($p < 0,05$) (Figure 45).

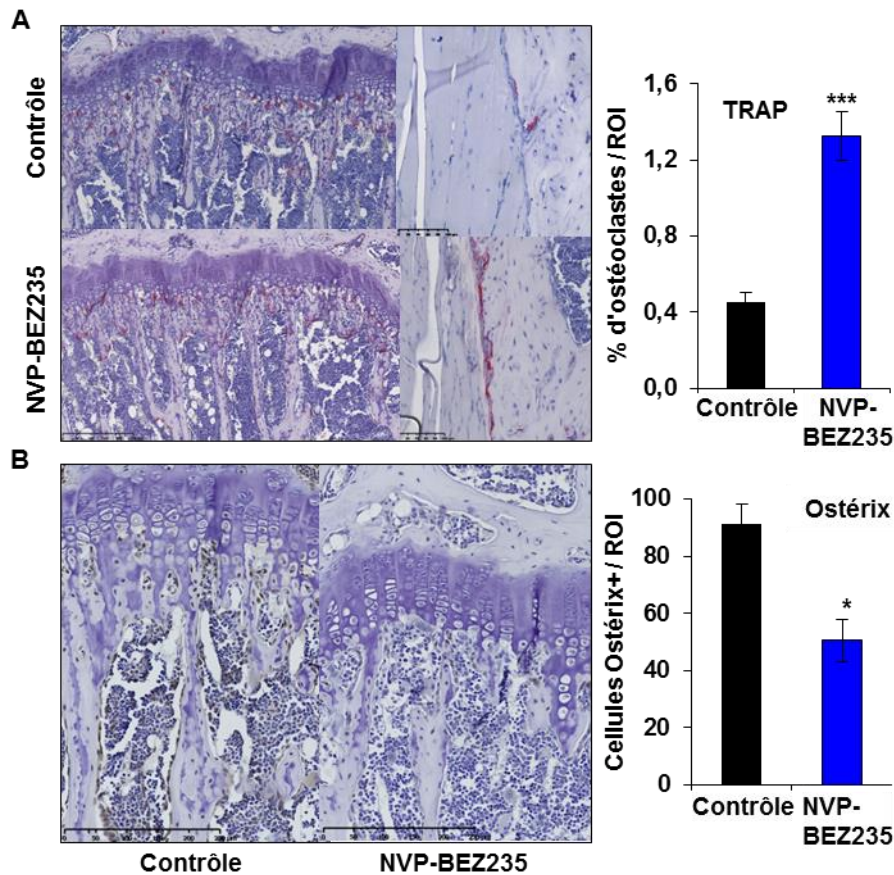


Figure 45 . Le NVP-BEZ235 augmente le nombre d'ostéoclastes et diminue le nombre de cellules Ostérix *in vivo* du tibia sans tumeur des souris C57BL/6J traitées. Marquage histoenzymatique TRAP (A) et immunohistochimique Ostérix (B) sur des coupes en paraffine de 3 μ m. Pour TRAP, les résultats représentent une quantification du marquage positif rapporté à la quantité d'os (Image J) et sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Pour Ostérix, les résultats représentent le nombre de cellules positives comptées dans 3 ROI (Region Of Interest) de taille fixe par coupe et sont exprimés en moyenne \pm écart-type. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Etant donnée les effets bénéfiques du NVP-BEZ235 sur la croissance tumorale et sur la formation osseuse ectopique tumorale, un protocole préclinique similaire a été réalisé dans un second modèle murin. Des tumeurs humaines HOS ont été induites au contact du tibia de souris immunodéficientes, les souris Nude-NMRI. Les souris traitées reçoivent 45 mg/kg de NVP-BEZ235 quotidiennement, par gavage. Comme constaté dans la première expérimentation, aucun effet indésirable n'a été remarqué. Le NVP-BEZ235 ralentit significativement la croissance tumorale de $1445 \pm 209 \text{ mm}^3$ pour le groupe contrôle à $651 \pm 44 \text{ mm}^3$ pour le groupe traité, soit une réduction de 55 % ($p < 0,01$; Figure 46A). La

progression tumorale calculée entre les jours 5 et 22 confirme cette diminution avec une progression tumorale de $1260 \pm 204 \text{ mm}^3$ contre $569 \pm 53 \text{ mm}^3$ pour le groupe traité ($p < 0,01$; Figure 46B).

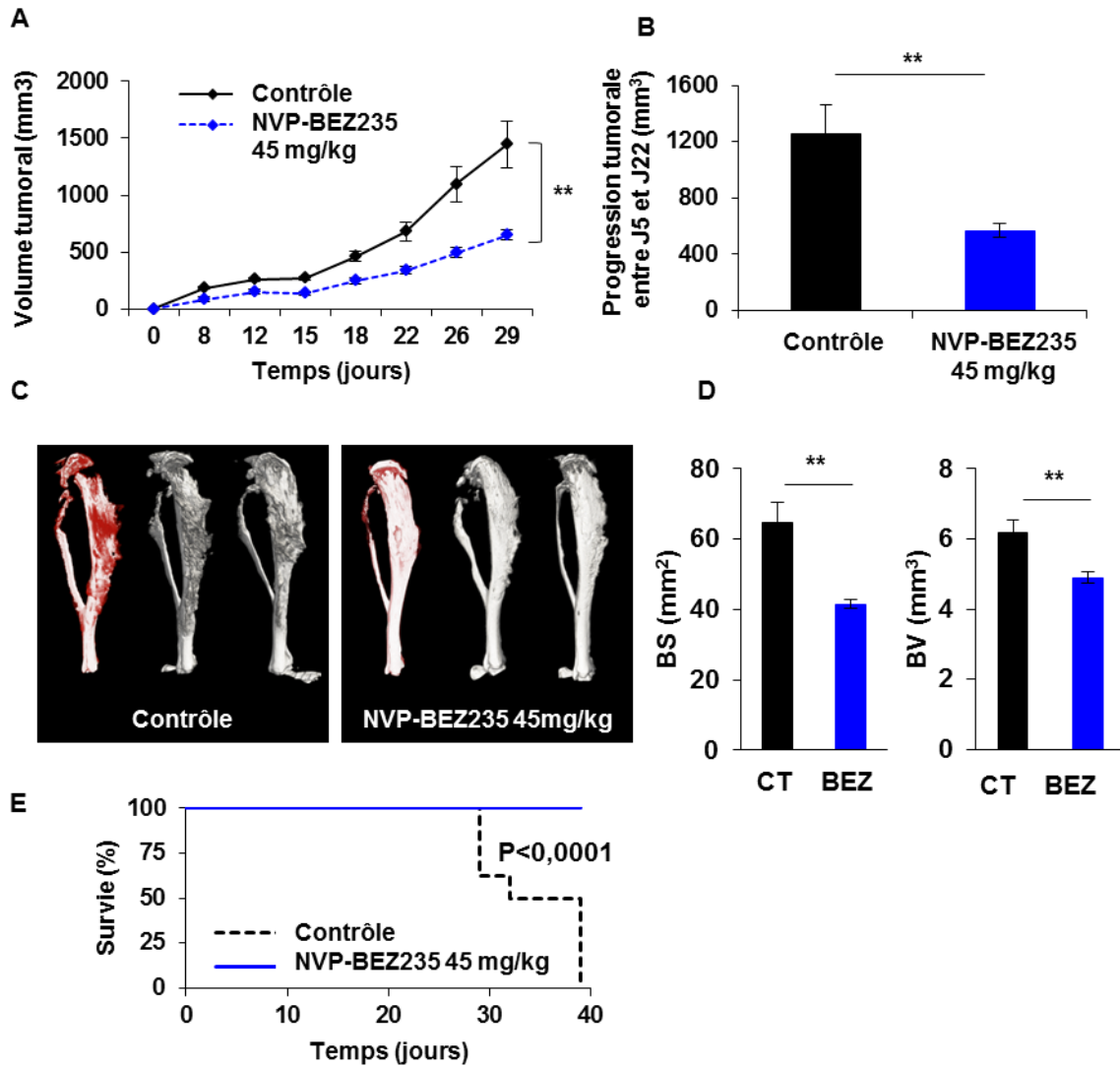


Figure 46 : Le NVP-BEZ235 a un effet anti-tumoral dans un modèle xénogénique murin d'ostéosarcome. Deux millions de cellules HOS ont été injectés en site para-tibial chez la souris Nude-NMRI (n=8 par groupe). Les souris sont randomisées selon 2 groupes : contrôle ou NVP-BEZ235 45 mg/kg/jour (BEZ). Le traitement débute un jour après l'injection de cellules. Croissance tumorale (A). Progression tumorale entre les jours 5 et 22 (B). Reconstruction en 3D des tibias au contact de la tumeur (*ex-vivo*) ; rouge = os ectopique (C). Analyses de la surface (BS) et du volume (BV) du tibia associé à la masse tumorale, cortical + ectopique (D). Survie des souris (E). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (erreur standard). ** $p < 0,01$.

La reconstruction en 3D des tibias portant la tumeur montre que le NVP-BEZ235 inhibe la formation ectopique osseuse tumorale (Figure 46C). De plus, l'analyse des paramètres BS et BV confirme cette réduction d'os ectopique avec un BS diminuant de $64,9 \pm 5,6 \text{ mm}^2$ à $41,5 \pm 1,2 \text{ mm}^2$ ($p < 0,01$) et un BV diminuant de $6,2 \pm 204 \text{ mm}^3$ à $4,9 \pm 204 \text{ mm}^3$ ($p < 0,01$; Figure 46D). Enfin, le NVP-BEZ235 augmente significativement le taux de survie des animaux (Figure 46E).

Dans un second temps, l'analyse des paramètres morphologiques osseux a été réalisée sur les tibias controlatéraux. Les analyses, et de l'os cortical et de l'os trabéculaire, n'ont révélé aucune différence entre les groupes contrôle et traité (Tableau 16).

(A) Analyse os trabéculaire			(B) Analyse os cortical		
Paramètres	Contrôle	NVP-BEZ235	Paramètres	Contrôle	NVP-BEZ235
TV (mm^3)	$0,64 \pm 0,3$	$0,49 \pm 0,08$	TV (mm^3)	$5,68 \pm 0,28$	$5,89 \pm 0,18$
BV (mm^3)	$0,16 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,02$	BV (mm^3)	$3,97 \pm 0,15$	$4,1 \pm 0,11$
BV/TV (%)	$26,06 \pm 0,93$	$26,05 \pm 1,92$	BV/TV (%)	$70,12 \pm 1,25$	$69,73 \pm 1,36$
TS (mm^2)	$5,65 \pm 0,3$	$4,56 \pm 0,53$	TS (mm^2)	$34,93 \pm 0,90$	$35,50 \pm 1,00$
BS (mm^2)	$5,65 \pm 0,44$	$5,65 \pm 0,81$	BS (mm^2)	$33,98 \pm 0,69$	$34,51 \pm 1,02$
BS/BV (mm^{-1})	$45,04 \pm 1,01$	$46,10 \pm 3,11$	BS/BV (mm^{-1})	$8,60 \pm 0,17$	$8,41 \pm 0,08$
BS/TV (mm^{-1})	$11,72 \pm 0,42$	$11,87 \pm 1,49$	BS/TV (mm^{-1})	$6,04 \pm 0,19$	$5,86 \pm 0,12$
Tb,Th (mm)	$0,08 \pm 0,001$	$0,08 \pm 0,005$	CTh (mm)	$0,33 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,04$
Tb,N (mm^{-1})	$3,56 \pm 0,11$	$3,08 \pm 0,18$			
Tb,Sp (mm)	$0,21 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,05$			

Tableau 16. Le NVP-BEZ235 n'a d'effet ni sur l'os trabéculaire, ni sur l'os cortical des tibias controlatéraux de souris Nude. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. L'analyse des paramètres est réalisée sur des ROI (Region Of Interest) fixes. Paramètres de l'os trabéculaire (A). Paramètres de l'os cortical (B). Abréviations : TV = Tissu Volume ; BV = Bone Volume ; TS = Tissu Surface ; BS = Bone Surface ; Tb.Th = Trabecular Thickness ; Tb.N = Trabecular Number ; Tb.Sp = Trabecular Separation ; C.Th = Corticale Thickness.

C. Effet du BYL719 *in vivo*

Le BYL719 inhibe la progression tumorale, la formation d'os ectopique tumoral et module certains paramètres osseux

Comme démontré précédemment, le BYL719 a un potentiel anti-prolifératif important contre les cellules d'ostéosarcome *in vitro*. Afin d'estimer le pouvoir thérapeutique potentiel du BYL719 dans l'ostéosarcome, l'effet de cet inhibiteur a été testé dans deux modèles précliniques murins. Le premier modèle dans lequel le BYL719 a été étudié est un modèle syngénique murin MOS-J induit chez la souris C575BL/6J (n=6 par groupe ; ostéosarcome ostéoblastique). Les souris sont randomisées en 3 groupes distincts : contrôle (méthylcellulose 0,5 %), BYL719 12,5 mg/kg/jour et BYL719 50 mg/kg/jour. Les traitements par gavage quotidien débutent le jour suivant l'injection de cellules MOS-J. Afin de s'assurer de l'éventuelle survenue d'effets secondaires indésirables, le bien-être des souris est suivi au moins 3 fois par semaine : mesure du poids, comportement, sociabilité, déplacement. Aucun effet toxique n'a été remarqué. Le BYL719 ralentit significativement la croissance tumorale des tumeurs, avec un effet dépendant de la dose (Figure 47A). Ainsi, les volumes tumoraux moyens diminuent de $1977 \pm 75 \text{ mm}^3$ (contrôle) à $1531 \pm 62 \text{ mm}^3$ (12,5 mg/kg/jour) et à $1136 \pm 126 \text{ mm}^3$ (50 mg/kg/jour) soit une diminution de 22,5 % ($p < 0,01$) et de 42,5 % ($p < 0,001$) respectivement, comparé au groupe contrôle. La progression tumorale entre les jours 9 et 22 diminue significativement de $1748 \pm 70 \text{ mm}^3$ (contrôle) à $1287 \pm 57 \text{ mm}^3$ (12,5 mg/kg/jour ; $p < 0,01$) et à $938 \pm 103 \text{ mm}^3$ (50 mg/kg/jour ; $p < 0,001$) (Figure 47B). Les reconstructions en 3D des tibias au contact de la tumeur mettent en évidence une inhibition de la formation osseuse ectopique (Figure 47C), confirmée par l'analyse des paramètres BS et BV, où le BS diminue de $99,7 \pm 5,7 \text{ mm}^2$ à $63,9 \pm 2,3 \text{ mm}^2$ ($p < 0,001$) et le BV de $7,1 \pm 0,6 \text{ mm}^3$ à $4,4 \pm 0,2 \text{ mm}^3$ ($p < 0,001$),

respectivement pour le contrôle versus le groupe traité par 50 mg/kg/jour de BYL719 (Figure 47D).

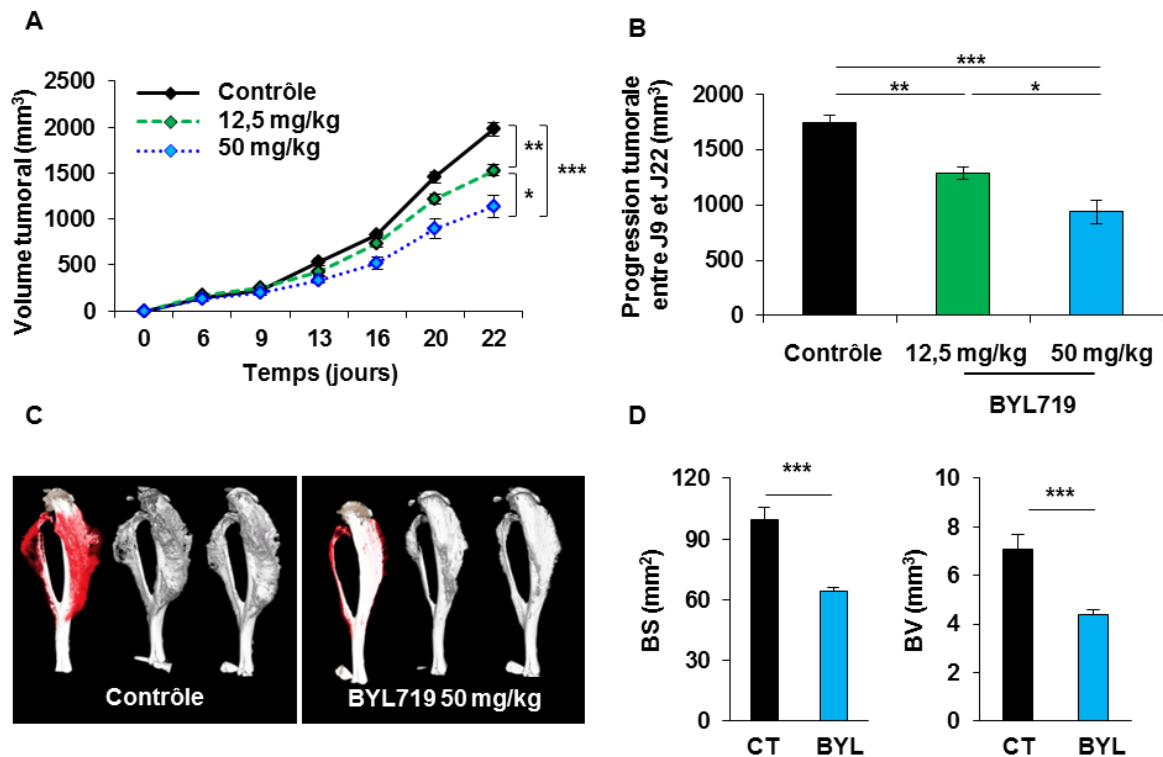


Figure 47 : Le BYL719 a un effet anti-tumoral dans un modèle syngénique murin d'ostéosarcome. Les cellules MOS-J (1 million) ont été injectées en site para-tibial chez la souris C57BL/6J (n=6 par groupe). Les souris sont randomisées selon 3 groupes : contrôle, BYL719 12,5 mg/kg/jour et BYL719 50 mg/kg/jour (BYL). Le traitement débute un jour après l'injection des cellules. Croissance tumorale (A). Progression tumorale entre les jours 9 et 22 (B). Reconstruction en 3D des tibias au contact de la tumeur (*ex-vivo*) ; rouge = os ectopique (C). Analyses de la surface (BS) et du volume (BV) de l'os en contact de la masse tumorale, cortical + ectopique (D). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (erreur standard). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Enfin, une analyse histologique a été réalisée sur les pièces tumorales ; le BYL719 diminue significativement le nombre de cellules en prolifération, révélé par une diminution du marquage Ki67. De plus, le BYL719 diminue l'angiogenèse tumorale, mis en évidence par une réduction du marquage CD31 et CD146 (cellules endothéliales et péricytes) (Figure 48).

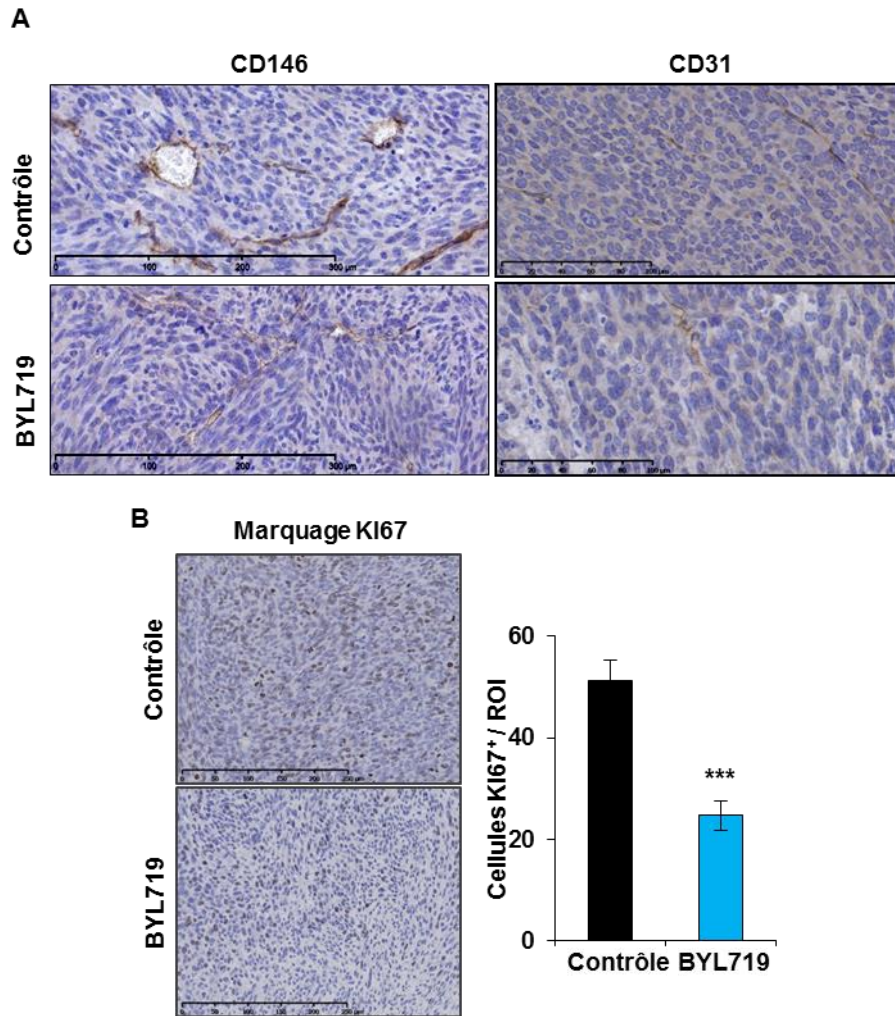


Figure 48 : le BYL719 diminue la vascularisation et la prolifération des cellules d'ostéosarcome MOS-J *in vivo*. La vascularisation est observée par des marquages immunohistochimiques des cellules endothéliales (CD31) et des péricytes (CD146) sur des coupes en paraffine de 3 μ m (A). La prolifération est observée par un marquage immunohistochimique Ki67 (B). *** $p < 0,001$.

En parallèle, l'analyse histomorphométrique des tibias controlatéraux a été réalisée afin de rechercher un effet systémique du BYL719 sur l'os trabéculaire et cortical (Tableau 17). L'analyse des paramètres morphologiques de l'os trabéculaire n'a montré aucun effet du BYL719. Cependant, l'analyse des paramètres corticaux a mis en évidence une atteinte du remodelage osseux. En effet, le BYL719 diminue les paramètres suivants : TV, BV, BV/TV et C.Th ($p < 0,01$) ; et augmente les ratios BS/BV et BS/TV ($p < 0,001$). De plus, si 50 mg/kg/jour de BYL719 ne modifie pas le nombre de cellules Ostérix⁺, cette même dose diminue significativement le pourcentage de marquage TRAP⁺ (Figure 49).

(A) Analyse os trabéculaire		
Paramètres	Contrôle	BYL719
TV (mm ³)	0,74 ± 0,08	0,82 ± 0,10
BV (mm ³)	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,02
BV/TV (%)	27,53 ± 1,11	27,11 ± 1,23
TS (mm ²)	6,33 ± 0,35	7,10 ± 0,57
BS (mm ²)	10,55 ± 0,90	11,83 ± 1,19
BS/BV (mm ⁻¹)	52,89 ± 0,89	54,39 ± 1,42
BS/TV (mm ⁻¹)	14,52 ± 0,47	14,64 ± 0,41
Tb,Th (mm)	0,07 ± 0,002	0,07 ± 0,002
Tb,N (mm ⁻¹)	3,85 ± 0,12	3,82 ± 0,12
Tb,Sp (mm)	0,14 ± 0,004	0,15 ± 0,004

(B) Analyse os cortical		
Paramètres	Contrôle	BYL719
TV (mm ³)	7,33 ± 0,18	6,59 ± 0,13**
BV (mm ³)	5,04 ± 0,17	4,36 ± 0,12**
BV/TV (%)	68,69 ± 0,57	66,02 ± 0,59**
TS (mm ²)	55,72 ± 0,59	55,28 ± 0,48
BS (mm ²)	57,85 ± 1,07	57,39 ± 0,68
BS/BV (mm ⁻¹)	11,52 ± 0,20	13,22 ± 0,33***
BS/TV (mm ⁻¹)	7,91 ± 0,08	8,72 ± 0,14***
C.Th (mm)	0,24 ± 0,01	0,21 ± 0,004**

Tableau 17. Le BYL719 systémique ne module pas les paramètres trabéculaires mais module les paramètres corticaux du tibia sans tumeur des souris C57BL/6J traitées. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. L'analyse des paramètres est réalisée sur des ROI (Region of Interest) fixes. Paramètres de l'os trabéculaire (A). Paramètres de l'os cortical (B). Abréviations : TV = Tissu Volume ; BV = Bone Volume ; TS = Tissu Surface ; BS = Bone Surface ; Tb.Th = Trabecular Thickness ; Tb.N = Trabecular Number ; Tb.Sp = Trabecular Separation ; C.Th = Cortical Thickness. ** p<0,01 ; *** p<,001.

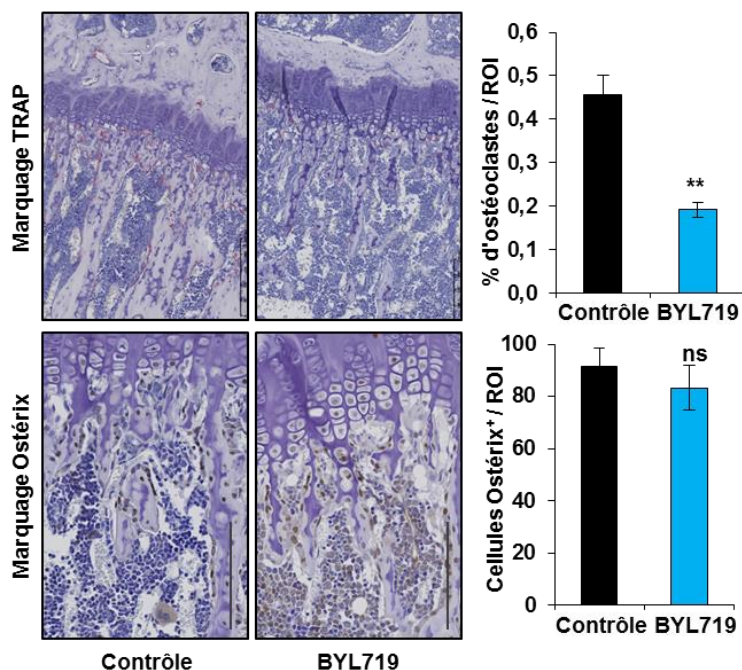


Figure 49 : Le BYL719 diminue le nombre d'ostéoclastes sans affecter le nombre de cellules Ostérix⁺ du tibia sans tumeur des animaux traités. Marquage histoenzymatique TRAP et immunohistochimique Ostérix sur des coupes en paraffine de 3 µm. Pour TRAP, les résultats représentent une quantification du marquage positif rapporté à la quantité d'os (Image J) et sont exprimés en moyenne ± écart-type. Pour Ostérix, les résultats représentent le nombre de cellules positives comptées dans 3 ROI (Region Of Interest) de taille fixe par coupe et sont exprimés en moyenne ± écart-type. ** p<0,01 ; ns = non significatif.

L'effet du BYL719 a également été testé dans un second modèle murin xénogénique. Les tumeurs HOS sont induites en site paratibial chez des souris Nude-NMRI immunodéficientes. Cinquante mg/kg de BYL719 ont été administrés quotidiennement par gavage. Comme constaté dans le premier modèle murin, le BYL719 diminue significativement la croissance tumorale de $1445 \pm 209 \text{ mm}^3$ à $651 \pm 44 \text{ mm}^3$ soit une diminution de 55 % ($p < 0,01$; Figure 50A). De plus, la progression tumorale calculée entre les jours 9 et 22 diminue de $1260 \pm 204 \text{ mm}^3$ à $561 \pm 38 \text{ mm}^3$ dans le groupe traité ($p < 0,01$; Figure 50B). Le BYL719 inhibe la formation d'os ectopique (Figure 50C), confirmée par une diminution des paramètres histomorphométriques de l'os cortical + ectopique : le BS diminue de $64,9 \pm 5,2 \text{ mm}^2$ à $36,4 \pm 0,6 \text{ mm}^2$ et le BV diminue de $6,2 \pm 0,7 \text{ mm}^3$ à $4,0 \pm 0,1 \text{ mm}^3$ dans le groupe traité ($p < 0,001$; Figure 50D).

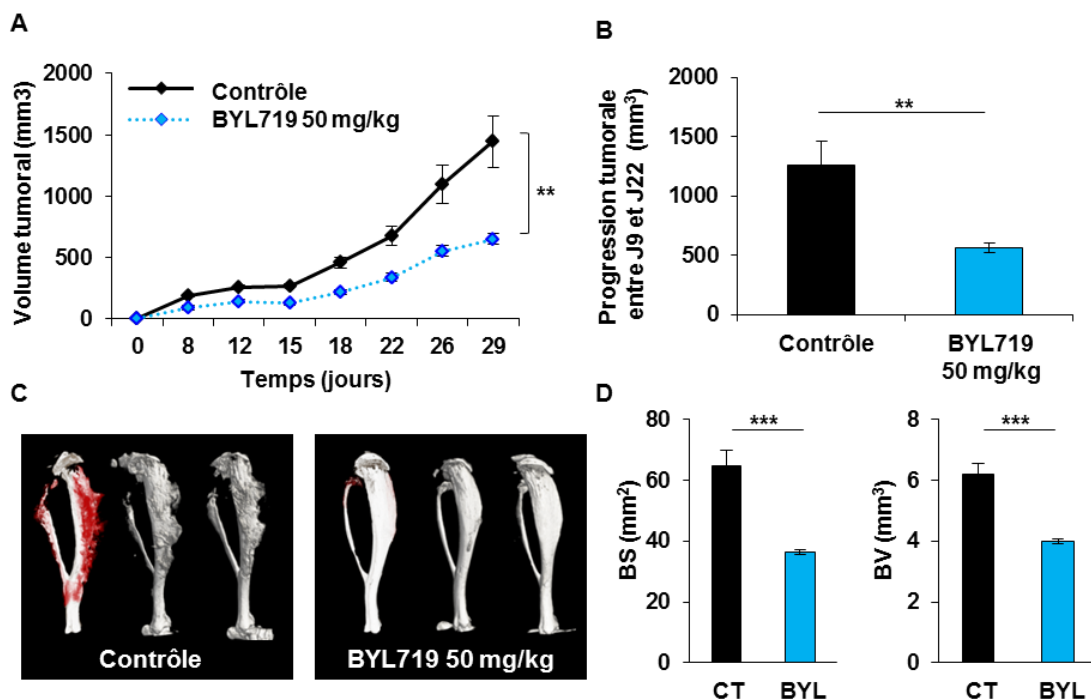


Figure 50 . Le BYL719 a un effet anti-tumoral dans un modèle xénogénique murin d'ostéosarcome. Deux millions de cellules HOS ont été injectés en site para-tibial chez la souris Nude-NMRI ($n=8$ par groupe). Les souris sont randomisées selon 2 groupes : contrôle ou BYL719 50 mg/kg/jour (BYL). Le traitement débute un jour après l'injection de cellules. Croissance tumorale (A). Progression tumorale entre les jours 9 et 22 (B). Reconstruction en 3D des tibias au contact de la tumeur (*ex-vivo*) ; rouge = os ectopique (C). Analyses de la surface (BS) et du volume (BV) de l'os au contact de la masse tumorale, cortical + ectopique (D). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (erreur standard). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Enfin, l'analyse des paramètres histomorphométriques a confirmé l'effet systémique du BYL719 sur le tibia controlatéral. Dans ce second modèle préclinique, le BYL719 diminue le volume osseux total (BV) et l'épaisseur de l'os cortical ($p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement) et augmente les ratios BS/BV et BS/TV ($p < 0,01$ et $p < 0,05$ respectivement). De plus, le BYL719 induit une augmentation de la surface osseuse trabéculaire ($p < 0,01$) et diminue l'épaisseur des travées ($p < 0,01$) (Tableau 18). Contrairement aux observations chez les souris C57BL/6J, le BYL719 a engendré des effets secondaires dans le modèle xénogénique : augmentation de la soif, perte de poids, augmentation de la glycémie sanguine et prostration.

(A) Analyse os trabéculaire			(B) Analyse os cortical		
Paramètres	Contrôle	BYL719	Paramètres	Contrôle	BYL719
TV (mm ³)	0,59 ± 0,07	0,79 ± 0,06*	TV (mm ³)	5,73 ± 0,26	5,21 ± 0,09
BV (mm ³)	0,15 ± 0,02	0,19 ± 0,01	BV (mm ³)	3,96 ± 0,14	3,52 ± 0,06 *
BV/TV (%)	26,15 ± 0,87	24,04 ± 1,51	BV/TV (%)	69,46 ± 1,33	67,81 ± 1,41
TS (mm ²)	5,29 ± 0,46	7,37 ± 0,43 **	TS (mm ²)	35,52 ± 1,02	35,43 ± 0,72
BS (mm ²)	6,84 ± 0,69	10,13 ± 0,82**	BS (mm ²)	34,49 ± 0,81	34,42 ± 0,82
BS/BV (mm ⁻¹)	45,87 ± 1,01	53,76 ± 1,27***	BS/BV (mm ⁻¹)	8,74 ± 0,21	9,77 ± 0,16 **
BS/TV (mm ⁻¹)	11,99 ± 0,47	12,81 ± 0,57	BS/TV (mm ⁻¹)	6,07 ± 0,18	6,62 ± 0,16 *
Tb,Th (mm)	0,08 ± 0,002	0,07 ± 0,001*	CTh (mm)	0,32 ± 0,01	0,28 ± 0,01 **
Tb,N (mm ⁻¹)	3,22 ± 0,12	3,36 ± 0,16			
Tb,Sp (mm)	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,1			

Tableau 18. Le BYL719 systémique module les paramètres osseux trabéculaires et corticaux des tibias sans tumeur des souris Nude traitées. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. L'analyse des paramètres est réalisée sur des ROI (Region of Interest) fixes. Paramètres de l'os trabéculaire (A). Paramètres de l'os cortical (B). Abréviations : TV = Tissue Volume ; BV = Bone Volume ; TS = Tissue Surface ; BS = Bone Surface ; Tb.Th = Trabecular Thickness ; Tb.N = Trabecular Number ; Tb.Sp = Trabecular Separation ; C.Th = Corticale Thickness. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Intérêt thérapeutique de la combinaison du BYL719 avec un agent de chimiothérapie conventionnelle dans l'ostéosarcome : l'ifosfamide

Dans cette dernière étude *in vivo* dans le modèle syngénique MOS-J chez la souris C57BL/6J, nous avons testé une approche thérapeutique par combinaison de traitement. Les souris ont été randomisées en 4 groupes (n=6 par groupe) : un groupe contrôle, un groupe ifosfamide seul, un groupe BYL719 seul et un groupe BYL719 associé à l'ifosfamide. La dose d'ifosfamide utilisée correspond à une dose n'ayant pas d'impact sur la croissance tumorale : 1 cure de 3 jours (30 mg/kg/jour) pendant la première semaine après l'induction tumorale (Figure 51A). Comparé au groupe contrôle ($1810 \pm 123 \text{ mm}^3$), l'ifosfamide seul n'a pas d'effet sur la croissance tumorale ($1747 \pm 99 \text{ mm}^3$) et le BYL719 seul diminue significativement la croissance tumorale ($p < 0,05$; $1422 \pm 65 \text{ mm}^3$). L'association du BYL719 avec de l'ifosfamide diminue significativement la croissance tumorale ($1012 \pm 77 \text{ mm}^3$) comparé, et au contrôle ($p < 0,001$) et au BYL719 seul ($p < 0,05$; Figure 51B). La progression tumorale calculée entre les jours 6 et 22 confirme l'effet anti-tumoral de l'association du BYL719 à l'ifosfamide ($1553 \pm 119 \text{ mm}^3$, $1488 \pm 95 \text{ mm}^3$, $1077 \pm 68 \text{ mm}^3$ et $810 \pm 73 \text{ mm}^3$ respectivement pour contrôle, ifosfamide, BYL719 et association BYL719/ifosfamide ; Figure 51C). La reconstruction 3D des tibias en contact avec la tumeur ne révèle pas d'effet additif de la combinaison de traitements comparée au BYL719 seul (Figure 51D), et ceci est confirmé par l'analyse morphologique de l'os cortical et ectopique tumoral où les BS et BV sont similaires entre ces 2 groupes (Figure 51E). Ainsi, l'association d'un agent de chimiothérapie conventionnelle dans l'ostéosarcome, l'ifosfamide, avec le BYL719 a un effet anti-tumoral synergique dans ce modèle xénogénique : la combinaison d'un agent chimiothérapeutique au BYL719 possède un avantage thérapeutique dans l'ostéosarcome au niveau du ralentissement de la croissance tumorale.

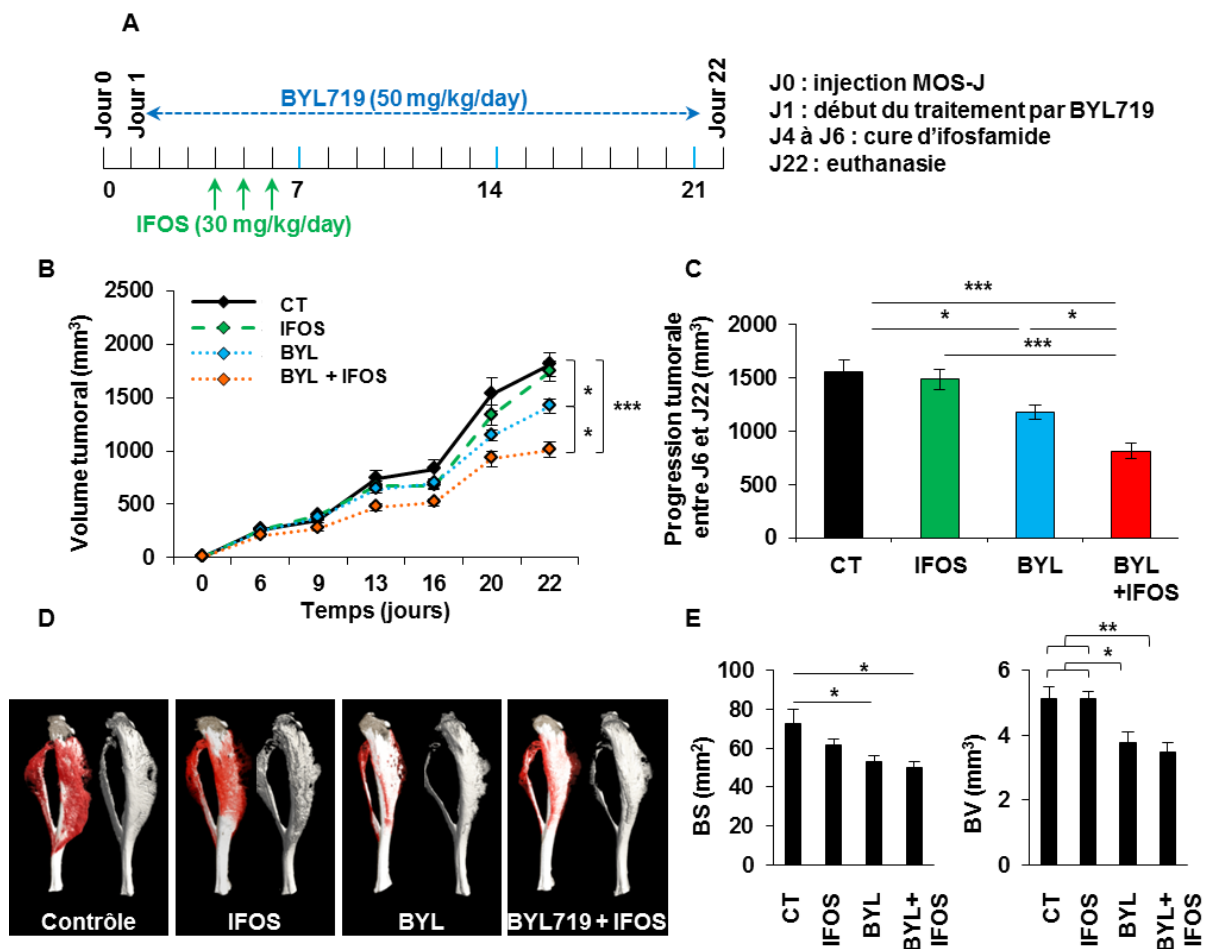


Figure 51 : Effet anti-tumoral synergique de la combinaison du BYL719 avec l'ifosfamidine dans un modèle syngénique murin d'ostéosarcome. Les cellules MOS-J (1 million) ont été injectées en site para-tibial chez la souris C57BL/6J (n=6 par groupe). Les souris sont randomisées selon 4 groupes : contrôle (CT), ifosfamidine 1 cure de 30 mg/kg pendant 3 jours (IFOS), BYL719 50 mg/kg/jour (BYL) et la combinaison BYL719 + ifosfamidine (BYL + IFOS). Le traitement débute un jour après l'injection des cellules. Protocole d'administration des molécules d'intérêt (A). Le BYL719 est administré tous les jours par gavage, une seule cure d'ifosfamidine est administrée en injection intra-péritonéale (J4 à J6, 1 fois par jour). (B) Croissance tumorale (B). Progression tumorale entre les jours 6 et 22 (C). Reconstruction en 3D des tibias au contact de la tumeur (*ex-vivo*) ; rouge = os ectopique (D). Analyses de la surface (BS) et du volume (BV) de l'os cortical + ectopique (E). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (erreur standard). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

D. Effet *in vitro* du BYL719 sur les cellules osseuses

Le BYL719 inhibe la survie des cellules souches mésenchymateuses (CSM) et la différenciation ostéoblastique

Afin de mieux comprendre l'effet du BYL719 sur les CSM humaines, un test de viabilité XTT a été réalisé après 72 h de traitement par des doses croissantes de BYL719 (0 à 50 μM). Le BYL719 diminue la viabilité des CSM humaines, avec un IC_{50} de 8 μM et un IC_{90} de 38 μM (Figure 52A). De plus, l'effet du BYL719 a été testé dans une expérimentation d'ostéoblastogenèse, avec une coloration au rouge alizarine en point terminal pour quantifier la minéralisation. En concordance avec la diminution de prolifération des précurseurs ostéoblastiques, le BYL719 diminue la minéralisation de façon dépendante de la dose (Figure 52B). Deux marqueurs ostéoblastiques ont été détectés par RT-qPCR, *RUNX2* et la phosphatase alcaline (*ALP*; Figure 52C). Comparés au contrôle de différenciation, les résultats montrent qu'en présence de 5 μM de BYL719, l'expression de *RUNX2* est doublée (J8 où J = jour) et celle de l'*ALP* est multiplié par 5 (J11) ; Notons que J0 correspond à l'ensemencement des cellules et J3 correspond au premier changement de milieu par un milieu ostéogénique, en présence ou non de BYL719. A temps tardif (J21), 5 μM de BYL719 diminue l'*ALP* par 3 comparé au contrôle de différenciation (diminution par 2 à 1,5 μM). En résumé, au début du processus de différenciation, le BYL719 induit les marqueurs ostéoblastiques puis les diminue à des temps plus long.

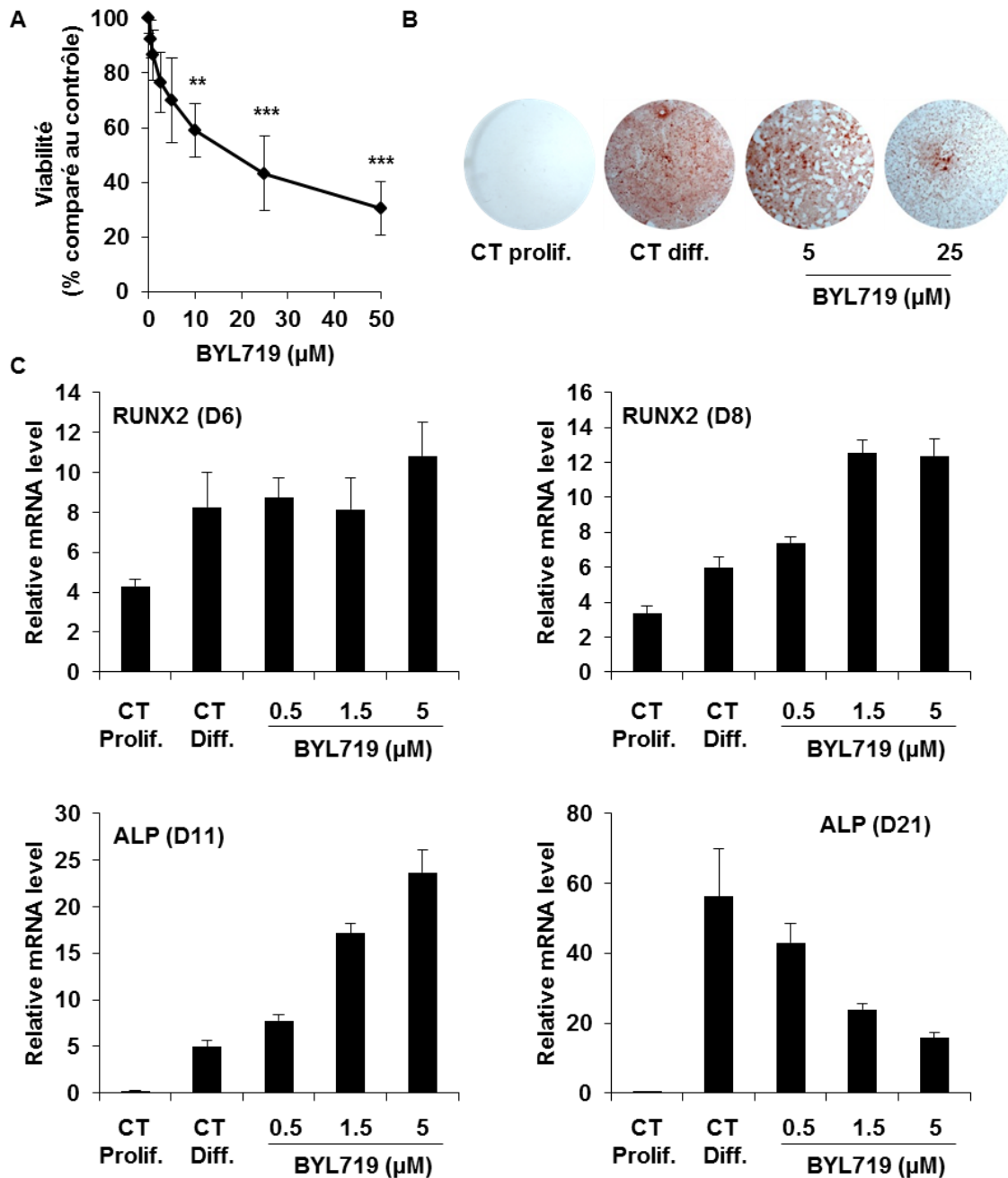


Figure 52 . Le BYL719 inhibe la prolifération de cellules souches mésenchymateuses (CSM) et module leur différenciation et leur minéralisation. Les CSM sont traitées pendant 72 h avec des doses croissantes de BYL719 puis un test XTT est réalisé (A). Les cellules sont cultivées pendant 21 jours en milieu de prolifération (CT prolif.) ou en milieu de différenciation (CT diff.) en présence ou non de BYL719. La minéralisation est mise en évidence par une coloration au rouge alizarine (B). Expression de marqueurs ostéoblastiques (RUNX2 et phosphatase alcaline ou ALP) par RT-qPCR (C). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

Le BYL719 est un inhibiteur de l'ostéoclastogenèse

L'effet du BYL719 a également été étudié sur les monocytes/ostéoclastes. Les cellules CD14⁺ ont étéensemencées à J=0 (J=jour) en présence de M-CSF puis le RANKL et/ou le BYL719 sont ajoutés à partir de J3 et pendant toute l'expérimentation d'ostéoclastogenèse. Après 14 jours de culture, un marquage TRAP est réalisé puis les ostéoclastes sont comptés manuellement. Le BYL719 inhibe de manière dépendante de la dose l'ostéoclastogenèse (Figure 53A). Afin de déterminer si cette inhibition est due à une inhibition de viabilité des monocytes et/ou des ostéoclastes matures, des tests de viabilité au XTT ont été réalisés après 3 jours de culture en présence de BYL719. Les résultats mettent en évidence une diminution de la viabilité des monocytes ainsi qu'une diminution de la viabilité des ostéoclastes matures (Figures 53B et 53C). L'étude des marqueurs ostéoclastiques par RT-qPCR (*NFATC1*, *MMP-9*, *CATHK* et *TRAP*; J5/J6) a été effectuée en présence de RANKL et de concentrations de BYL719 allant de 0,5 à 5 µM (Figure 53D). A 5 µM, le BYL719 diminue *NFATC1* par 2, diminue *MMP-9*, augmente *CATHK* par 1,5 et augmente *TRAP* par 3,5 comparativement au contrôle positif. Enfin, une observation de pastilles de dentine au MEB a mis en évidence que 5 µM de BYL719 diminuent légèrement l'activité de résorption des ostéoclastes matures (Figure 53E). Ces résultats montrent que le BYL719 inhibe la viabilité des précurseurs ostéoclastiques ainsi que des ostéoclastes matures. Cependant, les résultats montrent également que les ostéoclastes « résistant » au BYL719 sont toujours fonctionnels.

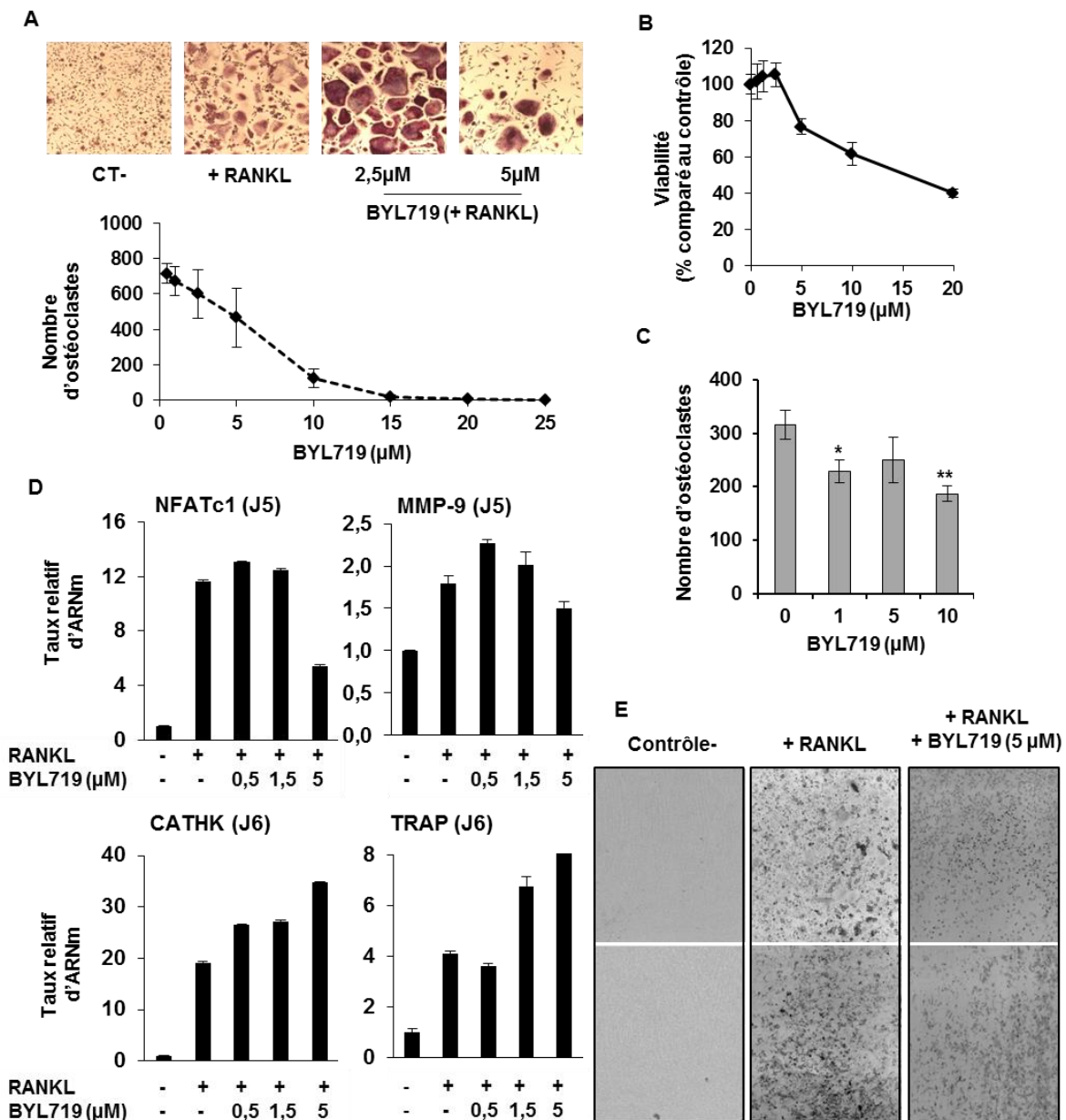


Figure 53 : Le BYL719 inhibe l'ostéoclastogenèse, la viabilité des monocytes mais n'affecte que légèrement l'activité ostéoclastique. Les monocytes humains CD14⁺ sont mis en culture en présence de hM-CSF (25 ng/ml), de hRANKL (100 ng/ml) et de doses croissantes de BYL719 (1 à 25 µM). Suite à une coloration des cellules TRAP⁺, les cellules colorées ayant plus de 3 noyaux sont comptées manuellement (A). Survie des monocytes CD14⁺ (B) et des ostéoclastes matures (C) en présence de BYL719 pendant 72 h (absence de hRANKL), la viabilité cellulaire est caractérisée par un test XTT. Expression des marqueurs ostéoclastiques *NFATc1*, *MMP-9*, *CATHK* et *TRAP* en présence de RANKL (100 ng/ml) et de doses croissantes de BYL719 (D). Test d'activité des ostéoclastes sur pastilles de dentine. Les monocytes CD14⁺ sont cultivés sur les pastilles de dentine en présence de hM-CSF et de RANKL avec ou sans 5 µM de BYL719. Images au MEB des lacunes de résorption (E). * p<0,05 ; ** p<0,01. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type.

III. Discussion et perspectives

La voie de signalisation PI3K est indispensable pour les cellules, du stade embryonnaire le plus précoce au stade cellulaire le plus différencié. Ces dernières années, l'activation et la dérégulation de la voie PI3K est apparue comme incontournable dans la survenue, la croissance et la dissémination métastatique des cancers, y compris dans l'ostéosarcome. Dans ce contexte, notre étude a porté sur le potentiel thérapeutique d'inhibiteurs de la voie PI3K. Dans un premier temps, l'effet du NVP-BEZ235, inhibiteur des isoformes de PI3K et de mTORC1 et mTORC2 a été étudié dans l'ostéosarcome. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux effets du BYL719 dans l'ostéosarcome et sur la physiologie osseuse.

Dans l'ostéosarcome, le NVP-BEZ235 et le BYL719 inhibent la prolifération cellulaire en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phases G₀/G₁, n'induisent pas la mort cellulaire et inhibent la migration *in vitro*. Le NVP-BEZ235 et le BYL719 sont donc à considérer comme des inhibiteurs cytostatiques dans l'ostéosarcome. *In vivo*, le NVP-BEZ235 et le BYL719 ralentissent la croissance tumorale, diminuent la formation d'os ectopique tumoral (diminution du volume et de la surface osseuse), diminuent la prolifération tumorale (diminution du marquage Ki67) et inhibent la formation vasculaire (diminution des marquages CD31 et CD146). De plus, nous avons montré l'intérêt d'associer le BYL719 et un agent de chimiothérapie conventionnelle de l'ostéosarcome dans un modèle syngénique : la combinaison montre un effet anti-tumoral synergique. Ce travail montre l'intérêt de cibler la voie PI3K dans l'ostéosarcome. Ajouté à leur capacité anti-tumorale directe sur la tumeur, les 2 inhibiteurs testés permettent de cibler l'angiogenèse tumorale.

Dans les cellules cancéreuses, l'activation de PI3K par des facteurs de croissances, dont l'insuline, induit la production de HIF-1 α , qui à son tour augmente la production de

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Lorsque le VEGF est sécrété, une rupture de l'équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques se crée et va induire le recrutement, la prolifération et la survie des cellules endothéliales (Yuan et al., 2008), ce qui conduit à l'angiogenèse. De plus, l'angiogenèse tumorale va être un facteur important dans la dissémination métastatique. Dans l'ostéosarcome, plusieurs études ont rapporté que le VEGF est surexprimé. Une méta-analyse sur 8 études portant sur le VEGF dans l'ostéosarcome a révélé que la surexpression du VEGF corrèle avec un mauvais pronostic (Yu et al., 2013). Une seconde méta-analyse sur 559 ostéosarcomes aboutit à une conclusion similaire : comparés aux patients exprimant faiblement le VEGF, les forts taux de VEGF corrélaient avec une faible survie globale (Chen et al., 2013). Le VEGF serait donc un bon marqueur de pronostic. De plus, une étude *in vitro* a montré que le surnageant de cellules d'ostéosarcome induit la prolifération des cellules endothéliales (De Nigris et al., 2012). De façon intéressante, l'expression du VEGF ainsi que sa signalisation VEGF/VEGFR passe par PI3K (Gerber et al., 1998 ; Xia et al., 2006 ; Jiang et al., 2009). VEGFR2 est le récepteur principal impliqué dans l'angiogenèse car il régule la migration, la prolifération, la différenciation et la survie des cellules endothéliales, ainsi que la perméabilité et la dilatation des vaisseaux (Cébe-Suarez et al., 2006). Ainsi, lorsque l'inhibiteur est délivré par voie endocrine dans la tumeur, il pourrait avoir à la fois un effet direct sur la tumeur mais aussi sur les micro-vaisseaux tumoraux en inhibant la production de VEGF tumoral et en agissant directement sur les cellules endothéliales (inhibition de la migration, prolifération et survie). Il semblerait que seule l'inhibition de la sous-unité p110 α de PI3K soit nécessaire pour inhiber *in vivo* l'angiogenèse, étant donné que les cibles respectives du NVP-BEZ235 et du BYL719. D'autres hypothèses peuvent se tourner vers les 2 autres processus angiogéniques contrôlés par PI3K : l'axe angiotensine-Tie 2 et l'axe VE-cadhérine (Graupera et Potente, 2013). Quoi qu'il en soit, cette inhibition de l'angiogenèse par le NVP-BEZ235 et par le

BYL719 peut se montrer bénéfique dans la réduction de la croissance tumorale, mais probablement aussi dans la dissémination métastatique.

Le NVP-BEZ235 et le BYL719 sont des molécules cytostatiques, l'utilisation de ces molécules en association avec d'autres agents semble donc envisageable. Parmi les combinaisons de traitement possibles, nous avons montré que l'association du BYL719 à un agent de chimiothérapie conventionnelle dans l'ostéosarcome a un effet anti-tumoral synergique. Le traitement actuel de l'ostéosarcome repose sur une polychimiothérapie associée à une exérèse de la tumeur. Malheureusement, dans de nombreux cas, les patients ne répondent pas à la chimiothérapie ou montrent des signes des résistances aux traitements. Dans le cancer de la prostate, une équipe a montré que le NVP-BEZ235 permet de radiosensibiliser la tumeur (Zhu et al., 2013). Une seconde équipe a montré une sensibilisation du glioblastome par le NVP-BEZ235 (Kuger et al., 2013). Le mécanisme d'induction de sensibilité reste néanmoins controversé : inhibition de l'autophagie, inhibition de l'angiogenèse, le NVP-BEZ235 pourrait être un inhibiteur d'autres protéines appartenant aux PIKK (PI3K Related Kinase) : ATM et DNA-PK (Mukherjee et al., 2012). L'ostéosarcome est connu pour sa radiorésistance ; il serait intéressant de connaître le pouvoir de sensibilisation de ces molécules à la radiothérapie dans l'ostéosarcome. L'utilisation du LY294002 dans des cellules d'ostéosarcomes résistantes au cisplatine permet leur sensibilisation au cisplatine (Wang et al., 2012). De plus, la surexpression du miR-221, ciblant *PTEN* et par conséquent abolissant la déphosphorylation du PIP_3 , ce qui par conséquent induit l'activité de PI3K, induit également une résistance au cisplatine (Zhao et al., 2013). Le NVP-BEZ235 a également permis de contourner la résistance induite par le récepteur à l'HGF de cellules cancéreuses du poumon mutantes pour EGFR à l'erlotinib (Sano et al., 2013). L'activation de la voie PI3K permettrait donc la survenue de résistance à la chimiothérapie et son inhibition entrainerait une (re)sensibilisation.

La mise en place et la prolifération de l'ostéosarcome reposent sur l'hypothèse de l'existence d'un cercle vicieux, impliquant les cellules tumorales, les ostéoblastes/cellules stromales ainsi que les ostéoclastes/monocytes. Les cellules osseuses présentent une fonction déterminante dans ce cercle vicieux vis-à-vis de la prolifération de la tumeur. En effet, les cellules tumorales sécrètent des facteurs qui vont activer la résorption osseuse directement en stimulant les ostéoclastes, ou indirectement en stimulant les ostéoblastes qui vont alors stimuler les ostéoclastes, notamment via RANKL. La résorption va alors permettre le relargage de facteurs de croissance qui vont induire en retour la prolifération tumorale et ainsi de suite jusqu'à l'envahissement complet de la moelle osseuse et des tissus mous environnants. Dans ce contexte, l'étude des effets du NVP-BEZ235 et du BYL719 sur les cellules osseuses nous est parue intéressante. PI3K/AKT et PTEN sont critiques dans le développement du squelette et dans le remodelage osseux. La perte de p110 α et p110 β est létal au stade embryonnaire (Zhao et al., 2006 ; Bi et al., 2002). Les souris déficientes pour AKT1 ont des os plus courts et un retard de formation des centres d'ossifications secondaires (Ulici et al., 2009). Les souris déficientes conditionnel pour PTEN sont caractérisées par une augmentation de la masse osseuse (Zhang et al., 2002) et une diminution de l'apoptose des ostéoblastes avec une augmentation de la phosphorylation de mTOR (Liu et al., 2007). Dans les cellules osseuses, les isoformes p110 α et p110 β sont majoritairement exprimés (Grey et al., 2010).

Une étude de 2010 sur des cellules souches mésenchymateuses montre que le NVP-BEZ235 (10 à 25 nM) induit la différenciation et minéralisation ostéoblastique, avec une induction de gènes de transcription spécifiques dont *RUNX2*, une augmentation de marqueurs spécifiques (dont ALP, ostéocalcine et ostéopontine) ainsi que des facteurs de croissance ostéogéniques (dont BMP-2, BMP-6, TGF β 1 et TGF β 2) mais également de Noggin, inhibiteur de certaines BMP, dont les BMP-2 et BMP-4 (Martin et al., 2010 ;

Krause et al., 2011). A des concentrations plus élevées, le NVP-BEZ235 exerce son effet cytostatique et induit une diminution de prolifération des cellules souches mésenchymateuses. De plus, leur équipe a montré que cet effet anabolique était dû majoritairement à l'inhibition de mTORC1 et de mTORC2, par une technique de shRNA dirigé contre mTOR (Martin et al., 2010). Cette étude montre donc que le NVP-BEZ235 a un double effet en fonction de sa concentration, et que mTOR est un régulateur négatif important de la différenciation ostéoblastique *in vitro*, bien que PI3K le soit également mais en proportion moindre (effet ostéogénique du NVP-BEZ235 200 à 500 fois supérieur à celui du LY294002, inhibiteur pan-PI3K). *In vivo*, une étude récente a montré que le NVP-BEZ235 diminue le BV/TV trabéculaire fémoral, le volume osseux cortical (BV) ainsi que le poids des animaux après 34 jours de traitement à 10 mg/kg/jour (Smith et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs ont testé un deuxième inhibiteur « dual-PI3K/mTOR », le PI-103, qui montre un effet similaire au NVP-BEZ235, c'est à dire une diminution du BV/TV trabéculaire sans changement du BV cortical *in vivo*. L'effet du NVP-BEZ235 *in vitro* sur l'ostéoclastogénèse n'a pas été déterminé ; cependant, le PI-103 *in vitro* sur des cellules de la moelle osseuse augmente fortement le nombre de cellules TRAP⁺ et diminue l'activité de résorption (Grey et al., 2010). Nos résultats *in vivo* sont en concordance avec les résultats *in vivo* de l'équipe de Smith : chez la C57BL/6J, le NVP-BEZ235 diminue l'épaisseur de la corticale bien qu'il n'ait pas d'effet sur l'os trabéculaire ; le NVP-BEZ235 augmente les ostéoclastes TRAP⁺ et diminuent les cellules Ostérix⁺. Cette ostéopénie pourrait reposer sur un déséquilibre entre BMP et inhibiteurs de BMP dont Noggin. En effet, deux modèles animaux ayant une surexpression de Noggin ou une délétion de Noggin (sous la dépendance du promoteur de l'ostéocalcine dans les 2 expérimentations) présentent une ostéopénie pendant les 3 premiers mois de leur vie avec une diminution de la formation osseuse (Devlin

et al., 2003; Canalis et al., 2012). De nouvelles études seront nécessaires afin de mieux comprendre les effets du NVP-BEZ235 sur la physiologie osseuse.

Nous avons montré par l'analyse microscanner que le BYL719 a un effet catabolique sur l'os cortical des souris C57BL/6J et Nude-NMRI, et un effet anabolique sur l'os trabéculaire des souris Nude-NMRI. De plus, l'analyse histologique de marqueurs spécifiques au niveau de la plaque de croissance/os trabéculaire montre que le BYL719 diminue le nombre d'ostéoclastes et n'a pas d'effet sur les ostéoblastes. PI3K est important dans la résorption osseuse. En effet, l'inhibition de PI3K dans l'ostéoclaste inhibe leur migration, empêche la mise en place de sa bordure en brosse, perturbe le cytosquelette d'actine et inhibe le trafic vésiculaire indispensable au transport d'enzymes actives dans la résorption de la matrice extracellulaire (Nakamura et al., 1997 ; Hall et al., 1995). De plus, Grey et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition de p110 α par le PIK-75 (spécifique p110 α) engendre une diminution de l'ostéoclastogénèse des cellules RAW264.7 et des cellules de la moelle osseuses, associé à une diminution de l'activité de résorption (Grey et al., 2010). *In vitro*, l'inhibition de PI3K α par le BYL719 engendre une diminution de l'ostéoclastogénèse, de la viabilité des monocytes et des ostéoclastes matures. Cependant, à 5 μ M, les niveaux de TRAP et de CATHK sont surexprimés à J6 et l'activité de résorption est très peu altérée. Ces résultats pourraient correspondre aux données *in vivo*: à la concentration utilisée *in vivo*, la concentration systémique pourrait diminuer l'ostéoclastogénèse sans pour autant influencer l'activité des ostéoclastes formés et activés. Ceci se traduirait par une activité ostéoclastique présente mais moindre. Au niveau ostéoblastique, l'équipe de Grey a montré que le PIK-75 augmentait la différenciation et la minéralisation. A fortes concentrations, le BYL719 provoque un effet cytotoxique sur les précurseurs ostéoblastiques, révélé par la diminution de viabilité des cellules souches mésenchymateuses et par conséquent une diminution de la minéralisation. A faibles

concentrations, 5 μ M de BYL719 induit l'expression de RUNX2 et de l'ALP aux temps précoces, signe d'engagement vers la différenciation. A temps tardif, l'ALP diminue par rapport au contrôle de différenciation mais reste supérieur au contrôle de prolifération. Ceci peut s'expliquer par un effet dual du BYL719 : le BYL719 inhibe la prolifération des CSM en bloquant la voie PI3K, cependant, selon la dose, le blocage de cette voie oriente les cellules soit vers la différenciation, soit vers une diminution de la survie. Il y a donc des cellules capables de minéraliser, mais en quantité moindre, ce qui se traduit par une diminution de la minéralisation. Lors de l'analyse de l'os trabéculaire, l'effet du BYL719 est apparu différent : le BYL719 n'a pas d'effet chez la souris C57BL/6J mais a un effet anabolique chez la souris Nude-NMRI. Cette différence peut s'expliquer par une différence cruciale entre les 2 espèces : la souris C57BL/6J est immunocompétente alors que la souris Nude-NMRI est immunodéprimée. Il se peut que les cellules immunitaires (lymphocytes T) présentes chez la souris C57BL/6J compensent cette augmentation trabéculaire présente chez la souris Nude-NMRI suite au traitement par le BYL719, notons que le traitement par le NVP-BEZ235 n'induit pas cette augmentation trabéculaire. De plus, le BYL719 induit une hyperglycémie chez la souris Nude-NMRI qui n'est pas observée chez la souris C57BL/6J ; le NVP-BEZ235 n'induit pas cette hyperglycémie. Cet effet secondaire induit par le BYL719 est en accord avec l'importance de p110 α dans le métabolisme glucidique. La délétion de p110 α dans le foie induit une altération de la voie de l'insuline, donc une insulino-résistance, et par conséquent une hyperglycémie et une diminution du poids de l'animal (Sopasakis et al., 2010). Un dernier effet secondaire observé chez la souris Nude-NMRI est une diminution de l'activité voire une prostration. En effet, bien qu'aucune étude n'ait mis en évidence un passage de la barrière hémato-encéphalique par les inhibiteurs de PI3K, des études ont montré des effets neurologiques associés à l'administration LY294002, wortmannin ou

inhibiteur spécifique/dual/pan : immobilité (Bandaru et al., 2010), défaut de la mémoire (Chen et al., 2011), réduction du mouvement diurne (Smith et al., 2013).

Deux inhibiteurs spécifiques de p110 α sont actuellement évalués en phase I : le BYL719 et le GDC-0032, sachant que le GDC-0032 est considéré comme un inhibiteur qui ne cible pas la sous-unité p110 β . Le BYL719 est premier inhibiteur spécifique de p110 α à être entré en clinique. Des conclusions préliminaires chez 25 patients atteints de tumeurs solides avancées (colon, sein) mutées pour *PIK3CA* montrent que le BYL719 (30 à 450 mg/jour) est bien toléré, qu'il montre des signes d'efficacité clinique (1 réponse partielle à 270 mg/jour) et que ses effets secondaires sont gérables : hyperglycémie (33 %), nausée (38 %), diarrhée (29 %), diminution de l'appétit (29 %) (Juric et al., 2012). Sa demi-vie est de 8,5 heures et sa dose maximale tolérée a été déterminée à 400 mg/jour. Une seconde étude chez des patientes atteintes de cancers du sein métastatiques mutés pour *PIK3CA* et positifs pour le récepteur aux estrogènes montre des réponses cliniques intéressantes (Gonzalez-Angulo et al., 2013). D'autres études sont en cours, en association ou non, avec d'autres molécules (AMG 479, anticorps monoclonal contre l'IGF-1R, dans les tumeurs solides avancées). Actuellement, le GDC-0032 est en essai dans 2 études chez des patientes atteintes de cancers du sein avec des mutations de *PIK3CA*. Les études sont en association avec soit du paclitaxel (chimiothérapie) soit une thérapie endocrine (ou hormonale). Un rapport préliminaire chez 34 patientes montre que le GDC-0032 est bien toléré avec des effets secondaires gérables, dont l'hyperglycémie, les nausées ... et montre à ce jour 4 réponses partielles (Gonzalez-Angulo et al., 2013). Le NVP-BEZ235 est actuellement en phase I/II chez des patients atteints de tumeurs solides avancées (dont le cancer du sein, et le carcinome rénal), seul ou en combinaison avec d'autres drogues dont le trastuzumab (anticorps monoclonal contre le récepteur HER2), l'everolimus (RAD001, inhibiteur de mTORC1), le paclitaxel ou MEK162 (inhibiteur de MEK). Des études ont déterminé des doses

maximales tolérées variables selon la forme galénique de la molécule : cachet = 600 mg 2 fois par jour, sachet = 1600 mg/jour (Peyton et al., 2011). En combinaison avec le trastuzumab, la dose maximale tolérée du NVP-BEZ235 est de 600 mg/jour (Krop et al., 2012). Les différentes études montrent que le NVP-BEZ235 est bien toléré et présente une survenue d'effets secondaires modérés dont nausée et diarrhée et des doses limites de toxicité pour la fatigue, l'asthénie et la thrombopénie de grade 3.

Dans notre étude, nous avons montré que le NVP-BEZ235 et le BYL719 possèdent un effet anti-tumoral contre l'ostéosarcome, ainsi que des effets sur les ostéoblastes, les ostéoclastes et les vaisseaux sanguins. L'effet anti-tumoral repose sur une complémentarité d'effets directs sur la prolifération cellulaire tumorale et indirects sur le microenvironnement tumoral. Cette compétence « multi-cible » du NVP-BEZ235 et du BYL719 peut être expliquée par l'expression ubiquitaire de PI3K (p110 α et p110 β) ainsi que de mTORC1 et mTORC2. Néanmoins, nos études *in vivo* possèdent 2 limites majeures. Premièrement, le protocole thérapeutique testé est préventif, donc différent d'une intervention thérapeutique clinique : notre étude devra être réévaluée dans un protocole curatif, débutant lors de la détection tumorale. Deuxièmement, nos modèles murins ne présentant pas de métastases pulmonaires lors de l'autopsie (groupe contrôle), un modèle métastatique devra être envisagé et permettra de savoir l'impact des inhibiteurs sur les métastases. De plus, il paraît intéressant d'administrer nos inhibiteurs chez des animaux sains pendant un période plus longue et/ou pendant la croissance afin de mieux appréhender les effets sur l'os d'un traitement plus long. En clinique, l'administration de ces molécules devrait néanmoins être associée à une surveillance des paramètres osseux, des paramètres glycémiques ainsi que des paramètres psychologiques.

**DISCUSSION GENERALE &
PERSPECTIVES**

Le protocole thérapeutique de l'ostéosarcome repose sur une polychimiothérapie associée à l'exérèse de la pièce tumorale. Cependant, la forte toxicité de la chimiothérapie souvent mal tolérée, la survenue de métastases diminuant le pronostic ainsi que la survenue de résistance aux traitements montrent le caractère urgent de mettre en place de nouveaux axes thérapeutiques dans l'ostéosarcome. Ces dernières années, il est apparu évident que la survenue, la prolifération et la dissémination métastatique des cancers sont basées sur des altérations génétiques complexes, la perte de gènes « suppresseur de tumeur » et l'activation spécifique d'oncogènes responsable du phénotype cellulaire tumoral. Dans l'ostéosarcome, des altérations numériques et structurales de la majorité des chromosomes sont observées dans le type conventionnel (trisomie du chromosome 1, monosomies des chromosomes 9, 10, 13 et 17, perte du bras long du chromosome 6 et réarrangement chromosomiques divers ; Lee et al., 2010). Ces altérations génétiques s'accompagnent de la perte de gènes-clés dont *TP53* et *RB*, mais également d'activation d'oncogènes tels que MDM2 ou c-Fos (Bell et Siegel, 2010). De ces observations a découlé le développement de thérapies ciblées.

Les thérapies ciblées

Dans les années 2000, le concept de « dépendance oncogénique » a fait son apparition (Weinstein, 2002). La dépendance oncogénique est un mécanisme acquis par la cellule tumorale suite à l'activation d'un oncogène et qui permet son échappement aux contrôles de prolifération/mort cellulaires. Ainsi, ce concept met en évidence la possibilité d'altérer la croissance tumorale et sa survie en ciblant et en inactivant un seul oncogène. Par exemple, 80 % des tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) sont dépendantes d'une mutation de l'oncogène c-KIT (Linch et al., 2013). De même, le sarcome d'Ewing est dépendant d'une translocation chromosomique impliquant le gène *EWS* et un gène de la

famille ETS, et plus particulièrement *FLII* dans 85 % des cas (Riggi et Stamenkovic, 2007). L'extinction d'une voie de signalisation cruciale pour ces oncogènes pourrait devenir leur talon d'Achille et par répercussion celui de la cellule tumorale. Les thérapies ciblées reposent sur l'utilisation de drogues ayant une cible membranaire ou intracellulaire spécifique par opposition aux agents de chimiothérapie conventionnelle qui ciblent principalement l'ADN et la tubuline. En effet, les agents de chimiothérapie ciblent directement l'ADN, en inhibant des enzymes de synthèse de purines/thymidines, des enzymes impliquées dans le désenroulement de l'ADN (topoisomérases) ou en formant des ponts intra/inter-brins. En thérapie ciblée, certaines molécules inhibent également l'ADN mais en ciblant des protéines spécifiques clés telles que les protéines chaperonnes (HSP90). Le mode d'action de ces drogues est de cibler les processus d'oncogenèse, la migration et l'invasion cellulaires ainsi que les acteurs du microenvironnement tumoral en modulant la signalisation des cellules tumorales et/ou environnementales. Durant la dernière décennie, ces agents ont pris une place importante dans le marché pharmaceutique et sont répartis en 2 familles majeures : les anticorps monoclonaux et les petites molécules inhibant les activités tyrosine kinase.

Les kinases au sens large sont fortement impliquées dans de nombreux processus cellulaires, physiologiques (prolifération, survie, réorganisation du cytosquelette, adhérence cellulaire, mobilité, angiogenèse et voie de l'insuline/métabolisme du glucose) ou pathologiques. Chez l'homme, il existe un panel de kinases très diversifié dont les récepteurs à activité tyrosine kinase et les protéines tyrosine/sérine/thréonine kinases. Dans les cellules tumorales, de nombreux facteurs de croissance activent les récepteurs tyrosine kinase qui à leur tour déclenchent un réseau complexe de voies de signalisation, dont la voie PI3K. La voie PI3K est souvent activée et contribue à la progression dans le cycle cellulaire, à la résistance à l'apoptose et à l'induction de leur potentiel métastatique (Jiang et Liu, 2009). Dans ce travail de thèse, nous avons montré que des molécules de thérapie ciblées, l'imatinib

mésylate, inhibiteur de plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase, ainsi que le NVP-BEZ235 et le BYL719, deux inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR, ont un effet anti-tumoral *in vitro* et *in vivo*.

La théorie du « Seed & Soil »

Les communications entre les cellules reposent sur l'existence de médiateurs cellulaires, dont les cytokines et les facteurs de croissance. Lorsqu'ils sont sécrétés, ces médiateurs vont alors agir de façon autocrine, paracrine ou juxtacrine en se fixant à leur(s) récepteur(s) spécifique(s). Les facteurs de croissance se lient à des récepteurs à activité tyrosine kinase ou associés à des kinases intracellulaires, déclenchant ainsi un réseau de signalisation intracellulaire dense aboutissant à de nombreux processus biologiques. La théorie de « Graine-Sol » (« Seed & Soil ») de Stephen Paget repose sur une relation de communications étroites entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, mettant en avant l'existence de « niches » (Mendoza et Khanna, 2009). Cette « niche » correspond à un endroit de prédilection pour la tumeur au niveau duquel elle dispose de tout ce dont elle a besoin pour proliférer, survivre et migrer, tout en augmentant sa protection contre le système immunitaire et les agressions thérapeutiques. Dans l'ostéosarcome, ce cercle vicieux met en scène les ostéoblastes, les ostéoclastes, les cellules endothéliales et péricytes (angiogénèse) ainsi que les cellules immunitaires en lien avec le processus inflammatoire. Dans ce modèle, la voie « facteurs de croissance - PI3K/AKT/mTOR » est ancrée dans le réseau complexe de signalisation cellulaire. Les résultats obtenus *in vivo* dans plusieurs modèles d'ostéosarcome ont montré que le NVP-BEZ235 et le BYL719 vont cibler directement la tumeur (cytostatique, diminution de la prolifération, diminution de la production de tissu ostéoïde tumoral) mais aussi l'angiogénèse tumorale [diminution du

marquage CD31 (cellules endothéliales) et CD146 (péricytes)] ainsi que les ostéoblastes/ostéoclastes.

Au-delà d'un certain volume tumoral (quelques mm³ en général), une tumeur doit le plus souvent créer son propre réseau sanguin afin d'optimiser sa croissance puis sa dissémination métastatique. L'activité kinase est fortement impliquée dans le phénomène de néoangiogenèse tumorale, le VEGF permet, par l'activation de la voie PI3K, la prolifération et la survie des cellules endothéliales, leur migration/invasion et la perméabilisation de vaisseaux pré-existants ainsi que l'attraction/implantation des précurseurs circulants au niveau du site tumoral (Yuan et al., 2008). Un stress hypoxique, des facteurs de croissance circulant comme l'IGF-1 ou le PDGF ou certaines cytokines (IL-6 par exemple) peuvent induire la production de VEGF : la sécrétion de VEGF environnemental/tumoral induit un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques appelé « switch angiogénique ». L'ostéosarcome est une tumeur très vascularisée qui surexprime chez de nombreux patients le VEGF (Yu et al., 2013 ; Chen et al., 2013). Ainsi, plusieurs molécules dirigées contre les activités tyrosine kinase dont le sunitinib (VEGFR-1/2, c-KIT, Flt-3, PDGFR α), le sorafenib (VEGFR-2/3, PDGFR α , Flt-3, c-KIT) et le pazopanib (VEGFR1/2/3) ont montré des résultats encourageants *in vitro/in vivo* ainsi qu'en clinique. Par exemple, le sorafenib, utilisé en seconde ou troisième ligne de traitement (ostéosarcomes) dans un essai de phase II incluant des patients âgés d'au moins 14 ans a obtenu 14 % de réponses objectives, dont 3 réponses partielles. Une étude du pazopanib en phase II va débiter en europe chez des patients atteints de sarcomes osseux. Il reste néanmoins à déterminer l'effet de ces inhibiteurs spécifiques sur la dissémination métastatique.

Dans l'ostéosarcome, le rôle des cellules osseuses apparait primordial dans l'optimisation de la croissance tumorale. Ce cercle vicieux entre tumeur et cellules osseuses a été initialement démontré dans les métastases osseuses issues du cancer du sein. Dans ce

contexte, les bisphosphonates sont apparus contre des agents incontournables dans la prise en charge du cancer du sein, aussi bien en tant qu'agent anti-tumoral qu'en tant qu'agent anti-résorption donc important dans l'inhibition des métastases osseuses (Gnant et Clézardin, 2012). L'acide zolédronique est un bisphosphonate de seconde génération ayant montré un intérêt majeur en clinique, y compris dans l'ostéosarcome. Les thérapies ciblant les activités tyrosine kinase montrent également un effet sur les cellules osseuses. En effet, bien que peu d'essais cliniques aient inclus des analyses poussées des paramètres osseux (sanguins et/ou de l'architecture), il a été montré que certains agents ont un impact sur le remodelage osseux. Cependant, la confrontation de résultats obtenus *in vitro/in vivo* ainsi qu'en clinique montre à quel point l'effet de ces agents ciblés est mal compris et que d'autres études sont indispensables. Notre travail, notamment sur le BYL719, illustre ce dernier point. En effet, le BYL719, inhibiteur spécifique de p110 α , diminue la survie des cellules souches mésenchymateuses, des monocytes et des ostéoclastes matures, et diminue l'ostéoblastogenèse et l'ostéoclastogenèse. Cependant, à des concentrations plus faibles (< 5 μ M), le BYL719 induit l'augmentation de marqueurs ostéoblastiques précoces comme l'*ALP* pour ensuite le sous-exprimer à temps tardif. Les analyses microscanner montrent également la complexité du BYL719 sur l'os « sain » des animaux traités où il diminue les ostéoclastes sans modifier le nombre d'ostéoblastes. De plus, le BYL719 ne modifie pas les paramètres osseux trabéculaires mais diminue l'épaisseur de l'os cortical, qui est plus dense. Il semble donc important de mieux comprendre les effets des inhibiteurs des activités kinases sur le remodelage osseux afin de mieux anticiper certains effets additionnels bénéfiques (diminution de la résorption osseuse par exemple) de ces molécules ou au contraire certains effets secondaires indésirables.

Parmi les inhibiteurs ciblés des activités kinases, le RAD001, dérivé de la rapamycine et inhibiteur de mTOR, est une molécule présentant des propriétés immunosuppressives

importantes. En effet, mTOR est important dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes T (Cobbold et al., 2013). So et ses collaborateurs ont récemment publié une étude portant sur l'effet d'inhibiteurs de PI3K, pan-PI3K ou sélectifs de certains isoformes, sur les lymphocytes T et B (So et al., 2013). Leur étude a révélé que les inhibiteurs des isoformes p110 α ou p110 β n'interfèrent pas sur la prolifération et la survie des lymphocytes *in vitro*. De même, leur utilisation *in vivo* à des concentrations ayant un effet anti-tumoral dans des modèles précliniques a montré que ces inhibiteurs n'interfèrent pas avec la réponse lymphocytaire. En revanche, ils ont montré que des inhibiteurs pan-PI3K (GDC-0941) ou spécifique de p110 δ inhibaient fortement la prolifération et la survie des lymphocytes B *in vivo*. Leur étude montre le caractère moins immunosuppresseur des inhibiteurs spécifiques de p110 α et p110 β comparé aux inhibiteurs pan-PI3K. Dans ce contexte, il apparaît important de connaître l'effet des inhibiteurs des activités kinase, induisant une répression de la voie mTOR. Le caractère immunomodulateur des thérapies ciblées est donc à prendre en compte lors de leur utilisation. De plus, il a été montré que le système immunitaire et le remodelage osseux sont en étroite collaboration (Shing et al., 2013). Pour exemple, une souris déficiente en lymphocyte T ou en lymphocyte B a des os ostéoporotiques (Liu et al., 2007). Les avancées sur le lien entre le système immunitaire et le remodelage osseux ont donné naissance à l'ostéoinmunologie.

Phénomènes de résistance aux drogues : place des inhibiteurs des activités kinase

L'enjeu thérapeutique en cancérologie aujourd'hui repose sur un problème majeur : le phénomène de résistance, qu'il soit inné ou acquis, est responsable de l'échappement tumoral, de la dissémination métastatique et/ou de la récurrence tumorale. La résistance innée ou primaire est consécutive à la nature de la tumeur et à son statut protéique et mutationnel

« de base », avant traitement. La résistance acquise ou secondaire se développe en réponse à un traitement, auquel la tumeur est sensible dans un premier temps, puis devient résistante. Parmi ces résistances, le phénomène le plus connu repose sur le mécanisme d'efflux des drogues ou système MDR (Multi Drug Resistance), mettant en jeu des pompes dépendantes de l'énergie fournie par l'ATP ou transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Ces transporteurs membranaires sont surexprimés dans les cellules cancéreuses [P-gp (P-glycoprotein ou ABCB1) et MRP1 (Multidrug Resistance Protein ou ABCC1)] et confèrent la résistance aux agents chimiothérapeutiques. D'autres mécanismes de résistances existent, tels que la vitesse de prolifération tumorale, un système de réparation de l'ADN optimal, l'accessibilité à la tumeur et l'altération de la cible thérapeutique.

Des phénomènes de résistances innées et acquises ont été décrits dans le cas de thérapies ciblées. Prenons par exemple le cas de l'imatinib mésylate dans les GIST. Le récepteur c-KIT peut être sujet à de nombreuses mutations, intervenant principalement dans les exons 9 (domaine extracellulaire), 11 (domaine juxtamembranaire), 13 (domaine kinase 1) et 17 (domaine kinase 2). Dans 80 à 85 % des cas, les GIST possèdent une mutation de c-KIT et principalement dans les exons 9 et 11 (Linch et al., 2013). La réponse thérapeutique des GIST à l'imatinib mésylate dépend de ce statut mutationnel : les mutations de l'exon 11 sont plus sensibles que celles présentes dans l'exon 9 ou dans c-KIT non-muté (Pierrotti et al., 2011), alors que les mutations dans les exons 13 et 17 sont résistantes à l'imatinib mésylate (représentent 1 à 2 % des mutations primaires de c-KIT dans les GIST). Dans une tumeur, le statut mutationnel d'une cible thérapeutique peut donc permettre une anticipation de la réponse thérapeutique dans certains cas.

Cependant, une thérapie ciblée, prolongée dans le temps, peut induire des altérations dans les cellules tumorales et engendrer des résistances secondaires. Pour exemple, un des mécanismes majeurs de résistance acquise à l'imatinib mésylate correspond à l'apparition de

mutations secondaires. Comme dit précédemment, certaines mutations de c-KIT sont prédictibles sensibles ou résistantes à l'imatinib mésylate : l'apparition de mutations dans les exons 13 et 17 sont responsables de cette résistance acquise (Liegl et al., 2008). Le second mécanisme de résistance repose sur la capacité de « switch » des récepteurs à activité tyrosine kinase. Ce phénomène correspond à une compensation de l'extinction d'un signal par une (sur)expression d'un nouveau récepteur qui va alors rétablir ce signal, grâce à la redondance des voies de signalisation. Dans les GIST, la surexpression d'Axl peut être responsable de la résistance acquise (Mahadevan et al., 2007). Dans le cancer du sein, l'inhibition de l'EGFR induit une expression de l'IGF-1R, et par conséquent une résistance se met en place. De même, dans le cancer des poumons, il a été montré que l'inhibition de l'EGFR par le gefitinib engendre l'expression de c-MET qui va alors rétablir la signalisation par ErbB3 et engendrer la résistance au gefitinib (Engelman et al., 2007). Un autre mécanisme de résistance repose sur la redondance des voies de signalisation, qui vont alors compenser l'extinction d'une voie par l'activation d'une autre. Il a été établi que la voie PI3K/AKT est capable d'interagir avec d'autres voies dont la voie RAS/RAF/MEK/ERK, qui est fortement impliquée dans la prolifération cellulaire. En effet, la suractivation de la voie RAS suite à une mutation de KRAS est corrélée à une inactivation de la voie PI3K/AKT. De même, la phosphorylation de RAF par AKT inhibe la voie MEK/ERK (Zimmermann et al, 1999). La perte de l'expression de PTEN engendre une inactivation de la voie RAS/RAF. Enfin, une dernière étude a révélé que des cellules présentant des mutations de KRAS ou de BRAF étaient résistantes à certains inhibiteurs de PI3K, dont au ZSTK474 (pan-PI3K ; Dan et al., 2010). L'ensemble de ses résultats montre que l'activation de la voie PI3K engendre l'inactivation de la voie de RAS/RAF et inversement. Dans ce contexte, une perspective majeure de ce travail est l'étude d'une survenue potentielle de résistance à l'imatinib mésylate, au NVP-BEZ235 ainsi qu'au BYL719, notamment par une compensation de la voie

RAS/RAF/ERK. Dans la perspective où des résistances surviendraient, l'étude de la combinaison de traitements serait envisagée, notamment avec des inhibiteurs d'une voie parallèle à PI3K : la voie RAS/RAF/MEK/ERK (combinaison thérapeutique horizontale). Des essais cliniques combinant des inhibiteurs de PI3K avec des inhibiteurs de MEK sont actuellement en cours : le BYL719 associé au MEK162 (tumeurs solides avancées) ; le NVP-BEZ235 associé au MEK162 (tumeurs solides). Enfin, des combinaisons d'inhibiteurs de PI3K avec des inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase sont actuellement en cours : le BYL719 associé à l'imatinib mésylate (GIST) ; le BYL719 associé au LJM719 (inhibiteur de HER3, HER2 et NRG ; carcinome de l'œsophage).

Les inhibiteurs des activités kinases : potentiel sensibilisant

Si les inhibiteurs des activités kinases peuvent être synonymes de résistance, ils sont paradoxalement synonymes de sensibilisation. Dans l'ostéosarcome, de nombreux cas de résistance à la radiothérapie ou à la chimiothérapie ont été décrits. Cependant, des études ont montré que le ciblage de la voie PI3K permet la (re)sensibilisation des cellules à la chimiothérapie (le LY294002 restaure la sensibilité des cellules au cisplatine ; Zhao et al., 2013) ainsi qu'à la radiothérapie (NVP-BEZ235 dans le cancer de la prostate ; Zhu et al., 2013). Actuellement en clinique, la combinaison chimiothérapie (avec le paclitaxel) avec des inhibiteurs de PI3K (NVP-BEZ235) est en cours d'évaluation dans le cancer du sein. Dans notre modèle préclinique, l'association du BYL719 avec des doses sub-optimales d'ifosfamide résulte en un effet anti-tumoral synergique. Une perspective importante de notre travail sera de mieux définir les protocoles thérapeutiques : séquences thérapeutiques, doses de traitement, combinaison avec d'autres agents de chimiothérapie (cisplatine, doxorubicine, méthotrexate). En effet, la séquence d'administration utilisée est un élément

clé de la réussite thérapeutique. Ces aspects ont été bien démontrés pour l'association de l'acide zolédronique (zol) avec la doxorubicine. Ces études ont montré que cette combinaison était associée une réponse thérapeutique optimale lors d'une administration séquentielle où le zol est administré 24 heures après la doxorubicine ; le zol synergise également avec le paclitaxel dans le cancer du sein (Ottewell et al., 2008a et 2008b ; Neville-Webbe et al., 2006). De même, il a été montré que la sensibilisation du NVP-BEZ235 à la radiothérapie dépendait du protocole mis en place. Le premier protocole (I) correspondant à l'administration du NVP-BEZ235 uniquement pendant 24 heures avant l'irradiation ne sensibilise pas la tumeur (glioblastome). En revanche, le second protocole (II) correspondant à l'administration de NVP-BEZ235 1 heure avant, pendant et 48 heures après à l'irradiation radiosensibilise la tumeur (Kuger et al., 2013). L'hypothèse émise par les auteurs est que le protocole I induit un blocage en G0/G1 du cycle cellulaire tumoral alors que le protocole II induit un arrêt prolongé en G2/M, limitant la capacité tumorale à réparer l'ADN et donc induit la mort cellulaire tumorale.

Bénéfices thérapeutiques des inhibiteurs des activités tyrosine kinase

Ajouté à un effet cytostatique tumoral, le bénéfice des inhibiteurs de PI3K vis-à-vis de la sensibilisation à la radiothérapie et à la chimiothérapie, ainsi que dans l'efficacité thérapeutique observée *in vivo* peut reposer sur plusieurs hypothèses/mécanismes.

(a) En ciblant l'angiogenèse, les inhibiteurs pourraient normaliser le réseau vasculaire tumoral et augmenteraient, au moins transitoirement, l'oxygénation tumorale et la délivrance des molécules de chimiothérapie au sein de la tumeur. En effet, l'angiogenèse tumorale donne naissance à un réseau de capillaires désorganisés, tortueux et ramifiés, faisant fluctuer le flux sanguin et donc favorisant l'hypoxie. Le GDC-0940, inhibiteur pan-

PI3K, normalise le réseau sanguin tumoral et facilite la délivrance de la doxorubicine *in vivo* (Qayum et al., 2012) ; une autre hypothèse pourrait être que ces molécules empêcheraient un « sursaut angiogénique » entre les cures de chimiothérapie ou de radiothérapie.

(b) Le rôle de l'autophagie dans la sensibilisation de cellules cancéreuses à la radiothérapie semble très controversé. L'inhibition de PI3K/mTOR active l'autophagie. Dans certains cas, l'autophagie permet de préserver les cellules de la mort cellulaire, d'ailleurs, il existe des interactions entre les autophagosomes et certaines protéines anti-apoptotiques dont Bcl-2. Ainsi, la combinaison du NVP-BEZ235 avec un inhibiteur de l'autophagie s'avère cytotoxique (Cerniglia et al., 2012). Cependant, l'autophagie pourrait également avoir un rôle dans l'élimination des cellules tumorales, par exemple le NVP-BEZ235 induirait la sensibilisation de cellules souche du gliome suite à l'activation de l'autophagie qui induirait l'apoptose (Wang et al., 2013). Dans ce contexte, l'apoptose induite par l'autophagie pourrait permettre le recrutement de cellules immunitaires et aurait donc un effet immunoinducteur. L'autophagie semble donc être un mécanisme à double-tranchant, pouvant être à la fois suppresseur de tumeur et cytoprotecteur tumoral (Morselli et al., 2011).

(c) Une autre hypothèse serait la sensibilisation de cellules souches cancéreuses (CSC). Dans l'ostéosarcome, Gibbs et son équipe ont été les premiers à mettre en évidence l'existence de CSC dans l'ostéosarcome. Ces CSC sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement, leur multipotence et leur capacité à former des sarcosphères dans des conditions de déprivation en sérum (Gibbs et al., 2005). La formation de sarcosphères montre l'importance de l'optimisation de la culture *in vitro* en 3 dimensions. Les CSC dans l'ostéosarcome expriment des marqueurs spécifiques des cellules souches mésenchymateuses (CD44, CD105, Stro1), des cellules souches embryonnaires (Oct3/4, Nanog, STAT3 et Sox2) ainsi que CD133 (prominine) et CD117 (c-KIT) (Liu et al., 2011). Les

CSC se distinguent des autres cellules cancéreuses par un cycle cellulaire plus lent, un système performant d'efflux des drogues dont les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et MDR1 (MultiDrug Resistance-1), un système de réparation de dommage à l'ADN sur-opérationnel, d'un système de détoxification (ALDH1 = ALdehyde DeHydrogenase-1) et une surexpression de facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2, IAP ...) (Basu-Roy et al., 2013). Dans les CSC, la voie PI3K/AKT est activée : des études ont révélé que l'activation d'AKT contrôle la survie des CSC et induit une chimiorésistance dans un carcinome hépatocellulaire (Hambardzumyan et al., 2008 ; Ma et al., 2008 ; Korkaya et al., 2009). Dans ce contexte, les CSC pourraient être une cible potentielle pour les inhibiteurs de voies de signalisation. De plus, une très récente étude a montré l'importance de la mécanotransduction dans les CSC, où FAK/PI3K/AKT sont impliqués (Hao et al., 2013). Les FAK (Focal Adhesion Kinase) sont des protéines impliquées dans la migration, la survie et la progression dans le cycle cellulaire (Golubovskaya et al., 2009) ; leur inhibition diminue l'invasion tumorale et resensibilise à la chimiothérapie (Golubovskaya et al., 2013).

(d) Il existe également les cellules tumorales circulantes (CTC). Ces cellules sont le lien entre la tumeur primitive et les métastases, bien que toutes les CTC ne soient pas systématiquement responsable de métastase. En effet, ce sont des cellules qui, par des phénomènes d'adaptation tumorale (perte d'adhérence, transition épithélio-mésenchymateuse leur permettant une souplesse et une résistance accrue à la pression sanguine) sont trouvées dans la circulation sanguine ou lymphatique (Bonnomet et al., 2010). Leur méthode de détection est non-invasive puisqu'une simple prise de sang est nécessaire. Les CTC sont un facteur pronostic important. Dans le cancer du sein, la quantité de CTC dans 7,5 ml de sang détermine le facteur pronostic avant la première ligne de chimiothérapie : $CTC < 5$ = bon pronostic ; $CTC > 5$ = mauvais pronostic (Ghiringhelli, 2012). De plus, la quantité de CTC est un facteur (rapide) de réponse thérapeutique à une

chimiothérapie (diminution du nombre de CTC = sensibilité au traitement) mais également un facteur de récurrence. Cependant, les phénomènes de résistance à la chimiothérapie peuvent survenir. Une étude très récente a été réalisée sur des CTC de patientes atteintes de cancer de sein métastatique : il est possible de détecter des mutations de *PIK3CA* et de *HER2* (Schneck et al., 2013) ; une seconde étude montre également la faisabilité de détecter des mutations spécifiques sur un nombre très limité de cellules (Gasch et al., 2013). L'isolation et la détection de mutations spécifiques des CTC permettraient d'optimiser le choix de la thérapie ciblée. Dans ce contexte, les inhibiteurs de PI3K/mTOR et autres thérapies ciblées ont donc une place majeure.

Cartographie moléculaire : l'enjeu clé pour optimiser la thérapie ciblée

Dans le futur, une question clé devra être élucidée : quel traitement pour quel patient ? Grâce à une connaissance biologique approfondie de chaque tumeur chez chaque patient, la thérapie ciblée sera optimisée. L'utilisation de l'imatinib mésylate dans l'ostéosarcome est un bon exemple. En effet, nos travaux ont montré l'intérêt thérapeutique de l'imatinib mésylate dans deux modèles murins *in vivo*. Cependant, une étude clinique de 2008 a montré l'inefficacité de cette molécule chez 59 patients atteints de tumeurs solides réfractaires ou en récurrence (dont ostéosarcomes = 10/59 ; sarcomes d'Ewing = 24/59 ; neuroblastomes = 10/59). Parmi les 59 patients, 1 seule réponse partielle a été détectée dans un sarcome d'Ewing. Dans cette étude, le recrutement des patients a été réalisé selon la présence de l'expression de c-KIT ou de PDGFR. Deux hypothèses peuvent être émises : l'imatinib mésylate n'a finalement aucun intérêt thérapeutique dans l'ostéosarcome ou bien le criblage des patients n'est pas optimal. L'identification des populations de patients est bien démontrée dans le cas de l'utilisation de l'imatinib mésylate dans les GIST. Les études à ce

sujet montre que cette drogue est beaucoup plus active chez des patients porteurs de mutations dans l'exon 11 de c-KIT que chez des patients ayant c-KIT sauvage (Pierrotti et al., 2011). Ainsi, dans cette étude, aucune donnée sur le statut mutationnel des récepteurs n'est disponible. En plus de BCR-Abl, c-KIT, PDGFR et c-FMS, l'imatinib mésylate semble également cibler d'autres récepteurs dont Axl, Ryk et EphA2/A10. Une dernière hypothèse peut être émise : la cible thérapeutique n'est peut-être pas exprimée chez les patients de cette étude, ce qui expliquerait une absence de réponse. Cet exemple montre donc l'importance capitale de la connaissance biologique de chaque tumeur, de son statut mutationnel qui peut être prédictif de la réponse thérapeutique ainsi que des techniques de détection utilisées en clinique.

L'avenir des thérapies ciblées repose sur « la cartographie moléculaire des cellules tumorales » correspondant à l'analyse de l'exome/génome complet tumoral, prenant en compte l'hétérogénéité tumorale (CSC et toutes ces « cellules-filles » potentielles) mais aussi les CTC. Depuis quelques années, il y a un réel engouement pour le séquençage à haut débit. Les séquenceurs les plus récents sont capables de séquencer le génome/exome d'une seule cellule, d'où un intérêt majeur pour les CTC et CSC. De plus, le réel avantage de cette génération de séquenceurs est un séquençage par synthèse, sans amplification par PCR, limitant ainsi les erreurs pouvant survenir pendant l'amplification (cas des séquenceurs de seconde génération). La Pacific Biosciences, par exemple, repose sur la technologie SMRT (Single Molecule Real Time) qui permet le relargage de la fluorescence directement par l'ADN polymérase lors de la synthèse nucléotidique. Cet appareil permet de séquencer un génome entier en moins de 24 heures. L'évolution des techniques de séquençage à haut débit permettra, à terme, une analyse minutieuse au cas par cas des mutations de chaque tumeur (et de son hétérogénéité) et pourra, grâce au soutien de la bioinformatique et de banques de données ou collections, établir un « menu » thérapeutique spécifique à chaque

patient. Dans le cas de résistance, cette technologie permettra de mieux appréhender l'apparition de mutations secondaires et de cibler cette résistance par l'agent thérapeutique adéquat. Le matériel génomique/ARN peut provenir de biopsies de patients (frais ou fixé, importance de la microdissection laser) ainsi que de cellules isolées dans le sang des patients, les CTC, issues de méthodes directe ou indirecte. La méthode directe repose sur la taille des cellules et sur de propriétés cytologiques : la taille des CTC est supérieure à celle des éléments figurés du sang, permettant un isolement sur filtre de 8 μm ; les éléments figurés du sang dont la taille est supérieure à 8 μm passent au travers du filtre grâce à leur « souplesse ». La méthode indirecte repose sur la technique du « CellSearch[®] », ou enrichissement immunomagnétique par 3 anticorps spécifiques successifs.

Conclusion

En conclusion de ce travail, l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité kinase et plus particulièrement de la voie PI3K/AKT/mTOR dans l'ostéosarcome, ainsi que dans d'autres cancers, semble être une voie thérapeutique envisageable et pertinente dans un protocole thérapeutique de première ligne mais aussi dans un contexte de (re)sensibilisation de tumeurs à la chimio/radiothérapie. Des résultats préliminaires de Phase I montrent que les inhibiteurs de PI3K, qu'ils soient spécifiques, pan-PI3K ou dual-PI3K/mTOR, sont relativement bien tolérés chez les patients avec des effets secondaires gérables (hyperglycémie, fatigue, nausée...) et montrent un effet anti-tumoral encourageant (Juric et al., 2012). Leur effet « multi-cible » est également un avantage de taille dans la prise en charge thérapeutique de l'ostéosarcome, notamment leur effet anti-angiogénique. Néanmoins, l'efficacité de ces inhibiteurs semble être, dans de nombreux cas, dépendent de

la présence de mutation spécifique, montrant le caractère indispensable de maîtriser au mieux les aspects moléculaires tumoraux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem.* 1994 Jul;55(3):287-99. Review.

Arcaro A, Zvelebil MJ, Wallasch C, Ullrich A, Waterfield MD, Domin J. Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. *Mol Cell Biol.* 2000 Jun;20(11):3817-30.

Arcaro A, Volinia S, Zvelebil MJ, Stein R, Watton SJ, Layton MJ, Gout I, Ahmadi K, Downward J, Waterfield MD. Human phosphoinositide 3-kinase C2beta, the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity. *J Biol Chem.* 1998 Dec 4;273(49):33082-90.

Bacci G, Briccoli A, Rocca M, Ferrari S, Donati D, Longhi A, Bertoni F, Bacchini P, Giacomini S, Forni C, Manfrini M, Galletti S. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Ann Oncol.* 2003 Jul;14(7):1126-34.

Backer JM. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J.* 2008 Feb 15;410(1):1-17. doi: 10.1042/BJ20071427. Review.

Bader AG, Kang S, Vogt PK. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 31;103(5):1475-9.

Bandaru SS, Lin K, Roming SL, Vellipuram R, Harney JP. Effects of PI3K inhibition and low docosahexaenoic acid on cognition and behavior. *Physiol Behav.* 2010 Jun 1;100(3):239-44. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.10.019.

Bansal D, Shava U, Varma N, Trehan A, Marwaha RK. Imatinib has adverse effect on growth in children with chronic myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2012 Sep;59(3):481-4. doi: 10.1002/pbc.23389.

Basu-Roy U, Basilico C, Mansukhani A. Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma. *Cancer Lett.* 2013 Sep 10;338(1):158-67. doi: 10.1016/j.canlet.2012.05.028.

Bell WC, Siegal GP. Molecular pathology of osteosarcoma. In: Heymann D, editor. *Bone Cancer: Progression and therapeutic approaches.* Academic Press, 2010:193-199.

Bendell JC, Rodon J, Burris HA, de Jonge M, Verweij J, Birle D, Demanse D, De Buck SS, Ru QC, Peters M, Goldbrunner M, Baselga J. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2012 Jan 20;30(3):282-90. doi: 10.1200/JCO.2011.36.1360.

- Berman E, Girotra M, Cheng C, Chanel S, Maki R, Shelat M, Strauss HW, Fleisher M, Heller G, Farooki A. Effect of long term imatinib on bone in adults with chronic myelogenous leukemia and gastrointestinal stromal tumors. *Leuk Res.* 2013 Jul;37(7):790-4. doi: 10.1016/j.leukres.2013.02.005.
- Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Nussbaum RL. Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm Genome.* 2002 Mar;13(3):169-72.
- Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Werner M, Winkelmann W, Zoubek A, Jürgens H, Winkler K. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol.* 2002 Feb 1;20(3):776-90.
- Blackwell A. *Sarcome des tissus mous et ostéosarcomes. Standard-option-recommandations.* Editor Blackwell A, 1995. 168 pages.
- Blattmann C, Oertel S, Ehemann V, Thiemann M, Huber PE, Bischof M, Witt O, Deubzer HE, Kulozik AE, Debus J, Weber KJ. Enhancement of radiation response in osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010 Sep 1;78(1):237-45. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.03.010.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):355-65. Review.
- Bond M, Bernstein ML, Pappo A, Schultz KR, Krailo M, Blaney SM, Adamson PC. A phase II study of imatinib mesylate in children with refractory or relapsed solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer.* 2008 Feb;50(2):254-8.
- Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.* 2008 Apr;42(4):606-15. doi: 10.1016/j.bone.2007.12.224. Epub 2008 Jan 12. Review.
- Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, Polette M, Gilles C. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010 Jun;15(2):261-73. doi: 10.1007/s10911-010-9174-0. Review.
- Boudiffa M, Wade-Gueye NM, Guignandon A, Vanden-Bossche A, Sabido O, Aubin JE, Jurdic P, Vico L, Lafage-Proust MH, Malaval L. Bone sialoprotein deficiency impairs osteoclastogenesis and mineral resorption in vitro. *J Bone Miner Res.* 2010 Dec;25(12):2669-79. doi: 10.1002/jbmr.245. Erratum in: *J Bone Miner Res.* 2011 Feb;26(2):439.

Brünnner-Kubath C, Shabbir W, Saferding V, Wagner R, Singer CF, Valent P, Berger W, Marian B, Zielinski CC, Grusch M, Grunt TW. The PI3 kinase/mTOR blocker NVP-BEZ235 overrides resistance against irreversible ErbB inhibitors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Sep;129(2):387-400. doi: 10.1007/s10549-010-1232-1.

Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, Lydon NB. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Oct;295(1):139-45.

Byfield MP, Murray JT, Backer JM. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem.* 2005 Sep 23;280(38):33076-82.

Canalis E, Brunet LJ, Parker K, Zanotti S. Conditional inactivation of noggin in the postnatal skeleton causes osteopenia. *Endocrinology.* 2012 Apr;153(4):1616-26. doi: 10.1210/en.2011-1604.

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

Carpenter G, King L Jr, Cohen S. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature.* 1978 Nov 23;276(5686):409-10.

Case N, Thomas J, Sen B, Styner M, Xie Z, Galior K, Rubin J. Mechanical regulation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in mesenchymal stem cells is dependent on Akt protein serine 473 phosphorylation via mTORC2 protein. *J Biol Chem.* 2011 Nov 11;286(45):39450-6. doi: 10.1074/jbc.M111.265330.

Casteran N, De Sepulveda P, Beslu N, Aoubala M, Letard S, Lecocq E, Rottapel R, Dubreuil P. Signal transduction by several KIT juxtamembrane domain mutations. *Oncogene.* 2003 Jul 24;22(30):4710-22.

Cerniglia GJ, Karar J, Tyagi S, Christofidou-Solomidou M, Rengan R, Koumenis C, Maity A. Inhibition of autophagy as a strategy to augment radiosensitization by the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Mol Pharmacol.* 2012 Dec;82(6):1230-40. doi: 10.1124/mol.112.080408.

Chambers TJ, Fuller K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci.* 1985 Jun;76:155-65.

Chauveinc L, Mosseri V, Quintana E, Desjardins L, Schlienger P, Doz F, Dutrillaux B. Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet.* 2001 Jun;22(2):77-88. Review.

Chellaiah MA. Regulation of podosomes by integrin α v β 3 and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling. *Eur J Cell Biol.* 2006 Apr;85(3-4):311-7. Review.

Chen D, Zhang YJ, Zhu KW, Wang WC. A systematic review of vascular endothelial growth factor expression as a biomarker of prognosis in patients with osteosarcoma. *Tumour Biol.* 2013 Jun;34(3):1895-9. doi: 10.1007/s13277-013-0733-z. Review.

Chen L, Xing T, Wang M, Miao Y, Tang M, Chen J, Li G, Ruan DY. Local infusion of ghrelin enhanced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory through activation of phosphoinositide 3-kinase in the dentate gyrus of adult rats. *Eur J Neurosci.* 2011 Jan;33(2):266-75. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07491.x.

Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 11;105(45):17414-9. doi: 10.1073/pnas.0809136105.

Chow JW, Wilson AJ, Chambers TJ, Fox SW. Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J Bone Miner Res.* 1998 Nov;13(11):1760-7.

Choy E, Hornicek F, MacConaill L, Harmon D, Tariq Z, Garraway L, Duan Z. High-throughput genotyping in osteosarcoma identifies multiple mutations in phosphoinositide-3-kinase and other oncogenes. *Cancer.* 2012 Jun 1;118(11):2905-14. doi: 10.1002/cncr.26617.

Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, Wilm M, Zhao L, Yip SC, Waterfield MD, Backer JM, Zerial M. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol.* 1999 Aug;1(4):249-52.

Clezardin P, Teti A. Bone metastasis: pathogenesis and therapeutic implications. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24(8):599-608. Review.

Clinical Trial : www.clinical.trial.gov

Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* 2005 Nov;12 Suppl 2:1509-18. Review.

Cuevas B, Lu Y, Watt S, Kumar R, Zhang J, Siminovitch KA, Mills GB. SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity. *J Biol Chem.* 1999 Sep 24;274(39):27583-9.

Cuevas BD, Lu Y, Mao M, Zhang J, LaPushin R, Siminovitch K, Mills GB. Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 2001 Jul 20;276(29):27455-61.

Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Mar;63(5):601-15. Review.

Cobbold SP. The mTOR pathway and integrating immune regulation. *Immunology*. 2013 Aug 19. doi: 10.1111/imm.12162.

Dan S, Okamura M, Seki M, Yamazaki K, Sugita H, Okui M, Mukai Y, Nishimura H, Asaka R, Nomura K, Ishikawa Y, Yamori T. Correlating phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor efficacy with signaling pathway status: in silico and biological evaluations. *Cancer Res*. 2010 Jun 15;70(12):4982-94. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4172.

Dazert E, Hall MN. mTOR signaling in disease. *Curr Opin Cell Biol*. 2011 Dec;23(6):744-55. doi: 10.1016/j.ceb.2011.09.003. Review.

De Nigris F, Mancini FP, Schiano C, Infante T, Zullo A, Minucci PB, Al-Omran M, Giordano A, Napoli C. Osteosarcoma cells induce endothelial cell proliferation during neo-angiogenesis. *J Cell Physiol*. 2013 Apr;228(4):846-52. doi: 10.1002/jcp.24234.

Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J*. 1998 Aug 3;17(15):4426-41.

Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2640-53. Review.

Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med*. 2002 Aug 15;347(7):472-80.

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

Devlin RD, Du Z, Pereira RC, Kimble RB, Economides AN, Jorgetti V, Canalis E. Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology*. 2003 May;144(5):1972-8.

Dewar AL, Cambareri AC, Zannettino AC, Miller BL, Doherty KV, Hughes TP, Lyons AB. Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood*. 2005 Apr 15;105(8):3127-32.

Dewar AL, Farrugia AN, Condina MR, Bik To L, Hughes TP, Vernon-Roberts B, Zannettino AC. Imatinib as a potential antiresorptive therapy for bone disease. *Blood*. 2006 Jun 1;107(11):4334-7.

Do SI, Jung WW, Kim HS, Park YK. The expression of epidermal growth factor receptor and its downstream signaling molecules in osteosarcoma. *Int J Oncol*. 2009 Mar;34(3):797-803.

Dujardin F, Binh MB, Bouvier C, Gomez-Brouchet A, Larousserie F, Muret Ad, Louis-Brennetot C, Aurias A, Coindre JM, Guillou L, Pedetour F, Duval H, Collin C, de Pinieux G. MDM2 and CDK4 immunohistochemistry is a valuable tool in the differential diagnosis of low-grade osteosarcomas and other primary fibro-osseous lesions of the bone. *Mod Pathol*. 2011 May;24(5):624-37. doi: 10.1038/modpathol.2010.229.

Duplomb L, Baud'huin M, Charrier C, Berreur M, Trichet V, Blanchard F, Heymann D. Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Endocrinology*. 2008 Jul;149(7):3688-97. doi: 10.1210/en.2007-1719.

Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003 Nov;3(11):859-68. Review.

Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mésenchymale stem cells and macrophages move in. *J Exp Med*. 2011 Mar 14;208(3):421-8. doi: 10.1084/jem.20110132. Review.

El Hajj Dib I, Gallet M, Mentaverri R, Sévenet N, Brazier M, Kamel S. Imatinib mesylate (Gleevec) enhances mature osteoclast apoptosis and suppresses osteoclast bone resorbing activity. *Eur J Pharmacol*. 2006 Dec 3;551(1-3):27-33.

Elefteriou F. Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):231-6. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.016.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006 Aug;7(8):606-19. Review.

Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007 May 18;316(5827):1039-43.

Entz-Werlé N, Marcellin L, Gaub MP, Guerin E, Schneider A, Berard-Marec P, Kalifa C, Brugiere L, Pacquement H, Schmitt C, Tabone MD, Jeanne-Pasquier C, Terrier P, Dijoud F, Oudet P, Lutz P, Babin-Boilletot A. Prognostic significance of allelic imbalance at the c-kit gene locus and c-kit overexpression by immunohistochemistry in pediatric osteosarcomas. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 1;23(10):2248-55.

Errani C, Traina F, Perna F, Calamelli C, Faldini C. Current concepts in the biopsy of musculoskeletal tumors. *ScientificWorldJournal*. 2013 Jun 5;2013:538152. doi: 10.1155/2013/538152.

Falasca M, Maffucci T. Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. *Biochem Soc Trans*. 2007 Apr;35(Pt 2):211-4. Review.

Fierro F, Illmer T, Jing D, Schleyer E, Ehninger G, Boxberger S, Bornhäuser M. Inhibition of platelet-derived growth factor receptorbeta by imatinib mélysate suppresses proliferation and alters differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Prolif*. 2007 Jun;40(3):355-66.

Fitter S, Dewar AL, Kostakis P, To LB, Hughes TP, Roberts MM, Lynch K, Vernon-Roberts B, Zannettino AC. Long-term imatinib therapy promotes bone formation in CML patients. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2538-47.

Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn P, Mertens F. WHO classification of tumours of bone tissue and bone. Fourth Edition. 2012. Editor WHO

Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK, Alix S, Baker SJ, Box G, Chuckowree IS, Clarke PA, Depledge P, Eccles SA, Friedman LS, Hayes A, Hancox TC, Kugendradas A, Lensun L, Moore P, Olivero AG, Pang J, Patel S, Pergl-Wilson GH, Raynaud FI, Robson A, Saghir N, Salphati L, Sohal S, Ultsch MH, Valenti M, Wallweber HJ, Wan NC, Wiesmann C, Workman P, Zhyvoloup A, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ. The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J Med Chem*. 2008 Sep 25;51(18):5522-32. doi: 10.1021/jm800295d.

Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006 Jan;235(1):176-90. Review.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 1968 Mar;6(2):230-47.

Friedman MA, Carter SK. The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future. J Surg Oncol. 1972;4(5):482-510. Review.

Fritsche-Guenther R, Noske A, Ungethüm U, Kuban RJ, Schlag PM, Tunn PU, Karle J, Krenn V, Dietel M, Sers C. De novo expression of EphA2 in osteosarcoma modulates activation of the mitogenic signalling pathway. Histopathology. 2010 Dec;57(6):836-50. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03713.x.

Frödin M, Gammeltoft S. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. Mol Cell Endocrinol. 1999 May 25;151(1-2):65-77. Review.

Fu W, Ma L, Chu B, Wang X, Bui MM, Gemmer J, Altiok S, Pledger WJ. The cyclin-dependent kinase inhibitor SCH 727965 (dinaciclib) induces the apoptosis of osteosarcoma cells. Mol Cancer Ther. 2011 Jun;10(6):1018-27. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0167.

Fu W, Sharma SS, Ma L, Chu B, Bui MM, Reed D, Pledger WJ. Apoptosis of osteosarcoma cultures by the combination of the cyclin-dependent kinase inhibitor SCH727965 and a heat shock protein 90 inhibitor. Cell Death Dis. 2013 Mar 28;4:e566. doi: 10.1038/cddis.2013.101.

Fuchs B, Pritchard DJ. Etiology of osteosarcoma. Clin Orthop Relat Res. 2002 Apr;(397):40-52. Review.

Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, Langer-Freitag S, Reeh M, Seifert AM, Mauermann O, Izbicki JR, Pantel K, Riethdorf S. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. Clin Chem. 2013 Jan;59(1):252-60. doi: 10.1373/clinchem.2012.188557.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J Biol Chem. 1998 Nov 13;273(46):30336-43.

Ghiringhelli F. L'étude de cellules tumorales circulantes. Un nouveau marqueur pronostique et prédictif de l'efficacité des chimiothérapies. Bulletin Infirmier du Cancer Vol.11-n°2-avril-mai-juin 2011

Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, Ghivizzani SC, Ignatova TN, Steindler DA. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*. 2005 Nov;7(11):967-76.

Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev*. 2001 Nov 1;15(21):2852-64.

Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem*. 1991 Mar;45(3):292-302.

Gnant M, Clézardin P. Direct and indirect anticancer activity of bisphosphonates: a brief review of published literature. *Cancer Treat Rev*. 2012 Aug;38(5):407-15. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.09.003. Review.

Goh LK, Sorkin A. Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 May 1;5(5):a017459. doi: 10.1101/cshperspect.a017459.

Golubovskaya VM, Sumbler B, Ho B, Yemma M, Cance WG. MiR-138 and MiR-135 Directly Target Focal Adhesion Kinase, Inhibit Cell Invasion, and Increase Sensitivity to Chemotherapy in Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013 Feb 15.

Golubovskaya VM, Kweh FA, Cance WG. Focal adhesion kinase and cancer. *Histol Histopathol*. 2009 Apr;24(4):503-10. Review.

Gonzalez-Angulo AM, Juric D, Argilés G, Schellens JHM, Burris HA, Berlin J, Middleton MR, Schuler MH, Van Geel R, Helgason T, Bootle D, Boehm M, Goggin TK, Demanse D, Quadt C, Baselga J. Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the α -specific PI3K inhibitor BYL719: Results from the first-in-human study. *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 2531).

Gong C, Liao H, Wang J, Lin Y, Qi J, Qin L, Tian LQ, Guo FJ. LY294002 induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis of cancer stem-like cells from human osteosarcoma via down-regulation of PI3K activity. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(7):3103-7.

Gorlick R, Huvos AG, Heller G, Aledo A, Beardsley GP, Healey JH, Meyers PA. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2781-8.

Graupera M, Potente M. Regulation of angiogenesis by PI3K signaling networks. *Exp Cell Res*. 2013 May 15;319(9):1348-55. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.02.021. Review.

Grey A, Chaussade C, Empson V, Lin JM, Watson M, O'Sullivan S, Rewcastle G, Naot D, Cornish J, Shepherd P. Evidence for a role for the p110- α isoform of PI3K in skeletal function. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1;391(1):564-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.099.

Grigoriadis AE, Schellander K, Wang ZQ, Wagner EF. Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol.* 1993 Aug;122(3):685-701.

Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Väänänen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Oct 7;335(4):1095-101.

Guihard P, Danger Y, Brounais B, David E, Brion R, Delecrin J, Richards CD, Chevalier S, Rédini F, Heymann D, Gascan H, Blanchard F. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells.* 2012 Apr;30(4):762-72. doi: 10.1002/stem.1040.

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

Guntur AR, Rosen CJ. The skeleton: a multi-functional complex organ: new insights into osteoblasts and their role in bone formation: the central role of PI3Kinase. *J Endocrinol.* 2011 Nov;211(2):123-30. doi: 10.1530/JOE-11-0175. Review.

Gur G, Rubin C, Katz M, Amit I, Citri A, Nilsson J, Amariglio N, Henriksson R, Rechavi G, Hedman H, Wides R, Yarden Y. LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *EMBO J.* 2004 Aug 18;23(16):3270-81.

Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Sävje-Söderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1992 Jul;10(7):1049-56.

Gymnopoulos M, Elsliger MA, Vogt PK. Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 27;104(13):5569-74.

Hackel PO, Gishizky M, Ullrich A. Mig-6 is a negative regulator of the epidermal growth factor receptor signal. *Biol Chem.* 2001 Dec;382(12):1649-62.

Haj FG, Markova B, Klaman LD, Bohmer FD, Neel BG. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem.* 2003 Jan 10;278(2):739-44.

Hall TJ, Jeker H, Schaubelin M. Wortmannin, a potent inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1995 Apr;56(4):336-8.

Hambardzumyan D, Becher OJ, Rosenblum MK, Pandolfi PP, Manova-Todorova K, Holland EC. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev.* 2008 Feb 15;22(4):436-48. doi: 10.1101/gad.1627008.

Han J, Tian R, Yong B, Luo C, Tan P, Shen J, Peng T. Gas6/Axl mediates tumor cell apoptosis, migration and invasion and predicts the clinical outcome of osteosarcoma patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jun 7;435(3):493-500. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.019.

Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 1995 May;9(8):576-96. Review.

Hao J, Zhang Y, Ye R, Zheng Y, Zhao Z, Li J. Mechanotransduction in cancer stem cells. *Cell Biol Int.* 2013 Sep;37(9):888-91. doi: 10.1002/cbin.10111.

Hassan SE, Bekarev M, Kim MY, Lin J, Piperdi S, Gorlick R, Geller DS. Cell surface receptor expression patterns in osteosarcoma. *Cancer.* 2012 Feb 1;118(3):740-9. doi: 10.1002/cncr.26339.

Hattinger CM, Pasello M, Ferrari S, Picci P, Serra M. Emerging drugs for high-grade osteosarcoma. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2010 Dec;15(4):615-34. doi: 10.1517/14728214.2010.505603. Review.

Hauben EI, Arends J, Vandenbroucke JP, van Asperen CJ, Van Marck E, Hogendoorn PC. Multiple primary malignancies in osteosarcoma patients. Incidence and predictive value of osteosarcoma subtype for cancer syndromes related with osteosarcoma. *Eur J Hum Genet.* 2003 Aug;11(8):611-8.

Hauben EI, Hogendoorn PCW. Epidemiology of primary bone tumors and economical aspects of bone metastasis. Cytogenetics of bone tumors. In: Heymann D, editor. *Bone Cancer: Progression and therapeutic approaches.* Academic Press, 2010:3-8.

Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrati MD, Doleman SE, Klagsbrun M. Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem.* 1986 Sep 25;261(27):12665-74.

Healy S, Khan P, Davie JR. Immediate early response genes and cell transformation. *Pharmacol Ther.* 2013 Jan;137(1):64-77. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.09.001. Review.

- Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*. 2011 Oct;23(10):1515–27. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.05.004. Review.
- Heymann D, Lepreux S. Le tissu osseux, In : *Histology – Bases fondamentales*. OmniSciences, ed. 2008
- Heymann D, Redini F. Targeted therapies for bone sarcomas. *BoneKEy Reports* (2013) 2, Article number:378(2013)doi:10.1038/bonekey.2013.112.
- Heymann D, Rousselle AV. gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine*. 2000 Oct;12(10):1455–68. Review.
- Hill PA. Bone remodelling. *Br J Orthod*. 1998 May;25(2):101–7. Review.
- Hingorani P, Zhang W, Gorlick R, Kolb EA. Inhibition of Src phosphorylation alters metastatic potential of osteosarcoma in vitro but not in vivo. *Clin Cancer Res*. 2009 May 15;15(10):3416–22. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1657.
- Hiraga T, Nakamura H. Imatinib mesylate suppresses bone metastases of breast cancer by inhibiting osteoclasts through the blockade of c-Fms signals. *Int J Cancer*. 2009 Jan 1;124(1):215–22. doi: 10.1002/ijc.23903.
- Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 2009 Aug;28 Suppl 1:S32–7. doi: 10.1038/onc.2009.199. Review.
- Hooper MM, Barst RJ, Bourge RC, Feldman J, Frost AE, Galié N, Gómez-Sánchez MA, Grimminger F, Grünig E, Hassoun PM, Morrell NW, Peacock AJ, Satoh T, Simonneau G, Tapson VF, Torres F, Lawrence D, Quinn DA, Ghofrani HA. Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation*. 2013 Mar 12;127(10):1128–38. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000765.
- Holliday LS, Bubb MR, Jiang J, Hurst IR, Zuo J. Interactions between vacuolar H⁺-ATPases and microfilaments in osteoclasts. *J Bioenerg Biomembr*. 2005 Dec;37(6):419–23. Review.
- 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 Apr;25(4):1177–81. doi: 10.3892/or.2011.1167.
- Holtrop ME, King GJ. The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clin Orthop Relat Res*. 1977 Mar-Apr;(123):177–96.

- Honoki K, Fujii H, Kubo A, Kido A, Mori T, Tanaka Y, Tsujiuchi T. Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance. *Oncol Rep.* 2010 Aug;24(2):501-5.
- Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S, Sorkin A. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell.* 2006 Mar 17;21(6):737-48.
- Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci.* 2007 Aug 1;120(Pt 15):2479-87. Review.
- Huang H, Tindall DJ. Regulation of FOXO protein stability via ubiquitination and proteasome degradation. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Nov;1813(11):1961-4. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.007. Review.
- Hubbard SR. Autoinhibitory mechanisms in receptor tyrosine kinases. *Front Biosci.* 2002 Feb 1;7:d330-40. Review.
- Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:373-98. Review.
- Hughes DP. How the NOTCH pathway contributes to the ability of osteosarcoma cells to metastasize. *Cancer Treat Res.* 2009;152:479-96. doi: 10.1007/978-1-4419-0284-9_28. Review. PubMed PMID: 20213410.
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004 Nov;6(11):1122-8
- Jaeger BA, Tauer JT, Ulmer A, Kuhlisch E, Roth HJ, Suttorp M. Changes in bone metabolic parameters in children with chronic myeloid leukemia on imatinib treatment. *Med Sci Monit.* 2012 Dec;18(12):CR721-8.
- Jaffe N. Recent advances in the chemotherapy of metastatic osteogenic sarcoma. *Cancer.* 1972 Dec;30(6):1627-31.
- Jaffe N, Frei E 3rd, Watts H, Traggis D. High-dose methotrexate in osteogenic sarcoma: a 5-year experience. *Cancer Treat Rep.* 1978 Feb;62(2):259-64.
- Jaffe N, Puri A, Gelderblom H. Osteosarcoma: evolution of treatment paradigms. *Sarcoma.* 2013;2013:203531. doi: 10.1155/2013/203531.

- Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 2009;102:19–65. doi: 10.1016/S0065-230X(09)02002-8. Review.
- Joliat MJ, Umeda S, Lyons BL, Lynes MA, Shultz LD. Establishment and characterization of a new osteogenic cell line (MOS-J) from a spontaneous C57BL/6J mouse osteosarcoma. *In Vivo.* 2002 Jul–Aug;16(4):223–8.
- Jönsson S, Hjorth–Hansen H, Olsson B, Wadenvik H, Sundan A, Standal T. Imatinib inhibits proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes early but not late osteoblast differentiation in vitro. *J Bone Miner Metab.* 2012 Jan;30(1):119–23. doi: 10.1007/s00774-011-0323-3.
- Jönsson S, Olsson B, Ohlsson C, Lorentzon M, Mellström D, Wadenvik H. Increased cortical bone mineralization in imatinib treated patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica.* 2008 Jul;93(7):1101–3. doi: 10.3324/haematol.12373.
- Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, Destaing O. Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol.* 2006 Apr;85(3–4):195–202. Review.
- Juric D, Rodon J, Gonzalez–Angulo AM, Burris HA, Bendell J, Berlin JD, Middleton MR, Bootle D, Boehm M, Schmitt A, Rouyrre N, Quadt C, Baselga J. BYL719, a next generation PI3K alpha specific inhibitor: Preliminary safety, PK, and efficacy results from the first-in-human study. In: *Proceedings of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*; 2012 Mar 31–Apr 4; Chicago, IL. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2012;72(8 Suppl):Abstract nr CT-01. doi:1538-7445.AM2012-CT-01.
- Kaliman P, Viñals F, Testar X, Palacin M, Zorzano A. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors block differentiation of skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 1996 Aug 9;271(32):19146–51.
- Kim JE, Chen J. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes.* 2004 Nov;53(11):2748–56.
- Klein B, Pals S, Masse R, Lafuma J, Morin M, Binart N, Jasmin JR, Jasmin C. Studies of bone and soft-tissue tumours induced in rats with radioactive cerium chloride. *Int J Cancer.* 1977 Jul 15;20(1):112–9.
- Korkaya H, Paulson A, Charafe–Jauffret E, Ginestier C, Brown M, Dutcher J, Clouthier SG, Wicha MS. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biol.* 2009 Jun 2;7(6):e1000121. doi: 10.1371/journal.pbio.1000121.

- Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, Tada H, Kuwano H, Mitsudomi T. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 1;12(19):5764-9.
- Krause C, Guzman A, Knaus P. Noggin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Apr;43(4):478-81. doi: 10.1016/j.biocel.2011.01.007. Review.
- Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Nov;65(22):3525-44. doi: 10.1007/s00018-008-8170-7. Review.
- Krop IE, Saura C, Rodon Ahnert J, Becerra C, Britten CD, Isakoff SJ, Demanse D, Hackl W, Quadt C, Silva AP, Burris HA, Abu-Khalaf MM, Baselga J. A phase I/IB dose-escalation study of BEZ235 in combination with trastuzumab in patients with PI3Kinase or PTEN altered HER2⁺ metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr 508).
- Kubo T, Piperdi S, Rosenblum J, Antonescu CR, Chen W, Kim HS, Huvos AG, Sowers R, Meyers PA, Healey JH, Gorlick R. Platelet-derived growth factor receptor as a prognostic marker and a therapeutic target for imatinib mésylate therapy in osteosarcoma. *Cancer.* 2008 May 15;112(10):2119-29. doi: 10.1002/cncr.23437.
- Kuger S, Graus D, Brendtke R, Günther N, Katzer A, Lutyj P, Polat B, Chatterjee M, Sukhorukov VL, Flentje M, Djuzenova CS. Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Depends on Drug-Irradiation Schedule. *Transl Oncol.* 2013 Apr;6(2):169-79.
- Kuijjer ML, Peterse EF, van den Akker BE, Briaire-de Bruijn IH, Serra M, Meza-Zepeda LA, Myklebost O, Hassan AB, Hogendoorn PC, Cleton-Jansen AM. IR/IGF1R signaling as potential target for treatment of high-grade osteosarcoma. *BMC Cancer.* 2013 May 20;13:245. doi: 10.1186/1471-2407-13-245.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998 Apr 17;93(2):165-76.
- Lakkakorpi PT, Väänänen HK. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech.* 1996 Feb 1;33(2):171-81. Review.

Ledda F, Paratcha G. Negative Regulation of Receptor Tyrosine Kinase (RTK) Signaling: A Developing Field. *Biomark Insights*. 2007 Feb 14;2:45-58.

Lamoureux F, Moriceau G, Picarda G, Rousseau J, Trichet V, Rédini F. Regulation of osteoprotegerin pro- or anti-tumoral activity by bone tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1805(1):17-24. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.08.004.

Lee J, Martin M, Li S. Cytogenetics of bone tumors. In: Heymann D, editor. *Bone Cancer: Progression and therapeutic approaches*. Academic Press, 2010:151-159.

Lee JA, Ko Y, Kim DH, Lim JS, Kong CB, Cho WH, Jeon DG, Lee SY, Koh JS. Epidermal growth factor receptor: is it a feasible target for the treatment of osteosarcoma? *Cancer Res Treat*. 2012 Sep;44(3):202-9. doi: 10.4143/crt.2012.44.3.202.

Legler JM, Ries LA, Smith MA, Warren JL, Heineman EF, Kaplan RS, Linet MS. Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Aug 18;91(16):1382-90. Erratum in: *J Natl Cancer Inst* 1999 Oct 6;91(19):1693.

Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010 Jun 25;141(7):1117-34. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011. Review.

Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP, Weitzmann MN. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood*. 2007 May 1;109(9):3839-48.

Liegl B, Kepten I, Le C, Zhu M, Demetri GD, Heinrich MC, Fletcher CD, Corless CL, Fletcher JA. Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol*. 2008 Sep;216(1):64-74. doi: 10.1002/path.2382.

Lin CH, Guo Y, Ghaffar S, McQueen P, Pourmorady J, Christ A, Rooney K, Ji T, Eskander R, Zi X, Hoang BH. Dkk-3, a secreted wnt antagonist, suppresses tumorigenic potential and pulmonary metastasis in osteosarcoma. *Sarcoma*. 2013;2013:147541. doi: 10.1155/2013/147541.

Linch M, Claus J, Benson C. Update on imatinib for gastrointestinal stromal tumors: duration of treatment. *Onco Targets Ther*. 2013 Jul 30;6:1011-23. doi: 10.2147/OTT.S31260.

Linet MS, Ries LA, Smith MA, Tarone RE, Devesa SS. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jun 16;91(12):1051-8.

- Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res.* 2008;100:35-83. doi: 10.1016/S0065-230X(08)00002-X. Review.
- Liu B, Ma W, Jha RK, Gurung K. Cancer stem cells in osteosarcoma: recent progress and perspective. *Acta Oncol.* 2011 Nov;50(8):1142-50. doi: 10.3109/0284186X.2011.584553. Review.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 1993 Oct 8;75(1):59-72.
- Liu X, Bruxvoort KJ, Zylstra CR, Liu J, Cichowski R, Faugere MC, Bouxsein ML, Wan C, Williams BO, Clemens TL. Lifelong accumulation of bone in mice lacking Pten in osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 13;104(7):2259-64.
- Lynch HT, Deters CA, Hogg D, Lynch JF, Kinarsky Y, Gatalica Z. Familial sarcoma: challenging pedigrees. *Cancer.* 2003 Nov 1;98(9):1947-57.
- López-Guerrero JA, López-Ginés C, Pellín A, Carda C, Llombart-Bosch A. Deregulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagn Mol Pathol.* 2004 Jun;13(2):81-91.
- Ługowska I, Woźniak W, Klepacka T, Michalak E, Szamotulska K. A prognostic evaluation of vascular endothelial growth factor in children and young adults with osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Jul 15;57(1):63-8. doi: 10.1002/pbc.23021.
- Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene.* 2008 Mar 13;27(12):1749-58
- Ma Y, Cunningham ME, Wang X, Ghosh I, Regan L, Longley BJ. Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J Biol Chem.* 1999 May 7;274(19):13399-402.
- Macheda ML, Stacker SA. Importance of Wnt signaling in the tumor stroma microenvironment. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008 Sep;8(6):454-65. Review.
- Maffucci T, Cooke FT, Foster FM, Traer CJ, Fry MJ, Falasca M. Class II phosphoinositide 3-kinase defines a novel signaling pathway in cell migration. *J Cell Biol.* 2005 Jun 6;169(5):789-99.

- Mahadevan D, Cooke L, Riley C, Swart R, Simons B, Della Croce K, Wisner L, Iorio M, Shakalya K, Garewal H, Nagle R, Bearss D. A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*. 2007 Jun 7;26(27):3909-19.
- Malaval L, Wade-Gu  ye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, Laroche N, Roux JP, Burt-Pichat B, Duboeuf F, Boivin G, Jurdic P, Lafage-Proust MH, Am  d  e J, Vico L, Rossant J, Aubin JE. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med*. 2008 May 12;205(5):1145-53. doi: 10.1084/jem.20071294.
- Malempati S, Weigel B, Ingle AM, Ahern CH, Carroll JM, Roberts CT, Reid JM, Schmechel S, Voss SD, Cho SY, Chen HX, Krailo 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 Jan 20;30(3):256-62. doi: 10.1200/JCO.2011.37.4355.
- Manara MC, Nicoletti G, Zambelli D, Ventura S, Guerzoni C, Landuzzi L, Lollini PL, Maira SM, Garc  a-Echeverr  a C, Mercuri M, Picci P, Scotlandi K. NVP-BEZ235 as a new therapeutic option for sarcomas. *Clin Cancer Res*. 2010 Jan 15;16(2):530-40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0816.
- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000 Apr;21(2):115-37. Review.
- Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):98-105. doi: 10.1016/j.abb.2008.02.030. Review.
- Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, Evangelisti C. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec;1823(12):2168-78. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.017. Review.
- Martin SK, Fitter S, Bong LF, Drew JJ, Gronthos S, Shepherd PR, Zannettino AC. NVP-BEZ235, a dual pan class I PI3 kinase and mTOR inhibitor, promotes osteogenic differentiation in human mesenchymal stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2010 Oct;25(10):2126-37. doi: 10.1002/jbmr.114.
- Masson K, R  nnstrand L. Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-Kit and Flt3. *Cell Signal*. 2009 Dec;21(12):1717-26. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.06.002. Review.

- Matsuo K, Otaki N. Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases. *Cell Adh Migr*. 2012 Mar-Apr;6(2):148-56. doi: 10.4161/cam.20888. Review.
- McGary EC, Weber K, Mills L, Doucet M, Lewis V, Lev DC, Fidler IJ, Bar-Eli M. Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571. *Clin Cancer Res*. 2002 Nov;8(11):3584-91.
- Mendoza M, Khanna C. Revisiting the seed and soil in cancer metastasis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jul;41(7):1452-62. doi: 10.1016/j.biocel.2009.01.015. Review.
- Messerschmitt PJ, Rettew AN, Brookover RE, Garcia RM, Getty PJ, Greenfield EM. Specific tyrosine kinase inhibitors regulate human osteosarcoma cells in vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 2008 Sep;466(9):2168-75. doi: 10.1007/s11999-008-0338-9. Review.
- Micel LN, Tentler JJ, Smith PG, Eckhardt GS. Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 20;31(9):1231-8. doi: 10.1200/JCO.2012.44.0958. Review.
- Minozzi S, Catalano P, Caldarini C, Fornaciari G. Palaeopathology of human remains from the Roman Imperial Age. *Pathobiology*. 2012;79(5):268-83. doi: 10.1159/000338097.
- Mohseny AB, Hogendoorn PC. Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem Cells*. 2011 Mar;29(3):397-403. doi: 10.1002/stem.596. Review.
- Mohseny AB, Szuhai K, Romeo S, Buddingh EP, Briaire-de Bruijn I, de Jong D, van Pel M, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *J Pathol*. 2009 Nov;219(3):294-305. doi: 10.1002/path.2603.
- Moriceau G, Ory B, Mitrofan L, Riganti C, Blanchard F, Brion R, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, Denis MG, Shultz LD, Mönkkönen J, Rédini F, Heymann D. Zoledronic acid potentiates mTOR inhibition and abolishes the resistance of osteosarcoma cells to RAD001 (Everolimus): pivotal role of the prenylation process. *Cancer Res*. 2010 Dec 15;70(24):10329-39. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0578.
- Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Mariño G, Michaud M, Vitale I, Maiuri MC, Kroemer G. Oncosuppressive functions of autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Jun;14(11):2251-69. doi: 10.1089/ars.2010.3478. Review.

Mu X, Isaac C, Schott T, Huard J, Weiss K. Rapamycin Inhibits ALDH Activity, Resistance to Oxidative Stress, and Metastatic Potential in Murine Osteosarcoma Cells. *Sarcoma*. 2013;2013:480713. doi: 10.1155/2013/480713.

Mukherjee B, Tomimatsu N, Amancherla K, Camacho CV, Pichamoorthy N, Burma S. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 is a potent inhibitor of ATM- and DNA-PKCs-mediated DNA damage responses. *Neoplasia*. 2012 Jan;14(1):34-43.

Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci*. 2006 May;31(5):268-75. Review.

Naing A, LoRusso P, Fu S, Hong DS, Anderson P, Benjamin RS, Ludwig J, Chen HX, Doyle LA, Kurzrock R. Insulin growth factor-receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with refractory Ewing's sarcoma family tumors. *Clin Cancer Res*. 2012 May 1;18(9):2625-31. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0061.

Nakamura I, Sasaki T, Tanaka S, Takahashi N, Jimi E, Kurokawa T, Kita Y, Ihara S, Suda T, Fukui Y. Phosphatidylinositol-3 kinase is involved in ruffled border formation in osteoclasts. *J Cell Physiol*. 1997 Aug;172(2):230-9.

Nakano T, Tani M, Ishibashi Y, Kimura K, Park YB, Imaizumi N, Tsuda H, Aoyagi K, Sasaki H, Ohwada S, Yokota J. Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(7):665-74.

Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*. 2011 Sep 11;17(10):1231-4. doi: 10.1038/nm.2452.

Nanni P, Nicoletti G, Palladini A, Croci S, Murgo A, Ianzano ML, Grosso V, Stivani V, Antognoli A, Lamolinara A, Landuzzi L, di Tomaso E, Iezzi M, De Giovanni C, Lollini PL. Multiorgan metastasis of human HER-2+ breast cancer in *Rag2^{-/-};Il2rg^{-/-}* mice and treatment with PI3K inhibitor. *PLoS One*. 2012;7(6):e39626. doi: 10.1371/journal.pone.0039626.

Narayanan KR, Bansal D, Walia R, Sachdeva N, Bhansali A, Varma N, Marwaha RK. Growth failure in children with chronic myeloid leukemia receiving imatinib is due to disruption of GH/IGF-1 axis. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Jul;60(7):1148-53. doi: 10.1002/pbc.24397.

Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol*. 2013 Jun;228(6):1149-53. doi: 10.1002/jcp.24278. Review.

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(2):92-103.

Nicholson GC, Malakellis M, Collier FM, Cameron PU, Holloway WR, Gough TJ, Gregorio-King C, Kirkland MA, Myers DE. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clin Sci (Lond).* 2000 Aug;99(2):133-40.

Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkruis FJ, Thomas G. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 4;102(40):14238-43.

O'Sullivan S, Horne A, Wattie D, Porteous F, Callon K, Gamble G, Ebeling P, Browett P, Grey A. Decreased bone turnover despite persistent secondary hyperparathyroidism during prolonged treatment with imatinib. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Apr;94(4):1131-6. doi: 10.1210/jc.2008-2324.

O'Sullivan S, Naot D, Callon K, Porteous F, Horne A, Wattie D, Watson M, Cornish J, Browett P, Grey A. Imatinib promotes osteoblast differentiation by inhibiting PDGFR signaling and inhibits osteoclastogenesis by both direct and stromal cell-dependent mechanisms. *J Bone Miner Res.* 2007 Nov;22(11):1679-89.

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell.* 2002 Sep 20;110(6):775-87.

Okazaki K, Sagata N. The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *EMBO J.* 1995 Oct 16;14(20):5048-59.

Ory B, Moriceau G, Gobin B, Redini F, Heymann D. mTOR inhibitors (rapamycin and its derivatives) and nitrogen containing bisphosphonates: bi-functional compounds for the treatment of bone tumors. *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Ed Bentham, 2012, 6:189-202.

Ottewell PD, Deux B, Mönkkönen H, Cross S, Coleman RE, Clezardin P, Holen I. Differential effect of doxorubicin and zoledronic acid on intraosseous versus extraosseous breast tumor growth in vivo. *Clin Cancer Res.* 2008 Jul 15;14(14):4658-66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1545. (a)

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 Aug 20;100(16):1167-78. doi: 10.1093/jnci/djn240. (b)

Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl.* 1988;10:63-76. Review.

Ozaki K, Kadomoto R, Asato K, Tanimura S, Itoh N, Kohno M. ERK pathway positively regulates the expression of Sprouty genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Aug 3;285(5):1084-8.

Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology.* 1998 Jun;139(6):2659-61.

Pante G, Thompson J, Lamballe F, Iwata T, Ferby I, Barr FA, Davies AM, Maina F, Klein R. Mitogen-inducible gene 6 is an endogenous inhibitor of HGF/Met-induced cell migration and neurite growth. *J Cell Biol.* 2005 Oct 24;171(2):337-48.

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

Parkkila S, Innocenti A, Kallio H, Hilvo M, Scozzafava A, Supuran CT. The protein tyrosine kinase inhibitors imatinib and nilotinib strongly inhibit several mammalian alpha-carbonic anhydrase isoforms. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 Aug 1;19(15):4102-6. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.06.002.

Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene.* 2004 Oct 18;23(48):7906-9. Review.

Patnaik A, Appleman LJ, Mountz M, Ramanathan K, Beeram M, Tolcher AW, Papadopoulos KP, Lotze MT, Petro DP, Laymon C, Paige L, Rajagopalan P, Jeffers M, Roth D, Dubowy RL. A first-in-human phase I study of intravenous PI3K inhibitor BAY 80-6946 in patients with advanced solid tumors: Results of dose-escalation phase. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* May 2011 vol.29no.15_suppl3035.

Patterson RL, van Rossum DB, Nikolaidis N, Gill DL, Snyder SH. Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem Sci.* 2005 Dec;30(12):688-97. Review.

Paulson AK, Linklater ES, Berghuis BD, App CA, Oostendorp LD, Paulson JE, Pettinga JE, Melnik MK, Vande Woude GF, Graveel CR. MET and ERBB2 are coexpressed in ERBB2+ breast cancers and contribute to innate resistance. *Mol Cancer Res.* 2013 Jul 3.

- Pennock S, Wang Z. A tale of two Cbls: interplay of c-Cbl and Cbl-b in epidermal growth factor receptor downregulation. *Mol Cell Biol.* 2008 May;28(9):3020-37. doi: 10.1128/MCB.01809-07.
- Peyton JD, Rodon Ahnert J, Burris H, Britten C, Chen LC, Tabernero J, Duval V, Rouyrre N, Silva AP, Quadt C, Baselga J. A dose-escalation study with the novel formulation of the oral pan-class I PI3K inhibitor BEZ235, solid dispersion system (SDS) sachet, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 3066).
- Philip T, Blay JY, Brunat-Mentigny M, Carrie C, Chauvot P, Farsi F, Fervers B, Gentet JC, Giammarile F, Kolher R, Mathoulin S, Patricot LM, Thiesse P. [Standards, options and recommendations (SOR) for diagnosis, treatment and follow-up of osteosarcoma. Groupe de travail SOR]. *Bull Cancer.* 1999 Feb;86(2):159-76. Review. French. Erratum in: *Bull Cancer* 1999 Mar;86(3):317.
- Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis.* 2007 Jan 23;2:6. Review.
- Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:503-33. Review.
- Pierotti MA, Tamborini E, Negri T, Pricl S, Pilotti S. Targeted therapy in GIST: in silico modeling for prediction of resistance. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011 Mar;8(3):161-70. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.3. Review.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- Pleiman CM, Hertz WM, Cambier JC. Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science.* 1994 Mar 18;263(5153):1609-12.
- Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Sep;1813(9):1619-33. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.12.012.
- Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, Reeve J. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J.* 2005 Nov;19(13):1842-4.
- Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* 2008 Sep;8(3):224-36. doi: 10.1016/j.cmet.2008.07.007.

- Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem*. 2000 Apr 14;275(15):10761-6.
- Qayum N, Im J, Stratford MR, Bernhard EJ, McKenna WG, Muschel RJ. Modulation of the tumor microvasculature by phosphoinositide-3 kinase inhibition increases doxorubicin delivery in vivo. *Clin Cancer Res*. 2012 Jan 1;18(1):161-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1413.
- Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*. 2010 Aug 13;285(33):25103-8. doi: 10.1074/jbc.R109.041087. Review.
- Rettew AN, Young ED, Lev DC, Kleinerman ES, Abdul-Karim FW, Getty PJ, Greenfield EM. Multiple receptor tyrosine kinases promote the in vitro phenotype of metastatic human osteosarcoma cell lines. *Oncogenesis*. 2012 Nov 19;1:e34. doi: 10.1038/oncsis.2012.34.
- Riggi N, Stamenkovic I. The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett*. 2007 Aug 28;254(1):1-10.
- Rikhof B, de Jong S, Suurmeijer AJ, Meijer C, van der Graaf WT. The insulin-like growth factor system and sarcomas. *J Pathol*. 2009 Mar;217(4):469-82. doi: 10.1002/path.2499.
- Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int*. 2010 Sep;21(9):1457-69. doi: 10.1007/s00198-010-1194-5.
- Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone*. 1992;13 Suppl 1:S3-6. Review.
- Rodriguez-Viciano P, Sabatier C, McCormick F. Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol*. 2004 Jun;24(11):4943-54.
- Romeo Y, Zhang X, Roux PP. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem J*. 2012 Jan 15;441(2):553-69. doi: 10.1042/BJ20110289. Review.
- Roper J, Richardson MP, Wang WV, Richard LG, Chen W, Coffee EM, Sinnamon MJ, Lee L, Chen PC, Bronson RT, Martin ES, Hung KE. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 induces tumor regression in a genetically engineered mouse model of PIK3CA wild-type colorectal cancer. *PLoS One*. 2011;6(9):e25132. doi: 10.1371/journal.pone.0025132.
- Rosen G, Caparros B, Huvos AG, Kosloff C, Nirenberg A, Cacavio A, Marcove RC, Lane JM, Mehta B, Urban C. Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. *Cancer*. 1982 Mar 15;49(6):1221-30.

Rosen G, Suwansirikul S, Kwon C, Tan C, Wu SJ, Beattie EJ Jr, Murphy ML. High-dose methotrexate with citrovorum factor rescue and adriamycin in childhood osteogenic sarcoma. *Cancer*. 1974 Apr;33(4):1151-63.

Rousselle AV, Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone*. 2002 Apr;30(4):533-40. Review.

Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Jun;68(2):320-44. Review.

Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest*. 1991 Jan;87(1):1-5. Review.

Sadowski L, Pilecka I, Miaczynska M. Signaling from endosomes: location makes a difference. *Exp Cell Res*. 2009 May 15;315(9):1601-9. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.09.021. Review.

Salphati L, Pang J, Plise EG, Chou B, Halladay JS, Olivero AG, Rudewicz PJ, Tian Q, Wong S, Zhang X. Preclinical pharmacokinetics of the novel PI3K inhibitor GDC-0941 and prediction of its pharmacokinetics and efficacy in human. *Xenobiotica*. 2011 Dec;41(12):1088-99. doi: 10.3109/00498254.2011.603384.

Sampson VB, Gorlick R, Kamara D, Anders Kolb E. A review of targeted therapies evaluated by the pediatric preclinical testing program for osteosarcoma. *Front Oncol*. 2013;3:132. doi: 10.3389/fonc.2013.00132.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004 Apr 23;304(5670):554.

Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003 Aug;145(1):1-30. Review.

Sano T, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Nanjo S, Yamada T, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S. The novel phosphoinositide 3-kinase-mammalian target of rapamycin inhibitor, BEZ235, circumvents erlotinib resistance of epidermal growth factor receptor mutant lung cancer cells triggered by hepatocyte growth factor. *Int J Cancer*. 2013 Jul 15;133(2):505-13. doi: 10.1002/ijc.28034.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.

Sasaki A, Taketomi T, Kato R, Saeki K, Nonami A, Sasaki M, Kuriyama M, Saito N, Shibuya M, Yoshimura A. Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat Cell Biol.* 2003 May;5(5):427-32.

Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, Itoh B, Wang J, Komatsu Y, Yang YR, Hikasa H, Horie Y, Yamashita T, Kamijo T, Zhang Y, Zhu Y, Prives C, Nakano T, Mak TW, Sasaki T, Maehama T, Mori M, Suzuki A. Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nat Med.* 2011 Jul 31;17(8):944-51. doi: 10.1038/nm.2392.

Schajowicz F. *Histological typing of bone tumors. 2nd edn, Berlin, Springer-Verlag, 1993, 128 pages, DM89.00.*

Schieke SM, Finkel T. Mitochondrial signaling, TOR, and life span. *Biol Chem.* 2006 Oct-Nov;387(10-11):1357-61. Review.

Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):211-25. Review.

Schneck H, Blassl C, Meier-Stiegen F, Neves RP, Janni W, Fehm T, Neubauer H. Analysing the mutational status of PIK3CA in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Mol Oncol.* 2013 Jul 13. doi.pii: S1574-7891(13)00092-6. 10.1016/j.molonc.2013.07.007

Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol.* 1998 Feb;18(2):790-8.

Servier : <http://smart.servier.fr/servier-medical-art>

Shanware NP, Bray K, Abraham RT. The PI3K, metabolic, and autophagy networks: interactive partners in cellular health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:89-106. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134717. Review.

Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Nov;2(11):827-37. Review.

Shepherd PR. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand.* 2005 Jan;183(1):3-12. Review.

Singh A, Mehdi AA, Srivastava RN, Verma NS. Immunoregulation of bone remodelling. *Int J Crit Illn Inj Sci.* 2012 May;2(2):75-81. doi: 10.4103/2229-5151.97271.

Slessareva JE, Routt SM, Temple B, Bankaitis VA, Dohlman HG. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell*. 2006 Jul 14;126(1):191-203.

Smith GC, Ong WK, Costa JL, Watson M, Cornish J, Grey A, Gamble GD, Dickinson M, Leung S, Rewcastle GW, Han W, Shepherd PR. Extended treatment with selective PI 3-kinase and mTOR inhibitors has effects on metabolism, growth, behaviour and bone strength. *FEBS J*. 2013 Jul 9. doi: 10.1111/febs.12428.

Smithey BE, Pappo AS, Hill DA. C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol*. 2002 Apr;26(4):486-92.

So L, Yea SS, Oak JS, Lu M, Manmadhan A, Ke QH, Janes MR, Kessler LV, Kucharski JM, Li LS, Martin MB, Ren P, Jessen KA, Liu Y, Rommel C, Fruman DA. Selective inhibition of phosphoinositide 3-kinase p110 α preserves lymphocyte function. *J Biol Chem*. 2013 Feb 22;288(8):5718-31. doi: 10.1074/jbc.M112.379446.

Sopasakis VR, Liu P, Suzuki R, Kondo T, Winnay J, Tran TT, Asano T, Smyth G, Sajan MP, Farese RV, Kahn CR, Zhao JJ. Specific roles of the p110 α isoform of phosphatidylinositol 3-kinase in hepatic insulin signaling and metabolic regulation. *Cell Metab*. 2010 Mar 3;11(3):220-30. doi: 10.1016/j.cmet.2010.02.002.

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 1998 Oct 2;95(1):29-39.

Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nürnberg B, et al. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science*. 1995 Aug 4;269(5224):690-3.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*. 1999 Jun;20(3):345-57. Review.

Sulzbacher I, Birner P, Dominkus M, Pichlhofer B, Mazal PR. Expression of platelet-derived growth factor- α receptor in human osteosarcoma is not a predictor of outcome. *Pathology*. 2010 Dec;42(7):664-8. doi: 10.3109/00313025.2010.520310.

Sulzbacher I, Birner P, Trieb K, Träxler M, Lang S, Chott A. Expression of platelet-derived growth factor-AA is associated with tumor progression in osteosarcoma. *Mod Pathol*. 2003 Jan;16(1):66-71.

Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta*. 2001 Nov;313(1-2):95-105.

Tanaka-Kamioka K, Kamioka H, Ris H, Lim SS. Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J Bone Miner Res*. 1998 Oct;13(10):1555-68.

Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol*. 2003 Aug 5;13(15):1259-68.

Ten Freyhaus H, Dumitrescu D, Berghausen E, Vantler M, Caglayan E, Rosenkranz S. Imatinib mesylate for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012 Jan;21(1):119-34. doi: 10.1517/13543784.2012.632408. Review.

Thompson WR, Rubin CT, Rubin J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene*. 2012 Jul 25;503(2):179-93. doi: 10.1016/j.gene.2012.04.076. Review.

Thoresen SB, Pedersen NM, Liestøl K, Stenmark H. A phosphatidylinositol 3-kinase class III sub-complex containing VPS15, VPS34, Beclin 1, UVRAG and BIF-1 regulates cytokinesis and degradative endocytic traffic. *Exp Cell Res*. 2010 Dec 10;316(20):3368-78. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.07.008.

Tibullo D, Giallongo C, La Cava P, Berretta S, Stagno F, Chiarenza A, Conticello C, Palumbo GA, Di Raimondo F. Effects of imatinib mesylate in osteoblastogenesis. *Exp Hematol*. 2009 Apr;37(4):461-8. doi: 10.1016/j.exphem.2008.12.008.

Toppets V, Pastoret V, De Behr V, Antoine N, Dessy C, Gabriel A. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann. Méd. Vét.*, 2004, 148:1-13.

Trieb K, Blahovec H. Suramin suppresses growth, alkaline-phosphatase and telomerase activity of human osteosarcoma cells in vitro. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Jul;35(7):1066-70.

Trivier E, Ganesan TS. RYK, a catalytically inactive receptor tyrosine kinase, associates with EphB2 and EphB3 but does not interact with AF-6. *J Biol Chem*. 2002 Jun 21;277(25):23037-43.

Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Dec;11(12):834-48. doi: 10.1038/nrm3012. Review.

- Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci.* 1998;3(6):346-55. Review.
- Uesugi M, Koshino T, Mitsugi N, Hiruma T. Predictive value of serum immunosuppressive acidic protein for lung metastasis after amputation of murine osteosarcoma of the lower limb. *Cancer Lett.* 2000 Jul 31;155(2):169-72.
- Ulici V, Hoenselaar KD, Agoston H, McErlain DD, Umoh J, Chakrabarti S, Holdsworth DW, Beier F. The role of Akt1 in terminal stages of endochondral bone formation: angiogenesis and ossification. *Bone.* 2009 Dec;45(6):1133-45. doi: 10.1016/j.bone.2009.08.003.
- Unni KK. Dahlin's bone tumors : general aspects and data on 11,087 cases. 5th ed. 1996. Philadelphia, Lippincott-Raven.
- Vadas O, Burke JE, Zhang X, Berndt A, Williams RL. Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci Signal.* 2011 Oct 18;4(195):re2. doi: 10.1126/scisignal.2002165. Review.
- Vandyke K, Fitter S, Dewar AL, Hughes TP, Zannettino AC. Dysregulation of bone remodeling by imatinib mesylate. *Blood.* 2010 Jan 28;115(4):766-74. doi: 10.1182/blood-2009-08-237404. Review.
- Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J, Waterfield MD. P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 29;94(9):4330-5.
- Verstraete K, Savvides SN. Extracellular assembly and activation principles of oncogenic class III receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Cancer.* 2012 Nov;12(11):753-66. doi: 10.1038/nrc3371. Review.
- Wadayama B, Toguchida J, Shimizu T, Ishizaki K, Sasaki MS, Kotoura Y, Yamamuro T. Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res.* 1994 Jun 1;54(11):3042-8.
- Wagner EF. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis.* 2002 Nov;61 Suppl 2:ii40-2. Review.
- Wagner ER, Luther G, Zhu G, Luo Q, Shi Q, Kim SH, Gao JL, Huang E, Gao Y, Yang K, Wang L, Teven C, Luo X, Liu X, Li M, Hu N, Su Y, Bi Y, He BC, Tang N, Luo J, Chen L, Zuo G, Rames R, Haydon RC, Luu HH, He TC. Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma. *Sarcoma.* 2011;2011:325238. doi: 10.1155/2011/325238.

- Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF. The antiapoptotic gene *mcl-1* is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol.* 1999 Sep;19(9):6195-206.
- Wang K, Zhuang Y, Liu C, Li Y. Inhibition of c-Met activation sensitizes osteosarcoma cells to cisplatin via suppression of the PI3K-Akt signaling. *Arch Biochem Biophys.* 2012 Oct 1;526(1):38-43. doi: 10.1016/j.abb.2012.07.003.
- Wang WJ, Long LM, Yang N, Zhang QQ, Ji WJ, Zhao JH, Qin ZH, Wang Z, Chen G, Liang ZQ. NVP-BEZ235, a novel dual PI3K/mTOR inhibitor, enhances the radiosensitivity of human glioma stem cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin.* 2013 May;34(5):681-90. doi: 10.1038/aps.2013.22.
- Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J.* 2001 Aug 15;20(16):4370-9.
- Wang Y, Mandal D, Wang S, Kleinerman ES, Pollock RE, Lev D, Hayes-Jordan A. Platelet-derived growth factor receptor beta inhibition increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) sensitivity: imatinib and TRAIL dual therapy. *Cancer.* 2010 Aug 15;116(16):3892-902. doi: 10.1002/cncr.25107.
- Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Möhle-Steinlein U, Rütther U, Wagner EF. Bone and haematopoietic defects in mice lacking *c-fos*. *Nature.* 1992 Dec 24-31;360(6406):741-5.
- Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H, Garcia KC. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron.* 2007 Jan 4;53(1):25-38.
- Wei H, Zhao MQ, Dong W, Yang Y, Li JS. Expression of c-kit protein and mutational status of the c-kit gene in osteosarcoma and their clinicopathological significance. *J Int Med Res.* 2008 Sep-Oct;36(5):1008-14.
- Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science.* 2002 Jul 5;297(5578):63-4.
- Wiley HS. Anomalous binding of epidermal growth factor to A431 cells is due to the effect of high receptor densities and a saturable endocytic system. *J Cell Biol.* 1988 Aug;107(2):801-10.
- Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Rédini F. Regulation of osteoclast protease expression by RANKL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 24;310(3):774-8.

- Wong ES, Fong CW, Lim J, Yusoff P, Low BC, Langdon WY, Guy GR. Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *EMBO J*. 2002 Sep 16;21(18):4796–808.
- Wouda RR, Bansraj MR, de Jong AW, Noordermeer JN, Fradkin LG. Src family kinases are required for WNT5 signaling through the Derailed/RYK receptor in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Development*. 2008 Jul;135(13):2277–87. doi: 10.1242/dev.017319.
- Wu X, Cai ZD, Lou LM, Zhu YB. Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients. *Cancer Epidemiol*. 2012 Apr;36(2):212–6. doi: 10.1016/j.canep.2011.08.002.
- Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5545–55.
- Xia C, Meng Q, Cao Z, Shi X, Jiang BH. Regulation of angiogenesis and tumor growth by p110 alpha and AKT1 via VEGF expression. *J Cell Physiol*. 2006 Oct;209(1):56–66.
- Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 Aug;8(4):393–412. doi: 10.1016/j.coph.2008.08.004. Review.
- Yarmish G, Klein MJ, Landa J, Lefkowitz RA, Hwang S. Imaging characteristics of primary osteosarcoma: nonconventional subtypes. *Radiographics*. 2010 Oct;30(6):1653–72. doi: 10.1148/rg.306105524. Review.
- Ying H, Zheng H, Scott K, Wiedemeyer R, Yan H, Lim C, Huang J, Dhakal S, Ivanova E, Xiao Y, Zhang H, Hu J, Stommel JM, Lee MA, Chen AJ, Paik JH, Segatto O, Brennan C, Elferink LA, Wang YA, Chin L, DePinho RA. Mig-6 controls EGFR trafficking and suppresses gliomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 13;107(15):6912–7. doi: 10.1073/pnas.0914930107.
- Yoshitani K, Honoki K, Morishita T, Kido A, Miyauchi Y, Mii Y, Takakura Y. Growth inhibition of rat osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma cells by tyrosine kinase inhibitor STI571. *In Vivo*. 2003 May–Jun;17(3):255–8.
- Yu W, Chen Z, Zhang J, Zhang L, Ke H, Huang L, Peng Y, Zhang X, Li S, Lahn BT, Xiang AP. Critical role of phosphoinositide 3-kinase cascade in adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biochem*. 2008 Mar;310(1–2):11–8.

- Yu XW, Wu TY, Yi X, Ren WP, Zhou ZB, Sun YQ, Zhang CQ. Prognostic significance of VEGF expression in osteosarcoma: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2013 Aug 2.
- Yuan TL, Choi HS, Matsui A, Benes C, Lifshits E, Luo J, Frangioni JV, Cantley LC. Class 1A PI3K regulates vessel integrity during development and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 15;105(28):9739-44. doi: 10.1073/pnas.0804123105.
- Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I, Schlessinger J. Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell*. 2007 Jul 27;130(2):323-34.
- Zeng S, Xu Z, Lipkowitz S, Longley JB. Regulation of stem cell factor receptor signaling by Cbl family proteins (Cbl-b/c-Cbl). *Blood*. 2005 Jan 1;105(1):226-32.
- Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*. 2006 Jun 16;125(6):1137-49.
- Zhang YX, van Oosterwijk JG, Sicinska E, Moss S, Remillard SP, van Wezel T, Bühnenmann C, Hassan AB, Demetri GD, Bovée JV, Wagner AJ. Functional profiling of receptor tyrosine kinases and downstream signaling in human chondrosarcomas identifies pathways for rational targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2013 Jul 15;19(14):3796-807. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3647.
- Zhao G, Cai C, Yang T, Qiu X, Liao B, Li W, Ji Z, Zhao J, Zhao H, Guo M, Ma Q, Xiao C, Fan Q, Ma B. MicroRNA-221 induces cell survival and cisplatin resistance through PI3K/Akt pathway in human osteosarcoma. *PLoS One*. 2013;8(1):e53906. doi: 10.1371/journal.pone.0053906. Erratum in: *PLoS One*. 2013;8(5). doi:10.1371/annotation/f47e2af6-da90-40ee-871c-f9ed6f58a48c.
- Zhao JJ, Cheng H, Jia S, Wang L, Gjoerup OV, Mikami A, Roberts TM. The p110alpha isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 31;103(44):16296-300.
- Zhou Q, Deng Z, Zhu Y, Long H, Zhang S, Zhao J. mTOR/p70S6K signal transduction pathway contributes to osteosarcoma progression and patients' prognosis. *Med Oncol*. 2010 Dec;27(4):1239-45. doi: 10.1007/s12032-009-9365-y.
- Zhu JX, Goldoni S, Bix G, Owens RT, McQuillan DJ, Reed CC, Iozzo RV. Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis. *J Biol Chem*. 2005 Sep 16;280(37):32468-79.

Zhu W, Fu W, Hu L. NVP-BEZ235, Dual Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor, Prominently Enhances Radiosensitivity of Prostate Cancer Cell Line PC-3. *Cancer Biother Radiopharm*. 2013 Jun 14.

Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*. 1999 Nov 26;286(5445):1741-4.

Zwang Y, Yarden Y. Systems biology of growth factor-induced receptor endocytosis. *Traffic*. 2009 Apr;10(4):349-63. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00870.x.

APPROCHES THERAPEUTIQUES DES OSTEOSARCOMES PAR CIBLAGE DES ACTIVITES KINASES

Mots clés : ostéosarcome, thérapie ciblée, inhibiteur des récepteur tyrosine kinase, inhibiteur de PI3K/mTOR, inhibiteur de PI3K, tissu osseux, modèles animaux

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes et est caractérisé par la production de tissu ostéoïde tumoral avec ou sans lésions ostéolytiques. Malgré des avancées en termes de chimiothérapie et de chirurgie, le taux de survie des patients reste inchangé depuis plusieurs années. L'absence de réponse aux drogues et l'établissement de résistance montre l'urgence d'explorer de nouvelles voies thérapeutiques. Durant la dernière décade, les avancées biologiques et technologiques ont permis l'émergence de nouvelles thérapies ciblées. Ces drogues inhibitrices sont regroupées en 2 familles majeures (anticorps monoclonaux et petites molécules inhibitrices des activités tyrosine kinase) et ciblent spécifiquement un acteur clé du développement tumoral, et montrent de plus en plus un intérêt majeur dans le ciblage du microenvironnement tumoral. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux petites molécules inhibitrices des activités tyrosine kinase: l'imatinib mésylate, inhibiteur des plusieurs récepteurs tyrosine kinase, le NVP-BEZ235, inhibiteur de PI3K et de mTOR, et le BYL719, inhibiteur de la sous-unité p110 α de l'enzyme PI3K. Nos résultats ont révélé un effet anti-tumoral direct de ces inhibiteurs *in vitro* ainsi que *in vivo* dans plusieurs modèles précliniques d'ostéosarcome. De plus, des études histomorphométriques ont montré l'implication de ces inhibiteurs dans le ciblage de l'angiogenèse tumorale. Nous avons également pu mettre en évidence un impact de ces molécules sur la physiologie osseuse. L'ensemble des résultats de ce travail permet donc de mettre en avant l'intérêt thérapeutique des thérapies ciblées dans l'ostéosarcome.

Keywords: osteosarcoma, targeted therapy, tyrosine kinase receptor inhibitor, PI3K/mTOR inhibitor, PI3K inhibitor, bone, preclinical models.

Osteosarcoma is the most common type of primary malignant bone tumor, characterized by osteoid production with or without osteolytic lesions. Despite recent improvements in chemotherapy and surgery, the survival rate remains unchanged for several years. Due to the lack of response to drugs and establishment of resistance there is an important need to explore new therapeutic approaches. During the last decade, biological and technological advances enabled the emergence of targeted therapies. These inhibitors are divided into 2 families (monoclonal antibodies and small molecule inhibitors of tyrosine kinase activities) and specifically target a key player in tumor development and show an increasing interest in targeting the tumor microenvironment. In this context, we are interested in small molecule inhibitors of tyrosine kinase activities: imatinib mesylate, an inhibitor of several tyrosine kinase receptors, NVP-BEZ235, an inhibitor of both PI3K and mTOR, and BYL719, a specific inhibitor of p110 α subunit of PI3K enzyme. Our results showed direct *in vitro* and *in vivo* anti-tumoral effects of these inhibitors in several preclinical models of osteosarcoma. In addition, histomorphometric studies have shown the involvement of these inhibitors in targeting tumor angiogenesis. We were also able to demonstrate an impact of these drugs on bone biology. Taken together, these results highlight the therapeutic benefit of targeted therapy in osteosarcoma.

Béregère GOBIN

48 Ter route de Nantes

44120 VERTOU