

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : *Cancérologie*

Par

**Brice Wilfried MOUKENGUE BOUNGORI**

## **Ciblage thérapeutique de la réponse au stress cellulaire dans l'Ostéosarcome**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 15 novembre 2019

Unité de recherche : UMR 1238 Phy-OS Sarcomes osseux et remodelage des tissus calcifiés

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Heidy SCHMID-ANTOMARCHI  
Gaetan JEGO

Directrice de recherche CNRS UMR 7277 Université de Nice  
Maitre de conférences des universités, Université de Bourgogne

### **Composition du Jury :**

Présidente : Françoise RÉDINI

Directrice de recherche, Université de Nantes

Dir. de thèse : Benjamin ORY  
Co-en. de thèse : François LAMOUREUX

Maitre de conférences des universités, Université de Nantes  
Chargé de recherche, Université de Nantes

# REMERCIEMENTS

Les projets décrits dans cette thèse ont été réalisés avec le support de :



Je tiens à remercier:

Le Dr Benjamin ORY pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, et pour m'avoir également encadré lors de mes deux premières années dans ce laboratoire.

Le Dr François LAMOUREUX pour avoir accepté de m'encadrer en master II et pour ces trois années de thèse.

Madame SCHMID-ANTOMARCHI Heidi et Monsieur JEGO Gaetan pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Monsieur TIRODE Franck pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

Madame RÉDINI Françoise pour m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire mais également pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

Monsieur HEYMANN Dominique pour m'avoir accueilli et encadré en Licence 3.

Aux docteurs VERRECCHIA Franck et VALETTE François pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse.

Madame LECOINTE Estelle de l'association infosarcomes, les proches de Guillaume PERROT et l'association Boogie Wooguillaume pour leur accueil à Roanne et leur confiance.

Un grand merci à Robel pour les analyses bio-informatiques, pour ses nombreux conseils et explications dans ce domaine et pour la correction de la thèse. Merci d'avoir bien voulu souvent répéter les concepts obscurs pour le pauvre biologiste que je suis. Merci également à KOLLI Souad et SÉRANDOUR Aurélien pour les analyses bio-informatiques.

Merci à Céline, Séverine et Jérôme pour les expériences d'immunohistochimie et de micro-Ct que je n'aurais pas pu réaliser seul.

Merci à Marc, Thibaut, Steven, pour leurs nombreux conseils sur les travaux, ou tout simplement pour les discussions sur les difficultés rencontrées lors de ces trois années de thèse.

Un grand merci à Camille pour avoir toléré que je la suive partout en L3 et M1, et pour m'avoir beaucoup appris.

Merci à mon voisin de bureau (145 du milieu) Geoffroy pour sa bonne humeur qui n'a pas faiblit malgré les difficultés de la thèse. Bonne chance au Canada. Je me marre déjà à t'imaginer avec l'accent québécois.

Merci à Luciano pour ses conseils et pour les mois passés à réviser les biostatistiques avec Ange, mais aussi les cours d'histologie (trop souvent la veille pour le lendemain).

Merci à Régis pour ses nombreux conseils lors de ces 5 années au laboratoire. Merci d'être une grande part de la bonne humeur de ce laboratoire, et merci d'avoir permis à de nombreux stagiaires (dont moi) de s'intégrer plus facilement.

Merci à Sarah R, Mathilde, Sarah M, Julien, Mélanie, Louise, Paul, Jorge pour la bonne humeur dans le labo et en dehors, lors de soirées que j'ai (trop) souvent évité.

Merci à Bénédicte notamment pour avoir bien voulu me former à la production virale ainsi que pour ses conseils.

Merci à Fred B, Fred L, Valérie, Isabelle, Pierre pour leurs questions pertinentes lors des réunions. Merci aussi à Bénédicte B que j'ai trop souvent harcelé pour sa carte.

Merci à Sandrine et Marie-Hélène pour les commandes effectuées malgré les erreurs sur le fichier commande, les informations manquantes, les bons de livraison perdus... et merci à Laurent notamment pour avoir accepté de jouer le père noël en délivrant les anticorps souvent très attendus.

Merci à Marie que j'ai submergé de mails et de messages pour lancer les expériences de migration.

Merci plus généralement aux membres (présents/passés) de Phy-OS/LPRO dont Alexandre, Émilien, Morgane, Maryne, Adèle, Romain, Marie-Astrid, Kevin, Matthias... qui ont rendu ces trois années de thèse plus deux années de stage plus agréables.

Merci à Anthony, Amaury et Tom pour avoir traversé avec moi les difficultés des révisions et des examens.

Merci à Philippe pour les périodes de détente (indispensables) passées à gratter sur de la bossa ou du jazz.

Merci enfin aux membres de ma famille, ya Charlène mais aussi Hubert qui m'ont énormément soutenu durant ces années. Merci à leurs deux petits anges qui me rendent le sourire à chaque fois, même quand je déprime.

Merci à mes mères Honorine et Georgette, et un grand merci à mon père qui a énormément sacrifié pour faire de moi ce que je suis aujourd'hui.

# Sommaire

REMERCIEMENTS .....	1
ABRÉVIATIONS.....	8
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	11
Généralités sur le tissu osseux .....	11
Description générale .....	11
La matrice osseuse .....	12
Les fonctions du tissu osseux .....	12
Les Cellules osseuses .....	13
Le remodelage osseux.....	16
L'ostéosarcome .....	20
Description brève .....	20
Épidémiologie.....	20
Origine de la pathologie .....	20
Tableau clinique .....	21
Diagnostic .....	21
Classification des OS.....	22
Classement des OS .....	24
Thérapies actuelles de l'OS .....	26
Les mécanismes de l'OS : Le cercle vicieux .....	28
Les mécanismes de l'OS : Atteintes génétiques.....	29
Les modèles d'étude de la maladie.....	36
Les nouvelles approches thérapeutiques dans l'OS.....	37
Le stress cellulaire .....	43
Le stress thermique (Heat-shock) .....	43
Le stress oxydatif (les ROS).....	45
Le stress du reticulum endoplasmique .....	49
L'hypoxie .....	50
Le rayonnement ultraviolet.....	51
Les mécanismes de protection contre le stress cellulaire .....	51

La heat-shock response .....	51
L'unfolded protein response .....	55
La protection contre les ROS : la voie NRF2-keap1 .....	56
La réponse à l'hypoxie : le facteur de transcription HIF-1 .....	58
Le stress dans le cancer .....	59
Objectifs de la thèse .....	64
INTRODUCTION PARTIE I : Implication de HSF1 dans le développement de l'Ostéosarcome	66
La protection cellulaire contre le stress : la Heat Shock Response.....	66
La structure du facteur de transcription HSF1 .....	66
L'Induction de HSF1 par le stress .....	67
La régulation de HSF1.....	69
Au-delà de la HSR : les autres rôles de HSF1.....	72
Implication de HSF1 dans les cancers .....	74
Les inhibiteurs de HSF1 .....	75
Objectifs de la partie I .....	78
RESULTATS PARTIE I .....	79
HSF1 est activé et surexprimé dans l'OS.....	79
L'inhibition de HSF1 réduit la prolifération et induit la mort dans un modèle in vitro d'OS .....	83
L'inhibition de HSF1 réduit la migration des cellules d'OS .....	89
L'inhibition de HSF1 réduit la croissance tumorale dans un modèle vivo d'OS .....	91
Le choc thermique modifie les sites de fixation de HSF1 dans les cellules HOS-MNNG .	92
HSF1 se lie à des sites différents de sa séquence consensus (HSE) .....	98
nTGrCTCAn .....	101
HSF1 régule un programme transcriptionnel dans l'OS, différent de la réponse au stress .....	102
Identification des partenaires protéiques de HSF1.....	109
DISCUSSION PARTIE I.....	117
INTRODUCTION PARTIE II : Ciblage de MTH1 dans l'Ostéosarcome .....	125
Rôle de MTH1 dans les cellules .....	125
MTH1 et la défense contre les ROS.....	126
MTH1 dans le cancer .....	128

Efficacité thérapeutique de l'inhibition de MTH1 dans les cancers .....	129
Objectif de la partie II.....	130
RESULTATS PARTIE II .....	131
MTH1 est surexprimé dans l'ostéosarcome.....	131
TH588 et TH1579, inhibiteurs de MTH1, réduisent la prolifération des cellules d'OS ..	133
TH1579 induit le blocage du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules d'OS par induction de dommages à l'ADN .....	137
TH1579 ralentit la croissance tumorale et augmente les dommages à l'ADN dans un modèle murin d'OS.....	144
TH1579 diminue la dissémination métastatique en inhibant la migration et l'angiogénèse des cellules d'OS.....	148
Effets de TH1579 sur l'ostéolyse tumorale .....	153
DISCUSSION PARTIE II.....	159
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	163
MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	167
Culture cellulaire .....	167
Transfection et transduction .....	167
Molécules chimiques.....	168
Test de viabilité et test clonogénique .....	168
Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.....	169
Extraction protéique, dosage protéique et test caspase .....	170
Co-immunoprécipitation et Western Blot .....	170
Extraction d'ARN, Reverse transcription et QPCR.....	172
Immunofluorescence et Proximity ligation assay (PLA).....	175
Migration et invasion .....	175
Test de comète (Comet assay) .....	176
Différenciation des ostéoclastes .....	177
Différenciation des ostéoblastes.....	177
Modèles in vivo .....	178
Modèle in vivo pour la quantification des CTC et DTC.....	178
Quantification des DTC et CTC (Parsotix).....	179
Test de migration chez le zebrafish.....	179
Analyse par microCt .....	180

Immunohistochimie .....	180
ChIP sequencing .....	181
Analyse du RNA sequencing .....	181
Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins (RIME) .....	182
Test statistiques.....	182
ANNEXES.....	183
Autres travaux réalisés durant la thèse .....	187
Analysis of mRNA, miRNA, and DNA in Bone Cells by RT-qPCR and In Situ Hybridization .....	187
Loss of miR-198 and -206 during primary tumor progression enables metastatic dissemination in human osteosarcoma .....	217
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	233



# ABRÉVIATIONS

AP-1 : Activator protein 1

ATF : Activating transcription factor

BiP : Binding immunoglobulin protein

BMP : Bone morphogenic protein

CIRC : Centre international de la recherche sur le cancer

CSM : CSF-1 : colony- stimulating factor 1

l'EGF : Epidermal growth factor

EGFR : Epidermal growth factor receptor

ERO1 $\alpha$  : Endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha

ETS : E26 transformation-specific

FGF: Fibroblast growth factor

FOS : FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog

GRP : Glucose-regulated protein

HGF : hepatocyte growth factor

HIF : Hypoxia-inducible factor

HSE : Heat-shock element

HSF : Heat-shock factor

HSP : Heat-shock protein

HSR : Heat-shock response

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MEC : Matrice extracellulaire

MSC : Mesenchymal stem cells (Cellules souches mésenchymateuses)

MTH1 : MutT Homolog 1

mTOR : Mammalian target of rapamycin

NFATC1 : Nuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1

NRF2 : NF-E2-related factor 2

NUDT : Nucleoside diphosphate linked moiety X-type motif

OPG : Osteoprotegerin

OS : Ostéosarcome

OSX : Osterix

PDGF : Platelet-derived growth factor

PERK : Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase

PGE2 : Prostaglandine E22

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PPAR $\gamma$  : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

RANKL : Receptor activator of NF-KB ligand

Rb : Retinoblastoma protein

ROS : Reactive oxygen species

RUNX2 : Runt-related transcription factor 2

TGF $\beta$  : Transforming growth factor

UPR : Unfolded protein response

l'UPS : Ubiquitin proteasome system

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Wnt : Wingless integration site

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

## Généralités sur le tissu osseux

### Description générale

Le tissu osseux est un tissu vivant, en perpétuel remaniement. C'est un tissu conjonctif spécialisé, caractérisé par la nature solide de la matrice extracellulaire. Il est composé d'une fraction organique et d'une fraction minérale (Figure 1). Il existe deux types de tissus osseux : l'os cortical dense qui représente environ 80 % de l'os mature, et l'os trabéculaire moins important en volume et plus poreux. Bien qu'ayant la même composition, ces deux formes ont des propriétés et des fonctions différentes.

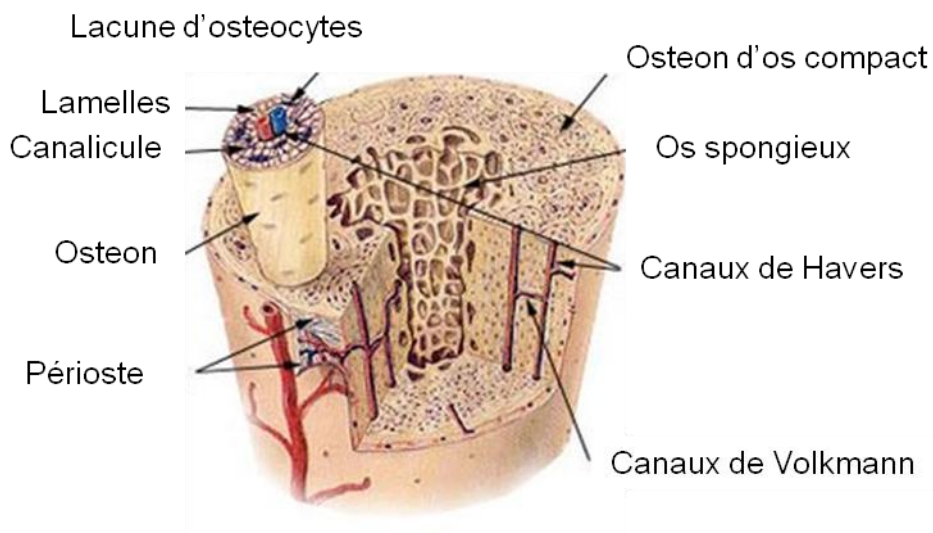


Figure 1 : Schéma de l'organisation du tissu osseux. Modifié de meddic.jp.

## La matrice osseuse

La matrice extracellulaire (MEC) de l'os comporte une phase minérale et une phase organique. La fraction minérale de l'os est une réserve d'ions, et est à l'origine de sa solidité (Viguet-Carrin et al., 2006). Elle est faite d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4][\text{OH}_2]_2$ ), de phosphate de calcium cristallisé, et concentre environ 99% du calcium, 85% du phosphore et 40 à 60% du sodium de l'organisme (Abou Neel et al., 2016; Bronner, 2001; Ramesh et al., 2018). Cette fonction de réservoir confère à l'os son rôle de régulateur du métabolisme des minéraux. De plus, la fraction minérale rend l'os opaque aux rayons X, permettant son observation par radiographie (Mashiatulla et al., 2017). La fraction organique est constituée à 80% de collagène (majoritairement de type I, 95% des collagènes) qui donne à l'os sa forme et lui permet de résister aux tensions (Niyibizi and Eyre, 1994; Viguet-Carrin et al., 2006). Les 10% restants sont composés de protéines non collagéniques qui interviennent dans l'organisation de la MEC ou le comportement des cellules osseuses. Il s'agit d'ostéocalcine, ostéonectine, des protéoglycanes... (Ducy et al., 1996; Fisher et al., 1983; Humphrey et al., 2013; Rosset and Bradshaw, 2016)

## **Les fonctions du tissu osseux**

Le tissu osseux possède 3 fonctions. Sa solidité lui confère une fonction mécanique, notamment un rôle de protection vis-à-vis des organes. Par exemple la boîte crânienne protège le cerveau et la cage thoracique protège les organes du médiastin et les poumons... De plus, l'ancrage du tissu musculaire strié sur l'os permet le mouvement du corps. Le tissu osseux participe également au contrôle du métabolisme phosphocalcique en libérant ou en stockant les minéraux lors du remodelage osseux. Cette fonction métabolique est partagée avec les reins et l'intestin (Abou Neel et al., 2016; Bronner, 2001; Ramesh et al., 2018). Enfin, la moelle osseuse est le siège de l'hématopoïèse (processus de production des cellules sanguines) chez l'adulte. Elle est l'unique siège des cellules souches hématopoïétiques après la naissance (Jiang et al., 2016; Travlos, 2006).

## Les Cellules osseuses

Les cellules de l'os sont d'origine mésenchymateuse ou hématopoïétique et sont responsables de sa formation et de son renouvellement. Elles sont de 4 types : Les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes et les ostéoclastes (Florencio-Silva et al., 2015).

### *Ostéoblastes*

Les ostéoblastes recouvrent la surface interne et externe de l'os. Ce sont des cellules ostéoformatrices provenant de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC pour mesenchymal stem cells) (Figure 2). La protéine RUNX2 (Runt-related transcription factor 2 aussi connue sous le nom de Core-binding factor alpha1, Cbfa1) est le facteur de transcription majeur de la différenciation des MSC en ostéoblastes. D'autres facteurs de transcriptions tels que Osterix (OSX) ou ATF (Activating transcription factor) 4 interviennent également dans ce processus (Nakashima et al., 2002; Yang et al., 2004). La différenciation ostéoblastique, peut être régulée par plusieurs voies telles que la voie canonique de Wnt (Wingless integration site) dont l'interruption chez les CSM conduit à une absence de différenciation ostéoblastique (Day et al., 2005). La voie des BMP (Bone Morphogenic Protein pathway) est également impliquée dans la différenciation ostéoblastique, notamment via la régulation de RUNX2 (Lee et al., 2000; Wu et al., 2007). Les ostéoblastes produisent les constituants organiques de la MEC, notamment le collagène de type 1. Elles présentent donc un cytoplasme riche en réticulum endoplasmique granuleux et un important appareil de golgi.

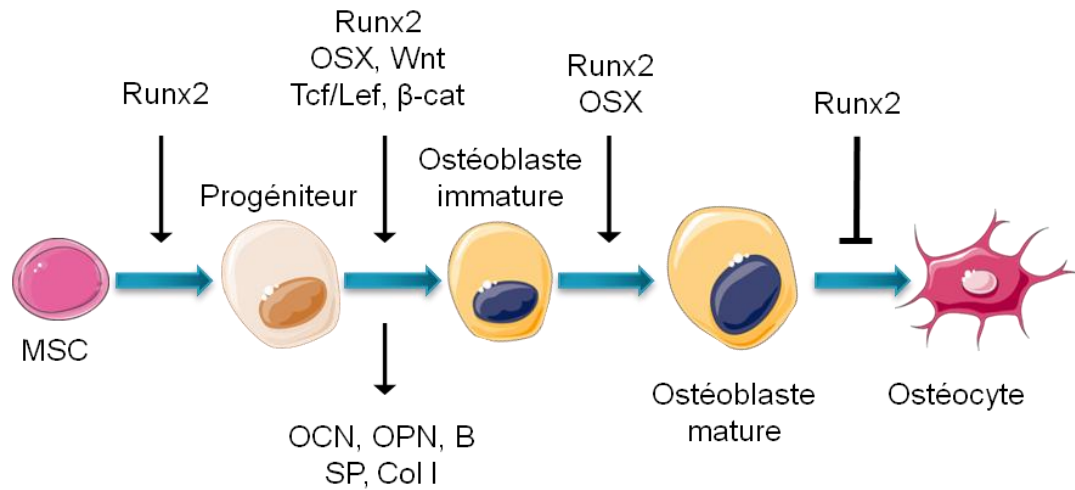


Figure 2 : Schéma de la différenciation ostéoblastique de la cellule souche mésenchymateuse à l'ostéocyte. Le facteur de transcription RUNX2 permet la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes matures, mais réprime la transformation ostéocytaire. MSC : Mesenchymal stem cell, OCN : ostéocalcine; OPN : ostéopontine, Col1 : Collagène 1, BSP : bone sialoprotein, RUNX2 : Runt-related transcription factor 2, Osterix : OSX, β-cat :β-Catenin, Tcf/Lef : T-cell factor/lymphoid enhancer factor. Adapté de (Komori, 2018).

Les ostéoblastes communiquent entre eux grâce à des jonctions communicantes (Gap junctions), des canaux de 2nm de diamètre formés de connexines, notamment la connexine 43. Ces jonctions communicantes permettent le passage par diffusion de petites molécules hydrophiles (moins de 1,2kDa) dont des messagers cytoplasmiques capables de réguler la formation osseuse (calcium, Inositol trisphosphate, adenosine monophosphate...)(Batra et al., 2012; Unger et al., 1999). Après la synthèse d'une nouvelle matrice osseuse, les ostéoblastes peuvent retourner à un état de repos (donnant les cellules bordantes), se transformer en ostéocytes, ou entrer en apoptose.

### Les cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes quiescents. Elles sont de forme aplatie, et tapissent l'os en absence de résorption osseuse (Miller et al., 1989). Ces cellules possèdent peu d'organites et communiquent entre elles et avec les ostéocytes par des jonctions communicantes(Aarden et al., 1994; Florencio-Silva et al., 2015). Les cellules bordantes régulent le remodelage de l'os notamment en empêchant l'accès des ostéoclastes à la

surface de l'os, ou en sécrétant des facteurs stimulant (RANKL receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand) ou inhibant (OPG osteoprotegerin) la résorption (Andersen et al., 2009; Florencio-Silva et al., 2015; Mosley, 2000).

### *Les Ostéocytes*

Les ostéocytes représentent 90% des cellules osseuses. Ce sont des ostéoblastes différenciés, qui ont perdu 70% de leur cytoplasme et organelles, du fait d'une production protéique amoindrie. Les ostéocytes sont emmurés dans la MEC osseuse, dans des logettes appelées ostéoplastes, et présentent de longs prolongements cytoplasmiques. Ces prolongements traversent les canalicules de la matrice osseuse et permettent aux ostéocytes d'établir des jonctions communicantes avec les cellules environnantes (ostéocytes, mais aussi ostéoblastes et cellules bordantes) (Rocheffort et al., 2010a). Les ostéocytes sont les senseurs des micro-dommages de la matrice osseuse, et les initiateurs de sa réparation par le remodelage osseux (Bonewald and Johnson, 2008; Plotkin et al., 2005; Rocheffort et al., 2010b). Ils régulent le recrutement, la différenciation et l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes via la production de BMP (bone morphogenetic proteins), Wnt, PGE2 (prostaglandine E2), modulant l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes (Hemmatian et al., 2017; Klein-Nulend et al., 2012).

### *Ostéoclastes*

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées polarisées responsables de la résorption de la matrice lors du remodelage osseux. Contrairement aux autres types de cellules osseuses, les ostéoclastes dérivent de précurseurs de la lignée hématopoïétique (Faulkner et al., 2019) (Figure 3). Sous l'effet de stimulation par des cytokines telles que le CSF-1 (colony-stimulating factor 1) ou RANKL, les précurseurs ostéoclastiques qui sont les monocytes/macrophages vont proliférer et fusionner (Paiva and Granjeiro, 2017; Yoshida et al., 1990) pour former des cellules de 3 à 20 noyaux pouvant atteindre 100 $\mu$ m de diamètre. Ces cellules sont riches en mitochondries et en lysosomes. À l'inverse, l'OPG sécrétée notamment par les lymphocytes B ou les cellules bordantes inhibe la différenciation



ostéoclastique (Raggatt and Partridge, 2010). Le facteur de transcription NFATC1 (nuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1) est crucial pour la différenciation et l'activation des ostéoclastes (Paiva and Granjeiro, 2017). Il est induit par les voies MAPK (mitogen-activated protein kinases), NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), AP-1 (Activator protein 1), après fixation de RANKL, et il régule l'expression des gènes de la différenciation ostéoclastique tels que la cathepsine K, TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) ou MMP9.

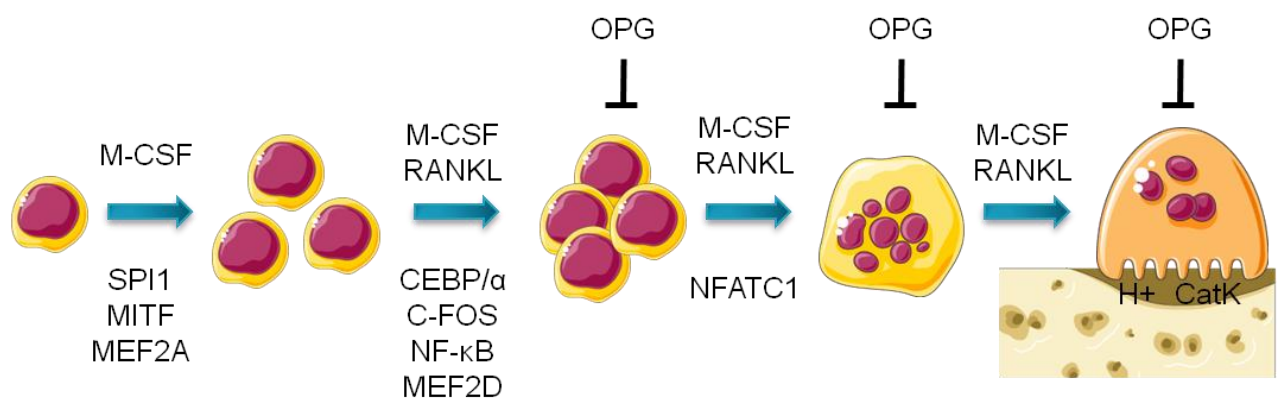


Figure 3 : Schéma de la différenciation ostéoclastique. M-CSF et RANKL induisent la différenciation ostéoclastique, qui est inhibée par OPG. MITF : microphthalmia transcription factor; NFATC1 : Nuclear Factor Of Activated T Cells 1; RANKL : Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor; MEF2A : myocyte enhancer factor 2; NF- $\kappa$ B : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; OPG : Osteoprotegerin, SPI1 : Spleen Focus Forming Virus (SFFV) Proviral Integration Oncogene, CEBP/α : CCAAT/enhancer-binding protein alpha. CatK : Cathepsin K, H<sup>+</sup> = ion hydrogen. Adapté de (Faulkner et al., 2019).

## Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus qui débute avant la naissance et se poursuit jusqu'à la mort des individus. Il permet de modifier la taille et la forme du tissu osseux, de réparer l'os ou de remplacer les tissus vieillissants. Ce processus est basé sur un équilibre entre la formation osseuse par les ostéoblastes et la résorption osseuse par les ostéoclastes. Un déséquilibre entre formation et résorption peut conduire au développement de pathologies telles que l'ostéoporose (formation < résorption) ou l'ostéopétrose (formation > résorption).

Le processus de remodelage osseux est constitué de 4 phases : l'activation, la résorption, l'inversion et la formation (Katsimbri, 2017) (Figure 4).

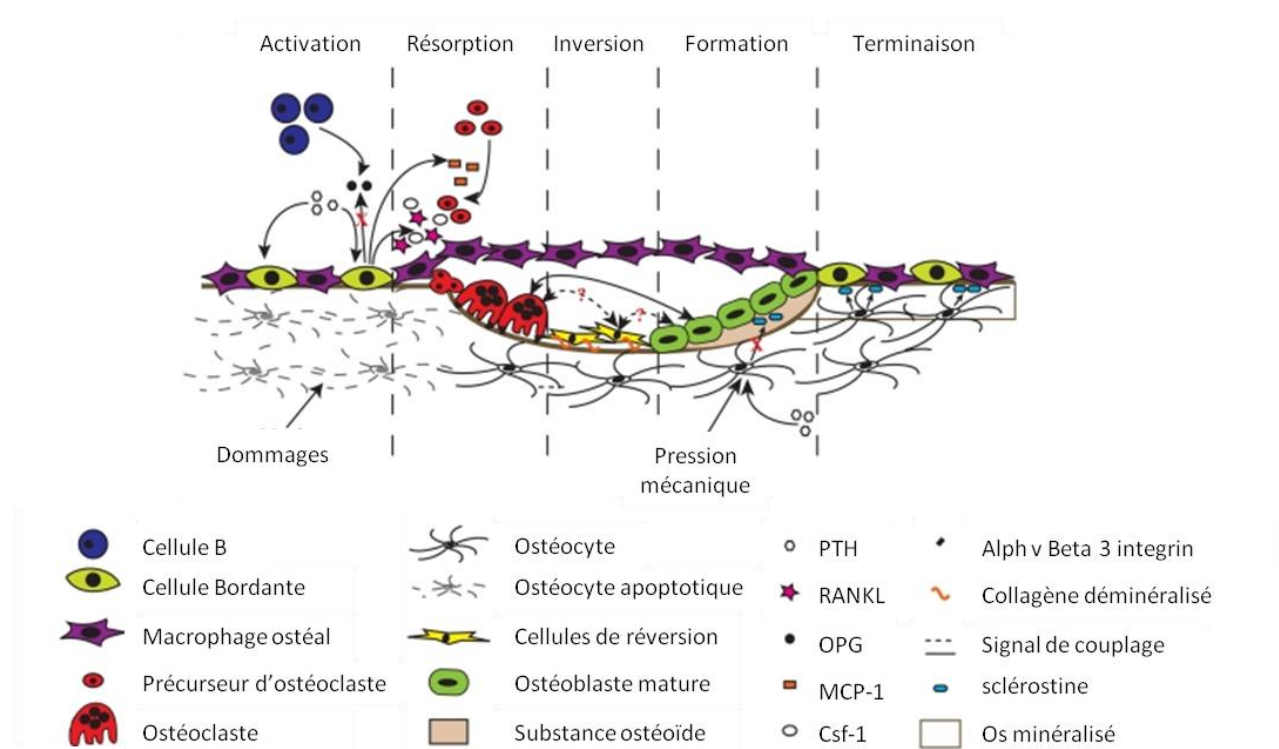


Figure 4 : Les différentes phases du remodelage osseux. Pendant la phase d'activation, les ostéoclastes sont recrutés et activés par RANKL. Ils résorbent l'os durant la phase de résorption, notamment via la production de cathepsine K, de TRAP et de protons, puis meurent par apoptose. Les ostéoblastes recrutés pendant la phase d'inversion comblent les lacunes de Howship durant la phase de formation puis se différencient en ostéocytes ou en cellules bordantes. PTH : parathyroïd hormone, OPG : Osteoprotegerin, csf1 : colony-stimulating factor 1 , MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1. Modifié de (Raggatt and Partridge, 2010).

### Activation

Avant la phase d'activation, l'os est au repos. Les cellules bordantes recouvrent sa surface, empêchant la résorption par les ostéoclastes. Les cellules bordantes se rétractent suite à des signaux d'initiation. Ces signaux peuvent être des facteurs ostéorésorbants (hormone parathyroïdienne, œstrogène, vitamine D3)(Krum et al., 2008) ou des signaux mécaniques à l'origine de micro-dommages qui seront détectés par les ostéocytes. Le retrait des cellules bordantes expose la surface de l'os. Les hormones PTH et Vitamine D3 induisent la production par les ostéoblastes d'IL (Interleukin) 6, de PGE2, de M-CSF (stimulateurs de la

résorption). Ces cellules sécrètent également RANKL, qui stimule l'ostéoclastogénèse en liant le récepteur RANK à la surface des précurseurs ostéoclastiques (Faulkner et al., 2019; Jüppner et al., 1991). Sous l'effet de ces molécules et en fonction du ratio RANKL/OPG, les précurseurs ostéoclastiques affluent, prolifèrent et fusionnent pour former des ostéoclastes. Ces derniers adhèrent à la matrice osseuse et initient la résorption (Raggatt and Partridge, 2010).

### *Résorption*

La phase de résorption dure de 2 à 4 semaines. Durant cette étape, les ostéoclastes interagissent avec l'os grâce à l'interaction de leurs intégrines  $\alpha\beta3$  avec les motifs RGD de la matrice extracellulaire (McHugh et al., 2000). Ils forment avec l'os un espace fermé et étanche (Raggatt and Partridge, 2010; Teitelbaum, 2000). Comme indiqué précédemment, les ostéoclastes sont des cellules polarisées. Leur membrane basale, en contact avec l'os, est très perméable et forme des protrusions ou franges (Teitelbaum, 2000). Les ostéoclastes sécrètent des d'ions hydrogènes via les pompes à protons. Ces ions diminuent le pH de 7 à 4, entraînant une dissolution de la fraction organique de la MEC. L'acidification du milieu permet également l'activité des enzymes ostéoclastiques transcrites par le facteur de transcription NFATC1. L'ostéoclaste produit ainsi les enzymes métalloprotéases (MMP9, MMP14), TRAP et la cathepsine K afin de digérer la fraction organique de la matrice (Reithmeier et al., 2017).

### *Inversion*

Suite à la phase d'inversion, les ostéoclastes meurent par apoptose. Ils sont remplacés par les ostéoblastes qui initient la formation osseuse. Les mécanismes à l'origine du couplage entre la résorption par les ostéoclastes et le recrutement des ostéoblastes sont actuellement peu compris (Katsimbri, 2017). Il a été proposé que le TGF (Transforming growth factor)- $\beta$  libéré de la matrice osseuse lors de la résorption, pourrait être responsable du couplage résorption-formation osseuse. Le TGF- $\beta$  inhibe en effet la production de RANKL par les ostéoblastes et met fin à la resorption.

## Formation

La phase de formation dure entre 4 et 6 mois (Katsimbri, 2017). Les ostéoblastes tapissent le fond de lacune de Howship et débutent la synthèse d'une matrice ostéoïde non minéralisée faite de collagène de type I, d'ostéocalcine, d'ostéopontine, mais aussi de protéoglycanes et de protéines glycosylées (telles que la phosphatase alcaline). Cette sécrétion se fait sous l'effet de l'œstrogène, de la vitamine D, mais aussi de TGF- $\beta$ , IGF (Insulin-like growth factor) et d'autres facteurs libérés de la matrice osseuse lors de la résorption. La matrice ostéoïde est ensuite minéralisée grâce à des dépôts d'hydroxyapatite. Les enzymes phosphatase alcaline, l'ANK (progressive ankylosis gene) et le NPP (nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase) assurent la production d'une concentration de phosphate inorganique optimale pour la minéralisation. Après la formation osseuse, les ostéoblastes piégés dans la matrice perdent 70% de leur cytoplasme et organelles et se transforment en ostéocytes. D'autres ostéoblastes se transforment en cellules bordantes, gardant la possibilité de se différencier ultérieurement en ostéoblastes. La majorité des ostéoblastes (50 à 70%) subissent l'apoptose (Raggatt and Partridge, 2010).

L'os est donc un tissu dynamique et en tant que tel il peut être sujet à des pathologies. C'est le cas de la maladie de Paget caractérisée par une augmentation aberrante du remodelage osseux (Paul Tuck et al., 2017) ou l'ostéoporose, une maladie osseuse systémique caractérisée par une perte importante de la masse osseuse et des fractures répétées (Kersch-Schindl, 2016). Le tissu osseux peut également être touché par des cancers. Les tumeurs osseuses primitives malignes sont des tumeurs rares. Elles représentent moins de 0.2% des tumeurs. En Europe, il s'agit de 2 nouveaux cas pour 100.000 personnes par an (Centre international de recherche sur le cancer (Griffiths, 1994)). L'ostéosarcome (OS) est la plus fréquente des tumeurs osseuses malignes (37%). L'OS est caractérisé par la formation d'os ou de substances ostéoïdes par la tumeur. Le chondrosarcome est caractérisé par la production de cartilage par la tumeur. Il représente 23,6% des tumeurs osseuses. Enfin, le sarcome d'Ewing est caractérisé par l'origine neuroectodermale des cellules et la présence d'un facteur de transcription aberrant provenant d'une translocation chromosomique. Le plus fréquent de ces facteurs de transcription hybrides est le facteur de transcription

EWS/Fli1 (Ewing sarcoma breakpoint region 1/Friend leukemia integration 1). Le sarcome d'Ewing représente 12,2% des tumeurs osseuses primitives malignes (Griffiths, 1994). Les études décrites dans cette thèse ont été menées dans l'ostéosarcome.

## L'ostéosarcome

### Description brève

L'ostéosarcome (OS) est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes. Il s'agit également du troisième type de cancer affectant les enfants et les adolescents après les lymphomes et les tumeurs du cerveau (Luetke et al., 2014). La cellule d'OS dérive de la lignée mésenchymateuse et est capable de produire des substances ostéoïdes et/ou de l'os immature (Ritter and Bielack, 2010; Simpson and Brown, 2018).

### Épidémiologie

Les individus majoritairement affectés par l'OS sont jeunes. Ainsi, l'incidence de l'OS passe de 2-3/million/an dans la population générale, à 8-11/million/an quand le seul groupe des 15-19 ans est considéré. L'OS représente 3 à 6% des cancers de l'enfant (15% des cancers solides extra-craniaux) et 1% des cancers de l'adulte. Après le pic d'incidence à 15-19 ans, un autre pic d'incidence se situe chez les populations âgées (plus de 65 ans) et survient suite à des pathologies osseuses pré-existantes ou des fractures. Les individus jeunes de sexe masculin sont 1,4 fois plus susceptibles de développer la maladie, que les individus jeunes de sexe féminin. Cependant, les probabilités sont équivalentes entre les sexes, chez les individus de plus de 65 ans (Mirabello et al., 2009; Stiller et al., 2006).

### Origine de la pathologie

Les causes de l'OS sont encore mal comprises. Son apparition chez les populations jeunes lors de la croissance et sa localisation aux extrémités des os longs suggèrent l'implication

d'une production osseuse rapide (Troisi et al., 2006). Cette hypothèse est corroborée par une incidence de l'OS plus importante chez les chiens de grande taille, comparé aux chiens de petite taille (Simpson et al., 2017). Chez les patients âgés, les facteurs de risque incluent les irradiations et les chimiothérapies pour le traitement de malignités préexistantes. Un historique de maladie de Paget est également présent chez environ 1/3 des cas d'OS de l'adulte. L'OS peut également naître de troubles génétiques héréditaires tels que le syndrome de Li-Fraumeni, le syndromes de Rothmund-Thomson, ou le syndrome de Werner (Li and Fraumeni, 1969; Rickel et al., 2017)

### Tableau clinique

L'OS est souvent diagnostiqué après des douleurs locales persistantes, souvent attribuées à tort à la croissance chez les jeunes, ou à une activité physique. Le malade peut également présenter une masse palpable et une réduction de l'amplitude du mouvement des articulations. Des symptômes systémiques (perte de poids, fatigue, fièvre...) peuvent également être présents. La tumeur sera le plus souvent localisée au niveau des métaphyses des os longs (fémur, tibia, humérus), avec 50% des cas localisées à proximité du genou (Bielack et al., 2009, 2002; Ozaki et al., 2002). La tumeur peut également être localisée au niveau du squelette axial, le plus souvent au niveau du pelvis, chez l'adulte (Cripe, 2015; Ozaki et al., 2002). Environ 15 à 20% des patients présenteront des métastases au moment du diagnostic, notamment au niveau pulmonaire ou osseux. Dans de rares cas, des adénopathies peuvent être révélatrices de métastases dans les nœuds lymphatiques (Bielack et al., 2002). Les métastases diminuent drastiquement le pronostic vital du malade, le faisant chuter de 70% à 20% à 5 ans (Luetke et al., 2014).

### Diagnostic

Le diagnostic est réalisé après palpation pour déterminer la présence d'une masse molle à proximité de l'os. Par radiographie, des calcifications résultant de la formation d'os ectopique peuvent être observées à l'intérieur de la masse molle, ainsi qu'un aspect en « feu

d'herbe » (Figure 5). La formation d'os ectopique est associée à des plages d'ostéolyse (Ohba et al., 2014). Ces observations doivent être confirmées par des analyses sanguines. L'augmentation de lactate déshydrogénase ou de phosphatase alcaline dans le sang est associée à un mauvais pronostic (Ritter and Bielack, 2010; Shimose et al., 2014). Enfin, un PET (positron emission tomography) scan permet de détecter d'éventuelles métastases.

La biopsie permettant d'identifier un OS avec un niveau de précision de 90%, une analyse histologique est souvent réalisée pour confirmer le diagnostic. Elle permet de déterminer le niveau de prolifération des cellules tumorales, de classifier la tumeur, et de la classer en fonction du stade de sévérité.

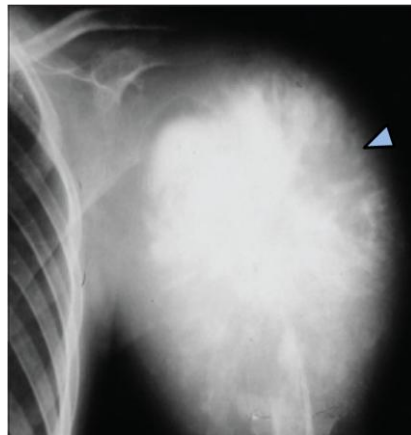
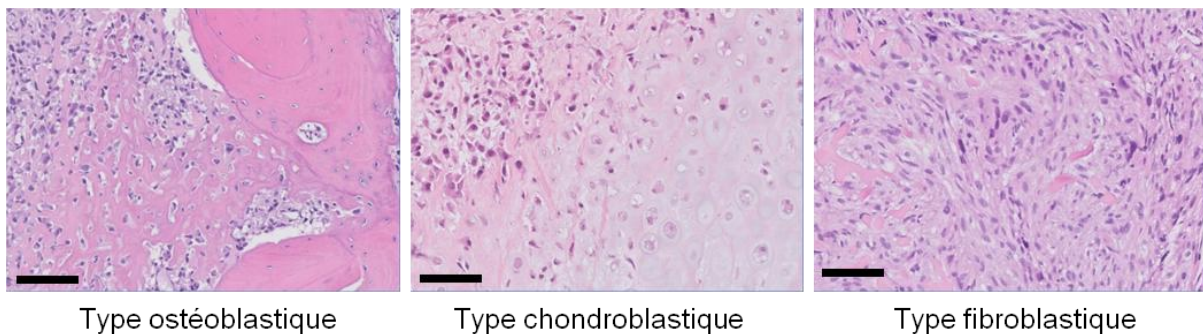


Figure 5 : Radiographie d'un humérus proximal atteint d'Ostéosarcome. Flèche : formation d'os ectopique en « feux d'herbe » par les cellules tumorales. Modifié de (Kundu, 2014a).

## Classification des OS

Les OS sont classifiés en OS secondaires ou primaires. Les OS secondaires surviennent après des événements pré-existants tels que des maladies (la maladie de Paget par exemple) ou une irradiation (Jo and Fletcher, 2014; Kundu, 2014a). À l'inverse, les OS primaires sont des OS primitifs. Ils sont subdivisés en différentes catégories, en fonction de l'aspect histologique. Le type conventionnel intramédullaire/central de haut grade est le plus commun. Il est subdivisé en types ostéoblastique (50%), chondroblastique (25%) ou fibroblastique (25%) différenciés par la matrice sécrétée (Figure 6). Le type ostéoblastique est caractérisé par la sécrétion d'une matrice osseuse, le type chondroblastique sécrète une

matrice cartilagineuse, et le type fibroblastique est caractérisé par des cellules en fuseau sécrétant du collagène. Les autres catégories d'OS primaires sont composées des OS télangiectasiques qui présentent des cystes remplis de sang et des cellules géantes multinuclées. Les OS de type parosteal présentent une production de cartilage dans environ 50% des cas, mais aussi une production d'os et des cellules ayant la morphologie de fibroblastes. Les OS de bas grade central présentent des cellules de morphologie semblable à des fibroblastes et, sont organisés en faisceaux. Enfin, les OS de type periosteal présentent de l'os dense mature mais aussi du cartilage hyalin atypique (Doyle, 2014; Franceschini et al., 2018; Hart, 2019; Kundu, 2014b).



**Figure 6 : Illustration histologique des OS du type conventionnel. Les trois sous-types d'OS conventionnels sont distingués par la nature des sécrétions des cellules tumorales. Les OS de type ostéoblastique sécrètent une matrice osseuse, tandis que les OS de type chondroblastique sécrètent une matrice cartilagineuse. Enfin, les OS de type fibroblastique sont caractérisés par des cellules en fuseau sécrétant du collagène. La barre d'échelle représente 100µm. Modifié de (Franceschini et al., 2018).**

Il existe d'autres sous-types d'OS. Il s'agit des OS de types ostéoblastique sclérosant, chondromyxoïdefibrome-like, chondroblastome-like, OS à cellules claires, à cellules géantes, épithéloïde, ressemblant aux ostéoblastomes ou ressemblant aux histiocytomes fibreux malin. Ces types d'OS sont cependant considérés comme des sous-types du type conventionnel, du fait de leurs ressemblances et leurs comportements similaire au type conventionnel (Kundu, 2014b).



## Classement des OS

Le classement des OS permet de caractériser la maladie, notamment sa sévérité ou la présence de métastases. Le classement des OS permet d'orienter les traitements, d'estimer le pronostic des patients, d'aider à évaluer les résultats du traitement, et de faciliter la communication entre les professionnels (Jawad and Scully, 2010). Plusieurs systèmes de classement de la maladie existent.

### *Le système MSTS (Musculo-skeletal tumor society) ou système Enneking*

Trois informations principales sont données par ce système : le grade, l'étendue de la tumeur et la présence ou l'absence de métastases (Tableau I).

- Le grade (G): indique la potentialité de la tumeur à croître et à se propager. Il se base sur l'aspect histologique des tumeurs. Le grade G1 désigne les tumeurs de bas grade (de morphologie semblable aux cellules saines). Elles sont moins susceptibles de croître rapidement et de métastaser. Le grade G2 désigne les tumeurs de haut grade de morphologie anormale, se divisant rapidement et prompts à métastaser.

- L'étendue de la tumeur primaire (T) : T1 désigne une tumeur qui est circonscrite à l'os (intra-compartimentale), et T2 une tumeur qui affecte les structures environnantes.

- Métastase (M) : M1 indique qu'une tumeur s'est propagée aux nœuds lymphatiques proches. M0 indique une absence de propagation aux nœuds lymphatiques.

Stade	Grade	Tumeur	Métastase
<b>IA</b>	G1	T1	M0
<b>IB</b>	G1	T2	M0
<b>IIA</b>	G2	T1	M0
<b>IIB</b>	G2	T2	M0
<b>III</b>	G1 ou G2	T1 ou T2	M1

Tableau I : Système de classification MSTS (Musculo skeletal Tumor Society) de l'OS. Chaque stade de la classification est caractérisé par un grade (G), une étendue tumorale (T), et la présence ou la absence de métastases (M) de l'OS.

### *Le système TNM (Taille, propagation, métastases)*

Le système de classement TNM a été créé par l'AJCC (American Joint Commission on Cancer). Il est basé sur 4 paramètres :

- Le paramètre T décrit la taille de la tumeur primaire ainsi que sa présence ou absence dans différentes régions de l'os.
- Le paramètre N décrit la propagation aux nœuds lymphatiques proches.
- Le paramètre M indique si le cancer a métastasé à d'autres organes du corps (poumon, sein, os...).

Le classement de l'AJCC contient 7 stades (IA, IB, IIA, IIB, III, IVA, IVB) qui sont subdivisés en une trentaine de stades, chacun décrivant précisément la tumeur. Une version simplifiée de ce classement est présentée Tableau II.

Stade	Grade	Taille	Métastase
<b>IA</b>	Bas	<8cm	Non
<b>IB</b>	Bas	>8cm	Non
<b>IIA</b>	Haut	<8cm	Non
<b>IIB</b>	haut	>8cm	Non
<b>III</b>	Tous	Tous	Discontinue ou « skip »
<b>IVA</b>	Tous	Tous	Pulmonaire
<b>IVB</b>	Tous	Tous	Non pulmonaire

Tableau II : Système de classification TNM (American Joint Commission on Cancer) de l'OS. Chaque stade de cette méthode de classement est caractérisé par un paramètre taille (T), métastase (M), ou un paramètre définissant l'atteinte de nœud lymphatiques (N).

## Thérapies actuelles de l'OS

Les patients atteints d'OS sont traités par une approche multidisciplinaire établie par Rosen et al. dans les années 1970 (Rosen et al., 1975). Ce protocole associe chimiothérapie (néo-adjuvante et adjuvante, pour une durée de 6 à 8 mois) et chirurgie avec conservation du membre. Cette stratégie permet une survie à 5 ans pour environ 70% des malades (Arndt and Crist, 1999; Bielack et al., 2009, 2015). La radiothérapie est très peu utilisée pour le traitement de l'OS du fait de la radiorésistance de la tumeur (Schwarz et al., 2009a). Son utilisation reste réservée à des situations particulières, telles que l'impossibilité de la résection complète d'une tumeur située dans une région à haut risque (tête, colonne vertébrale...), ou la persistance de foyers tumoraux restreints après résection (DeLaney et al., 2005; Schwarz et al., 2009b).

### *La chimiothérapie*

La chimiothérapie dure entre 6 et 12 mois et associe plusieurs agents. La doxorubicine (Adriamycine), le cisplatine, l'ifosfamide, l'étoposide (à moindre degré) ou le méthotrexate à haute dose sont utilisés dans des combinaisons variables (Bacci et al., 2005; Bishop et al., 2016; Cortes et al., 1974; Harris et al., 1995; Jaffe et al., 1973; Ochs et al., 1978) (Figure 7). La chimiothérapie pré-opératoire est administrée 8 à 10 semaines avant la chirurgie et sert à réduire la taille de la tumeur (Anninga et al., 2011; Luetke et al., 2014). La chimiothérapie post-opératoire est administrée jusqu'à 21 jours après la chirurgie, pour 12 à 29 semaines de traitement (Imran et al., 2009; Luetke et al., 2014). Du fait des effets néfastes de la polychimiothérapie (dysfonctionnement cardiaque, auriculaire, toxicité rénale et hépatique), des examens de suivi doivent être mis en place pendant et après la thérapie (échocardiographie, audiogramme, tests de toxicité) (Ritter and Bielack, 2010). Des traitements supplémentaires permettent de limiter les effets secondaires de la chimiothérapie (par exemple des antiémétiques ou des opiacés) (Alvarez et al., 1995).

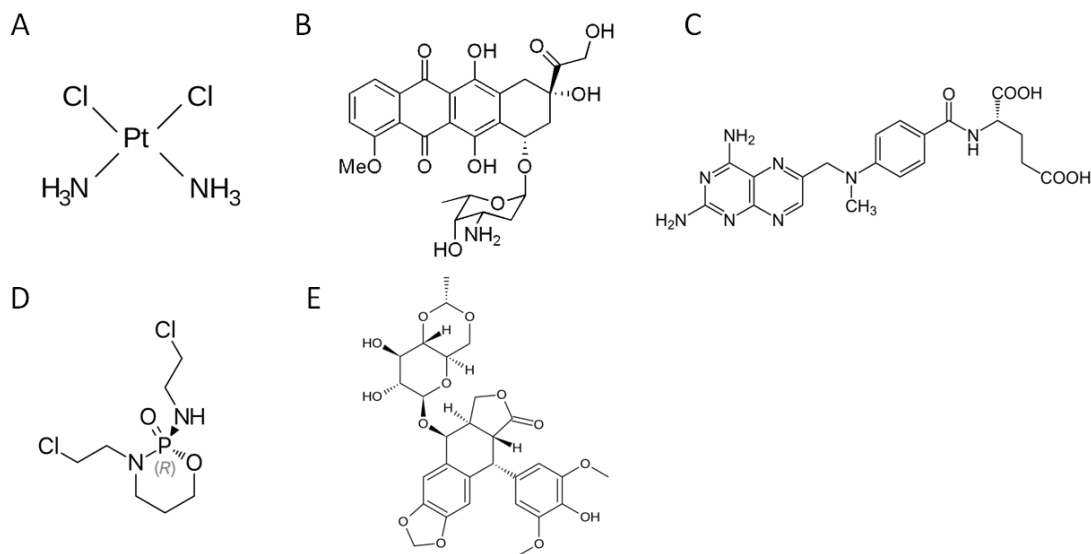


Figure 7 : Formules chimiques des molécules de chimiothérapie utilisées pour le traitement de l'ostéosarcome. (A) Cisplatine, (B) : Doxorubicine, (C) : Methotrexate, (D) Ifosfamide, (E) : Étoposide.

## Chirurgie

La chirurgie de l'OS vise l'élimination complète de la tumeur, en privilégiant des marges de résection importantes, incluant la tumeur et le tissu sain environnant. Il n'existe cependant pas de consensus sur la définition et la comparaison de ces marges de résection entre les équipes chirurgicales, ce qui rend difficile une standardisation des pratiques (Heymann et al., 2017). De nos jours, l'efficacité de la chimiothérapie pré-opératoire permet d'éviter l'amputation des membres touchés (Gosheger et al., 2006; Grimer, 2005). La résection des OS touchant le squelette axial reste cependant très difficile. Un IRM (imagerie par résonance magnétique) du squelette peut être utilisé pour planifier la chirurgie. Dans le cas de métastases, une thoracotomie peut être réalisée afin de les localiser.

Après la chimiothérapie pré-opératoire, les patients sont classés en bons ou mauvais répondeurs en fonction du nombre de cellules viables restantes dans la pièce de résection (Piperno-Neumann et al., 2016). La méthode utilisée est appelée score de Huvos (Rosen et al., 1979). Les bons répondeurs ont plus de 90% de nécrose (stades III = 91-99% de nécrose et grade IV = 100% de nécrose). Les mauvais répondeurs ont moins de 90% de nécrose (grade II = moins de 90% de nécrose, grade I = moins de 50% de nécrose), (O'Kane et al.,

2015; Vijayanarasimha et al., 2017). Le score de Huvos permet d'adapter la chimiothérapie post-opératoire (Crenn et al., 2017).

### *Les limites des traitements actuels*

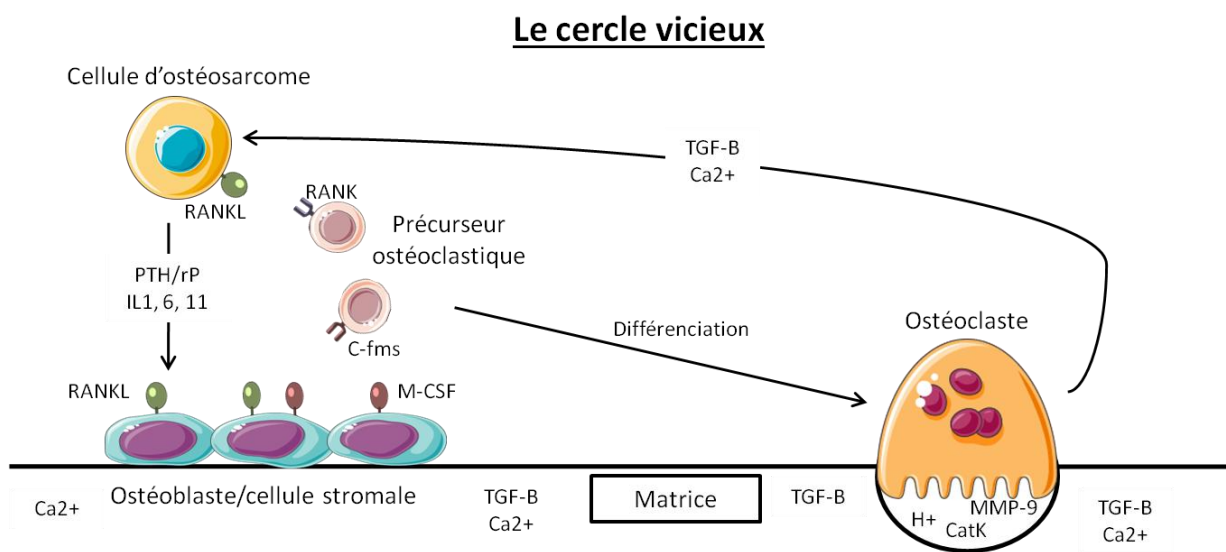
Malgré les traitements, 30 à 40% des patients présenteront des récives dans les 2 à 3 ans suivant la fin du traitement. Lors de la rechute, les métastases majoritairement pulmonaires (90%), doivent être retirées chirurgicalement afin d'augmenter les chances de survie des patients. Cependant, la survie à 5 ans après le second diagnostique d'environ 20%. Les traitements actuels entraînent de lourds effets secondaires qui diminuent la qualité de vie des patients

Bien que les traitements actuels aient permis de réduire le nombre d'amputations, les molécules utilisées datent des années 1970 et les taux de survie ont peu évolué depuis. Ce manque d'avancée peut notamment être lié à la rareté de la maladie ainsi qu'à sa grande hétérogénéité. La compréhension des mécanismes à l'origine de la maladie et de ceux permettant son développement est indispensable à la recherche de thérapies efficaces.

### *Les mécanismes de l'OS :Le cercle vicieux*

Il a été montré que la tumeur est capable de détourner le mécanisme de remodelage osseux afin d'assurer sa croissance. Ce phénomène nommé cercle vicieux est retrouvé dans l'OS, mais aussi dans d'autres tumeurs métastasantes à l'os telles que le cancer du sein ou de la prostate (Sohail et al., 2018; Yang and Wang, 2018). Dans ces tumeurs, la cellule cancéreuse synthétise et sécrète des facteurs de croissance tels que la PTHrP (parathyroid hormone-related protein), l'IGF, le FGF (Fibroblast growth factor), le VEGF (vascular endothelial growth factor), mais aussi Wnt, qui ont des effets activateurs sur les ostéoblastes. Ces derniers vont à leur tour promouvoir la différenciation et l'activité de résorption des ostéoclastes en produisant notamment du RANKL. La tumeur peut également activer les ostéoclastes par la production d'IL-6, IL-11 ou IL-1 $\beta$  (Akiyama et al., 2008; Guise et al., 2006; Lamora et al., 2016;

Lamoureux et al., 2014). L'action conjuguée des ostéoblastes et de la cellule tumorale aboutit une résorption exagérée de la matrice osseuse par les ostéoclastes. Cette résorption conduit au relargage dans l'environnement de BMP, TGF- $\beta$ , FGF et PDGF (platelet-derived growth factor), qui vont contribuer à la survie et à la prolifération des cellules tumorales. À l'échelle de l'organisme, la résorption osseuse peut entraîner une hyper-calcémie ainsi que des fractures dues à l'ostéolyse (Clemons et al., 2012; W. Kim et al., 2016; Maurizi and Rucci, 2018) (Figure 8).



**Figure 8 : Le cercle vicieux dans l'ostéosarcome : la cellule cancéreuse sécrète des facteurs de croissance activateurs des ostéoblastes. Ces derniers, associés à la cellule tumorale, promeuvent la différenciation ostéoclastique et une résorption exagérée de la matrice osseuse. Cette résorption conduit au relargage dans l'environnement de facteurs participant à la survie et à la prolifération tumorale. PTHrP : parathyroid hormone-related protein, l'IGF : insulin-like growth factor, FGF : fibroblast growth factor, VEGF : Vascular endothelial growth factor, IL (1, 6, 11) : Interleukin (1, 6, 11), du RANKL : Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, c-fms : Colony stimulating factor 1 receptor, TGF- $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$ , M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor,  $\text{Ca}^{2+}$  : ions calcium. Adapté de (Akiyama et al., 2008).**

### Les mécanismes de l'OS : Atteintes génétiques

L'OS peut naître de troubles génétiques héréditaires tels que le syndrome de Li-Fraumeni (mutation de p53), ou la mutation du gène codant pour Rb, mais aussi les syndromes de Rothmund-Thomson (mutation du gène RECQL4), Bloom (BLM) et Werner (WRN) (Li and

Fraumeni, 1969; Rickel et al., 2017). Mais d'autres modifications génétiques acquises ont été décrites dans la pathologie. En effet, avec l'explosion des méthodes de séquençage haut débit ces dernières années, de nombreuses études ont tenté d'identifier les « driver gene mutations », c'est-à-dire des mutations qui confèrent un avantage prolifératif aux cellules (Bousquet et al., 2016; Kovac et al., 2015; Savage et al., 2013; Vogelstein et al., 2013). Elles peuvent soit inhiber/inactiver les gènes suppresseurs de tumeur, ou amplifier/faciliter l'activité des oncogènes (Napier et al., 2015; Scheel et al., 2001; van Harn et al., 2010a; Weiss et al., 2010a) (Tableau III)(Tableau IV).

Les gènes suppresseurs de tumeur inhibent la croissance tumorale, en régulant par exemple le cycle cellulaire. De nombreux gènes appartenant à cette catégorie sont affectés dans l'OS. Par exemple le gène TP53 est le gène le plus muté dans les tumeurs humaines (Thoenen et al., 2019). Il code pour la protéine p53, un facteur de transcription régulant le cycle cellulaire et l'apoptose. Dans l'OS, p53 est inactivé par mutation du gène ou par réarrangement chromosomique (Bousquet et al., 2016; Martin et al., 2012; Serra and Hattinger, 2017; Weiss et al., 2010b). Entre 65% et 90% des OS présentent une mutation de TP53 (mutation ponctuelle, perte allélique ou réarrangement) (Andreassen et al., 1993; Rickel et al., 2017; Toguchida et al., 1992). Un autre régulateur du cycle cellulaire Rb (Retinoblastoma protein) est fréquemment muté dans l'OS. Rb régule la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire en séquestrant les facteurs de transcription de la famille E2F. Sa perte entraîne donc la disparition de ce point de contrôle du cycle cellulaire (van Harn et al., 2010b). Les mutations perte de fonction de Rb apparaissent dans environ 70% des OS (Alonso et al., 2001; Bousquet et al., 2016; Miller et al., 1996; Serra and Hattinger, 2017).

Les fonctions de p53 et Rb peuvent également être affectées par la mutation de CDKN2A (cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A). Ce gène code pour deux protéines, p14Arf et p16INK4, activatrices de p53 et Rb respectivement. P14 empêche la dégradation de p53 médiée par l'ubiquitine ligase E3 MDM2 (Mouse double minute 2 homolog). P16 inhibe CDK4 (Cyclin-dependent kinase 4) capable d'inactiver Rb par phosphorylation. Le locus de CDKN2A (9p21) est altéré dans 5 à 21% des OS (Kansara and Thomas, 2007; Khanna et al., 2001; Martin et al., 2012; Toguchida et al., 1988). Il a également été décrit une hyperméthylation des promoteurs de p14ARF et p16INK4 dans l'OS, ce qui entraîne une diminution de la transcription (Badal et al., 2008; Oh et al., 2006). L'hyperméthylation des

promoteurs de gènes anti-tumoraux est un mécanisme souvent cité dans l'OS. C'est le cas des promoteurs de GADD45 (Growth arrest and DNA damage) ou HIC1 (Hypermethylated in cancer 1), tous deux impliqués dans la réponse aux signaux de dommages à l'ADN (Al-Romaih et al., 2007; Rathi et al., 2003).

ATRX est une protéine également fréquemment mutée dans l'OS (29% des tumeurs). Elle fait partie d'un complexe multiprotéique régulant le remodelage de la chromatine et la maintenance des télomères (X. Chen et al., 2014). ATRX est un gène suppresseur de tumeur connu, et ses mutations conduisent à des phénomènes de prolongement alternatif des télomères (ALT) (Cheung et al., 2012; Heaphy et al., 2011; Napier et al., 2015). D'autres exemples de gènes suppresseurs de tumeurs décrits comme mutés dans les OS incluent la protéine APC (Adenomatous polyposis coli) régulatrice de la  $\beta$ -catenin, l'inhibiteur de metalloprotéase TIMP3 (Metalloproteinase inhibitor 3), l'inhibiteur de la voie Wnt WIF-1 (Wnt inhibitory factor 1)...(X. Chen et al., 2014; Entz-Werle et al., 2007; Harada et al., 2002; Hou et al., 2006; Kansara et al., 2009; Shao et al., 2019; Yamaguchi et al., 1992).

Les oncogènes confèrent un avantage prolifératif aux cellules. Leurs expressions ou leurs activités sont accrues dans les cancers. Dans l'OS, des mutations gain de fonction sont par exemple observées pour E2F3 (60% des tumeurs), un facteur de transcription de la famille des E2F impliqué dans de nombreux processus cellulaires dont la réplication, la réparation de l'ADN, et l'apoptose. Son inhibition dans les cancers diminue notamment la croissance tumorale en perturbant le cycle cellulaire (Lee et al., 2015). CDK4 (cyclin dependent kinase-4) est impliquée dans la transition de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire. C'est un inhibiteur du suppresseur de tumeur Rb. Dans l'OS, son gène est muté dans environ 10% des tumeurs (Martin et al., 2010; Mejia-Guerrero et al., 2010; Smida et al., 2010). CDK4 est souvent co-amplifié avec MDM2 dans différents cancers (Mejia-Guerrero et al., 2010). Comme indiqué précédemment, MDM2 est une ubiquitine ligase inhibitrice de p53. MDM2 est amplifié dans 3 à 25% des tumeurs d'OS, entraînant ainsi une inactivation de p53 (Lonardo et al., 1997).

C-Myc est un oncogène décrit dans plusieurs types de cancers (X.-X. Li et al., 2017; Lin et al., 2017; Pennanen et al., 2018). Ce facteur de transcription induit la prolifération cellulaire, notamment par la régulation des CDK, dont CDK4 (Dang, 2012; Steiner et al., 1995). De plus,



via l'activation de mTOR (mammalian target of rapamycin) et la phosphorylation consécutive de 4EBP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1), c-Myc accroît la synthèse protéique dans les cancers (Pourdehnad et al., 2013). C-Myc régule également la mort cellulaire ainsi que l'angiogénèse et les processus métastatiques (Baudino et al., 2002; B.-J. Chen et al., 2014). Dans l'OS, le gène de c-Myc est amplifié dans 7 à 67% des tumeurs et est surexprimé dans 34% des cas (Gamberi et al., 1998; Sadikovic et al., 2010; Squire et al., 2003). La région 17p11.2~p12 a également été décrite comme étant amplifiée dans 13 à 32% des OS de haut grade (van Dartel et al., 2002). Cette région contient entre autres le gène codant pour PMP22 (peripheral myelin protein 22) (van Dartel et al., 2002), une protéine impliquée dans la prolifération, la migration et l'invasion tumorale, notamment via la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinase) (X. Li et al., 2017; Liu and Chen, 2015). D'autres oncogènes tels que CDC5L (Cell division cycle 5-like impliqué dans la progression de la phase G2 du cycle cellulaire et la croissance tumorale) ou RUNX2 (facteur de transcription central dans la différenciation ostéoblastique et oncogène connu dans l'ostéosarcome), sont également amplifiés de manière récurrente dans l'OS (Lamoureux et al., 2014; Lu et al., 2008a, 2008b, p. 5; van Dartel et al., 2002).

Au-delà des protéines, d'autres acteurs cellulaires sont concernés par les anomalies génétiques dans l'OS. Ainsi, les miARNs (micro ARN), les lncARN (long non-coding ARN), et des séquences ribonucléotidiques ne codant pas pour des protéines, ont aussi une expression dérégulée dans l'OS. Pasic et ses collaborateurs ont par exemple montré que le lncRNA loc285194, connu comme étant un suppresseur de tumeur contrôlé par p53, voit son locus délété dans l'OS. Cette délétion est associée à un mauvais pronostic chez les patients (Liu et al., 2013; Pasic et al., 2010). Des études ont également montré l'implication des miARN dans l'OS. Par exemple, Zhou et collaborateurs ont montré que le miR-340 agit comme un inhibiteur de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique en ciblant ROCK1 (Rho-associated coil containing protein kinase 1), tandis que Song et al. ont montré l'implication du miR-140 dans la chimiorésistance (Song et al., 2009; Zhou et al., 2013).

Gènes	Voies	Fréquence
<b>Oncogènes</b>		
<b>CDK4</b>	Cycle cellulaire/apoptose	1/20 (Perry et al), * (Kovac et al)
<b>MDM2</b>	Cycle cellulaire/apoptose	2/52 (Chen et al), 3/59 (Perry et al)
<b>MYC</b>	Cycle cellulaire/apoptose	3/20 (Perry et al)
<b>CARD11</b>	Cycle cellulaire/apoptose	1/34 (Chen et al), 3/20 (Perry et al)
<b>EGFR</b>	PI3K-mTOR; RAS	2/34 (Chen et al)
<b>GNAQ</b>	PI3K-mTOR; RAS; MAPK	2/34 (Chen et al)
<b>GNAS</b>	APC; PI3K-mTOR; TGF-beta; RAS	2/34 (Chen et al)
<b>JAK1</b>	IFN	2/34 (Chen et al), 2/20 (Perry et al)
<b>MAML2</b>	Notch	1/34 (Chen et al)
<b>FBXW7</b>	Notch	1/34 (Chen et al), * (Kovac et al)
<b>ALK</b>	PI3K-mTOR; RAS	1/34 (Chen et al), 2/20 (Perry et al)
<b>PDGFRA</b>	PI3K-mTOR; RAS	2/34 (Chen et al), 3/20 (Perry et al)
<b>PDGFRB</b>	PI3K-mTOR; RAS	1/34 (Chen et al), 1/20 (Perry et al)
<b>PIK3CA</b>	PI3K-mTOR	1/34 (Chen et al), 5/20 (Perry et al)
<b>APC</b>	APC	* (Kovac)
<b>CTNND1</b>	Cycle cellulaire/apoptose	* (Kovac)
<b>BLM</b>	Cycle cellulaire/apoptose	1/34 (Chen)
<b>CCNE1</b>	Cycle cellulaire/apoptose	2/20 (Perry et al) * (Kovac)
<b>COPS3</b>	Cycle cellulaire/apoptose	4/20 (Perry et al)
<b>PDPK1</b>	PI3K-mTOR	1/20 (Perry et al)
<b>AKT1</b>	PI3K-mTOR	1/20 (Perry et al)
<b>E1F4B</b>	PI3K-mTOR	2/20 (Perry et al)
<b>WRN</b>	Domage à l'ADN	2/123 (Kovac et al)
<b>Notch1-3</b>	Notch	* (Kovac et al)
<b>Notch4</b>	Notch	1/20 (Perry et al) * (Kovac)
<b>PRKCA</b>	Cycle cellulaire/apoptose	* (Kovac et al)
<b>Suppresseurs de tumeurs</b>		
<b>EP300</b>	Modification de la chromatine; APC; TGF-beta; NOTCH	1/34 (Chen et al), 3/123 (Kovac et al)
<b>SMAD4</b>	TGF-beta	2/34 (Chen et al), 1/20 (Perry et al)
<b>Runx1</b>	Régulation de la transcription	1/34 (Chen)
<b>ARID1A</b>	Modification de la chromatine	3/20 (Perry et al) * (Kovac)
<b>ATM</b>	Domage à l'ADN	2/20 (Perry et al), 3/123 (Kovac et al)
<b>RB1</b>	Cycle cellulaire/apoptose	61% (Perry et al), 10/34 (Chen et al), 47% (Kovac et al)
<b>CDKN2A</b>	Cycle cellulaire/apoptose, Domage à l'ADN	6/20 (Perry et al), 15% SNCA (Kovac et al)

<b>TP53</b>	Cycle cellulaire/apoptose, Dommages à l'ADN	75% (Perry et al.), 90% (Chen et al), 47% (Kovac et al)
<b>ATRX</b>	Modification de la chromatine	10/20 (Chen et al), 7/20 (Perry et al), 11/123 (Kovac et al)
<b>FANCA</b>	Modification de la chromatine	1/34 (Chen et al), 2/20 (Perry et al), 3/123 (Kovac et al)
<b>RECQL4</b>	Modification de la chromatine	1/20 (Perry et al), 3/123 (Kovac et al)
<b>BRCA1</b>	Dommages à l'ADN	2/34 (Chen et al), 91% SCNA (Kovac et al)
<b>BRCA2</b>	Dommages à l'ADN	78% SCNA (Kovac et al)
<b>MLH1</b>	Dommages à l'ADN	1/34 (Chen et al), 1/20 (Perry et al)
<b>CBL</b>	PI3K-mTOR; RAS	1/34 (Chen et al), 1/20 (Perry et al)
<b>PTCH1</b>	Hedgehog	1/34 (Chen et al), * (Kovac et al)
<b>NF1</b>	RAS	2/34 (Chen et al), 3/20 (Perry et al)
<b>MAP2K4</b>	MAPK	1/34 (Chen et al), 2/20 (Perry et al)
<b>AKT2</b>	PI3K-mTOR	1/34 (Chen et al), 1/20 (Perry et al)
<b>PIK3R1</b>	PI3K-mTOR	1/34 (Chen et al), 1/20 (Perry et al)
<b>PTEN</b>	PI3K-mTOR	2/34 (Chen et al), 7/20 (Perry et al), 50% SCNA (Kovac et al)
<b>TSC2</b>	PI3K-mTOR	3/20 (Perry et al), 1/7 (Bousquet et al)
<b>GAS7</b>	Régulation de la transcription	5/34 (Chen et al), 1/20 (Perry et al)
<b>MLL3</b>	Régulation de la transcription	1/34 (Chen et al), 2/20 (Perry et al)
<b>DLG2</b>	Wnt	18/34 (Chen et al), 5/20 (Perry et al), 24% SCNA (Kovac et al)
<b>VHL</b>	PI3K-mTOR; RAS; STAT	* (Kovac et al)
<b>BAP1</b>	Dommages à l'ADN	38% SCNA (Kovac et al)

Tableau III: Mutations somatiques identifiées dans l'OS. « \* » = Nombre non indiqué. Modifié de (Rickel et al., 2017). (X. Chen et al., 2014; Kovac et al., 2015; Perry et al., 2014).

Région	Évènement	Fréquence	Gènes affectés	
			Suppresseurs de tumeur	Oncogènes
<b>1q10-q12, 1q21-q31</b>	Amp	6–59%		
<b>3q13.31</b>	Del, LOH	6–80%	LSAMP	
<b>5q21</b>	LOH	62%	APC	

<b>6p12-p21</b>	Gain, Amp	16–75%	RUNX2, CDC5L, VEGFA, PIM1
<b>6p22.3</b>	Gain, Amp	60%	E2F3
<b>7p21</b>	Del	36%	TWIST
<b>7q31</b>	Amp	14%	MET
	Del	41%	
	Amp	9%	
<b>8q24.21</b>	Amp	7–67%	MYC
<b>8q24.4</b>	Mut	<5%	RECQL4
	Gain	33%	RECQL4
<b>9p21</b>	Del	5–21%	p16/INK4A, p14/ARF, p15/INK4B
<b>10q26</b>	LOH	60%	BUB3, FGFR2
<b>12q13</b>	Amp	41%	PRIM1
<b>12q14</b>	Amp	10%	CDK4
<b>12q15</b>	Amp	3–25%	MDM2
<b>13q14.2</b>	LOH	19–67%	RB1
	Mut	25–35%	RB1
<b>16q23.1-q23.2</b>	Del	30%	WWOX
<b>17p11.2-p12</b>	Amp	20–78%	COPS3, PMP22, MAPK7
<b>17p13.1</b>	Del, LOH	29–42%	TP53
	Mut	10–39%	TP53
<b>18q (MCR 18q21-q23)</b>	Del	31–64%	

**Tableau IV : Modifications chromosomiques identifiées dans l'OS. Abréviations : LOH, loss of heterozygosity, MCR, minimal common region; Del, deletion; Amp, amplification; Mut, mutation. Modifié de (Martin et al., 2012)**

L'OS est donc très hétérogène sur le plan génétique et épigénétique. Poos et al. ont recensé 911 protéines et 81 miARN décrits comme associés à l'OS (Poos et al., 2014). Cette hétérogénéité tumorale couplée au faible nombre de cas (dû à la rareté de la maladie), rendent difficiles l'obtention de résultats statistiquement significatifs lors d'études cliniques (Morrow and Khanna, 2015). Néanmoins l'utilisation de modèles *in vitro* ou *in vivo* permet d'évaluer l'efficacité des nouvelles approches thérapeutiques.

## Les modèles d'étude de la maladie

L'utilisation de modèles expérimentaux permet d'appréhender les effets des nouvelles stratégies thérapeutiques avant leur utilisation chez l'être humain. Plusieurs types de modèles sont actuellement utilisés pour mimer la pathologie. Des modèles cellulaires provenant de patients atteints d'OS sont utilisés en routine en laboratoire depuis des décennies. Ils permettent notamment de tester de potentiels traitements ou d'identifier des anomalies génétiques dans les OS. Ces modèles cellulaires sont indispensables, notamment sur le plan éthique, avant l'utilisation de modèles *in vivo* plus complets.

La souris (*Mus Musculus*) est utilisée comme modèle *in vivo* dans de nombreuses pathologies. L'un des modèles *in vivo* les plus anciens utilisés dans le cancer est la greffe de cellules de lignées humaines d'OS à des souris (xénogreffe) (Fujiwara et al., 2017; Lamoureux et al., 2007a; Liao et al., 2015; Martins-Neves et al., 2018; Ory et al., 2016) (Figure 9). Ce modèle est utilisé dans les études présentées dans cette thèse. Les cellules tumorales injectées peuvent notamment être modifiées, par exemple pour l'expression d'un transgène (surexpression d'un gène spécifique, expression d'un shARN...).



Figure 9 : Modèle murin de xénogreffe par injection de cellules tumorales humaines HOS-MNNG en paratibial. La flèche indique la tumeur formée au contact du tibia. Modifié de (Ory et al., 2016).

D'autres modèles animaux existent dans l'OS. Les chiens par exemple (*Canis familiaris*), surtout ceux de grande taille, développent spontanément des OS avec une incidence plus élevée que chez l'humain, même si la maladie reste rare (Anfinsen et al., 2011; Misdorp, 1980) (Figure 10). Comme chez l'humain, l'OS canin produit de l'os ou des substances

ostéoïdes. Le type ostéoblastique est majoritaire chez les deux espèces (Klein and Siegal, 2006; Loukopoulos and Robinson, 2007). La localisation de la tumeur est également semblable dans les deux espèces, avec une part prépondérante au niveau du squelette appendiculaire (Morello et al., 2011). Les similitudes entre l'OS humain et l'OS canin font de ce dernier un bon modèle animal, en complément des modèles *in vitro* et murins précédemment décrits (Simpson et al., 2017).



Figure 10 : Patte antérieure de chien atteint d'ostéosarcome. La flèche indique la formation de la masse tumorale au niveau distal de la patte avant. Modifié de (Dawe, 2007).

Le modèle zebrafish (ou poisson-zèbre, *Danio rerio*) est un modèle utilisé pour étudier la croissance tumorale, la migration et l'invasion des cellules tumorales dans les cancers (Marques et al., 2009). Après injection de cellules tumorales humaines fluorescentes, quelques jours sont suffisants pour observer les processus de prolifération, migration et invasion sans la nécessité d'un appareillage particulier. Ce modèle est utilisé dans cette thèse.

Les modèles animaux, bien qu'imparfaits ou contraignants, sont indispensables pour la mise au point de nouveaux moyens de traitement efficaces.

### **Les nouvelles approches thérapeutiques dans l'OS**

De nouvelles approches thérapeutiques sont actuellement développées afin d'améliorer le pronostic des patients.

### *L'immunomodulation*

L'immunomodulation est la modification de l'immunité ou de la réponse immunitaire. Parmi ces méthodes se trouve l'utilisation des interférons (IFN). Ce sont des glycoprotéines de la famille des cytokines qui sont produites notamment par les cellules immunitaires en réponse à des infections virales. Ces cytokines ont démontré une certaine efficacité dans les cancers (Tarhini and Kirkwood, 2012). Dans l'OS, l'IFN- $\alpha$ -2b inhibe la croissance des cellules tumorales et celle de tumeurs PDX (Shaikh et al., 2016). La stimulation du système immunitaire peut également être réalisée par des molécules synthétiques telles que le mifamurtide. Il s'agit d'un dérivé synthétique d'un peptidoglycane composant la membrane plasmique du bacille Calmette-Guerin. Cette molécule présente des effets immunostimulants. Dans le cancer, le mifamurtide induit l'activation des monocytes et macrophages contre les tumeurs, via la sécrétion d'IL-6, de TNF $\alpha$  et l'augmentation de la phagocytose. Des essais précliniques réalisés dans des modèles animaux ont montré une augmentation de la durée de vie sans évènement des individus traités par le mifamurtide (MacEwen et al., 1989; Meyers et al., 2008). Un essai clinique de phase III a montré une augmentation significative de la survie sans évènement de patients atteints d'OS.

### *L'inhibition de la résorption osseuse*

Certaines stratégies thérapeutiques sont basées sur l'inhibition des ostéoclastes. Ce faisant, elles réduisent le remodelage osseux pathologique et ses conséquences (ostéolyse, hypercalcémie...), et impactent directement le cercle vicieux. Dans cette catégorie, se trouvent notamment les inhibiteurs de RANK/RANKL. Le récepteur RANK et son ligand RANKL, ainsi que le récepteur leurre OPG sont étroitement associés au remodelage osseux. Ils contrôlent la différenciation des ostéoclastes via l'activation de NF- $\kappa$ B et JNK (Jun N-terminal kinase). RANK est exprimé par les cellules d'OS et cette expression affecte négativement la réponse au traitement et la survie (Lee et al., 2011; Trieb and Windhager, 2015). Plusieurs études ont décrit des effets bénéfiques au ciblage de la triade RANK/RANKL/OPG dans l'OS (de Groot et al., 2018; Heymann, 2012; Kupas et al., 2011; Lamoureux et al., 2007b; Stopeck et al., 2010). Le denosumab par exemple est un anticorps monoclonal dirigé contre RANKL. Il inhibe la fixation de RANKL à RANK reproduisant ainsi le rôle physiologique de récepteur leurre de l'OPG, en inhibant la différenciation

ostéoclastiques (de Groot et al., 2018; Savvidou et al., 2017). Le denosumab est actuellement en essai clinique de phase II dans l'OS, chez des patients résistants aux traitements conventionnels, ou en rechute (NCT02470091).

Les bisphosphonates (exemple duzolédrionate ; Figure 11) sont des molécules capables d'inhiber la résorption osseuse. Il s'agit d'analogues du pyrophosphate capables de se lier à l'hydroxyapatite constituant la matrice osseuse, et d'induire l'apoptose des ostéoclastes (Clemons et al., 2012). Ils sont utilisés pour le traitement de l'ostéoporose depuis 40 ans, mais aussi dans la maladie de Paget, le cancer du sein et le cancer de la prostate (Dhesy-Thind et al., 2017; Fleisch, 2002; Hortobagyi et al., 2017; Landre et al., 2019). Dans l'OS, le zoledronate a montré des résultats encourageants. *In vitro*, il inhibe la prolifération des cellules d'OS et induit la mort cellulaire (Muraro et al., 2007; B. Ory et al., 2007). De plus, le zoledronate sensibilise les cellules d'OS au traitement par irradiation, notamment en augmentant le stress oxydatif et en inhibant les mécanismes de réparation de l'ADN (E. H. Kim et al., 2016). *In vivo*, le zoledronate réduit la croissance tumorale, l'ostéolyse, l'angiogénèse, l'invasion des cellules tumorales et les métastases pulmonaires (Dass and Choong, 2007; Heymann et al., 2005; Koto et al., 2009; Ory et al., 2005). Un essai clinique de phase III (OS2006, NCT00470223) utilisant le zoledronate en combinaison avec la chimiothérapie n'a cependant pas montré d'amélioration de la survie (globale ou sans évènement) des patients atteints d'OS (Piperno-Neumann et al., 2016). Un essai clinique de phase I (METZOLIMOS, NCT02517918) est en cours dans l'OS, combinant le zoledronate avec le methotrexate, le cyclophosphamide et le sirolimus, un inhibiteur de mTOR.

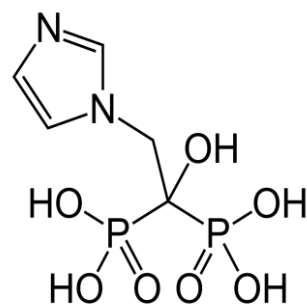


Figure 11 : Formule chimique du zoledronate.



## *Le ciblage des Récepteurs tyrosine kinase et de la signalisation intracellulaire*

Les récepteurs tyrosine kinase (RTK) sont des récepteurs transmembranaires possédant un domaine extracellulaire liant le ligand, et un domaine intracellulaire doté d'une activité kinase (exemple : IGF-R : insulin-like growth factor 1 receptor, PDGFR : platelet-derived growth factor receptor...). Les RTK sont impliquées dans la croissance cellulaire, la prolifération, la survie, notamment via leur implication dans des voies de signalisation telles que la voie PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) ou la voie des MAPK. Environ 30% des RTK sont mutés ou sur-exprimés dans les cancers, et 6 sous-familles, parmi les 20 sous-familles de RTK, sont particulièrement associées aux pathologies cancéreuses. Il s'agit des familles EGFR/ErbB (epidermal growth factor receptor), des récepteurs au PDGF, au FGF, au VEGF, à HGF (hepatocyte growth factor) et à l'IGF (Ségaly et al., 2015). L'expression de l'IGF est par exemple associée à une plus forte aggrégativité de l'OS (Jentzsch et al., 2014). Le récepteur AXL est surexprimé dans l'OS, et son expression est facteur de mauvais pronostic pour les patients (Han et al., 2013). De plus, son inactivation induit l'apoptose des cellules d'OS (Zhang et al., 2013). Plusieurs approches thérapeutiques ciblant les RTKs ont ainsi été développées mais se sont révélées relativement peu efficaces face à l'apparition de mécanismes de résistance. Les approches plus récentes basées sur les RTKi (inhibiteurs de RTK) privilégient le ciblage simultané de multiples RTK ou des voies d'activation constitutives des RTK, afin de contourner les mécanismes de résistance (Fleuren et al., 2014). L'imatinib (STI571) par exemple est un inhibiteur de RTK qui cible plusieurs récepteurs (PDGFR $\alpha$  et  $\beta$ , c-KIT, Axl, RYK (Related to receptor tyrosine kinase), EGFR, EphA (ephrin type-A receptor) 2 et 10, IGF1R) (Gobin et al., 2014). L'imatinib induit l'apoptose des cellules d'OS *in vitro* et réduit la croissance tumorale *in vivo* dans des modèles d'OS murins (Gobin et al., 2014; McGary et al., 2002). Il n'a cependant montré aucune activité dans un essai clinique de phase II (dans l'OS, le sarcome d'Ewing, le neuroblastome et les tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes) (Bond et al., 2008; Chao et al., 2010; Chugh et al., 2009). Le dasatinib (inhibiteur des RTK c-KIT, EphA2 et PDGFR $\beta$ ) a montré des résultats analogues. Il est utilisé pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique et la leucémie aigüe lymphoblastique (Shaikh et al., 2016). Dans l'OS, le dasatinib a montré des effets anti-métastatiques *in vitro*, mais a échoué à améliorer l'état des patients atteints d'OS (Aplenc et al., 2011; Hingorani et al., 2009). Deux études sont en cours (NCT00464620, NCT00788125), avec du dasatinib seul ou

en combinaison avec d'autres molécules. Un inhibiteur de l'activité de Met (récepteur de HGF) appelé PF-2341066, réduit la croissance tumorale dans un modèle murin de l'OS. Le sorafenib, inhibiteur du VEGFR, de PDGFR, RET et c-Kit, a montré des effets anti-angiogéniques et anti-métastatiques dans des modèles précliniques. Les résultats d'un essai clinique de phase II dans l'OS, indiquent que le sorafenib inhibe la progression tumorale à 6 mois chez la moitié des patients (Grignani et al., 2015; Pignochino et al., 2009).

L'inhibition des RTK est prometteuse et activement étudiée, mais d'autres approches visent à inhiber la signalisation intracellulaire, en aval des RTK. En effet, compte tenu de l'importance des voies de signalisation dans les processus cellulaires et dans le développement des cancers, dont l'OS, de nombreux inhibiteurs ciblant des membres de ces voies ont été développés. Il existe par exemple des inhibiteurs des membres de la famille SFK (Src family kinase), des protéines qui intègrent et régulent la signalisation de nombreux RTK (EGFR, PDGFR, IGF1R, VEGFR, HER2...). Via leurs cibles ou leurs partenaires, les membres de la famille SFK régulent la survie cellulaire, l'angiogénèse, la mobilité cellulaire... (Mayer and Krop, 2010). La kinase Src (Steroid Receptor Co-Activator) appartenant à cette famille est notamment impliquée dans l'activation des ostéoclastes dans les conditions physiologiques (Miyazaki et al., 2004). Src est surexprimé dans l'OS et d'autres types de cancers, et cette surexpression est corrélée à une survie moins importante du patient (Hu et al., 2015).

Des inhibiteurs de mTOR ont également été développés. Il s'agit d'une sérine/Thréonine kinase intervenant dans la voie PI3K/Akt dérégulée dans la plupart des cancers (Dancey, 2005; Shaw and Cantley, 2006). mTOR est impliquée dans la synthèse protéique, le cycle cellulaire ou la survie et il est surexprimé dans l'OS (Benjamin Ory et al., 2007; Perry et al., 2014; Zhou et al., 2010). En plus du sirolimus mentionné précédemment, la catégorie des inhibiteurs de mTOR comprend également le ridaforolimus, un analogue de la rapamycine testé en essai clinique de phase III dans les sarcomes osseux métastatiques. Il a montré une inhibition faible mais statistiquement significative de la progression tumorale chez les patients (Chawla et al., 2012; Demetri et al., 2013). Le CC-115 est un analogue du thalidomide (Corral et al., 1996) inhibant mTOR, mais aussi la sérine/thréonine kinase DNA-

PK (DNA-dependent Protein Kinase) impliquée dans la réparation de l'ADN. Le traitement des cellules d'OS avec le CC-115 augmente leur sensibilité à la chimiothérapie au cisplatine et à l'étoposide (Li et al., 2015). Un essai clinique de phase I est en cours dans plusieurs tumeurs, dont l'OS (NCT01353625).

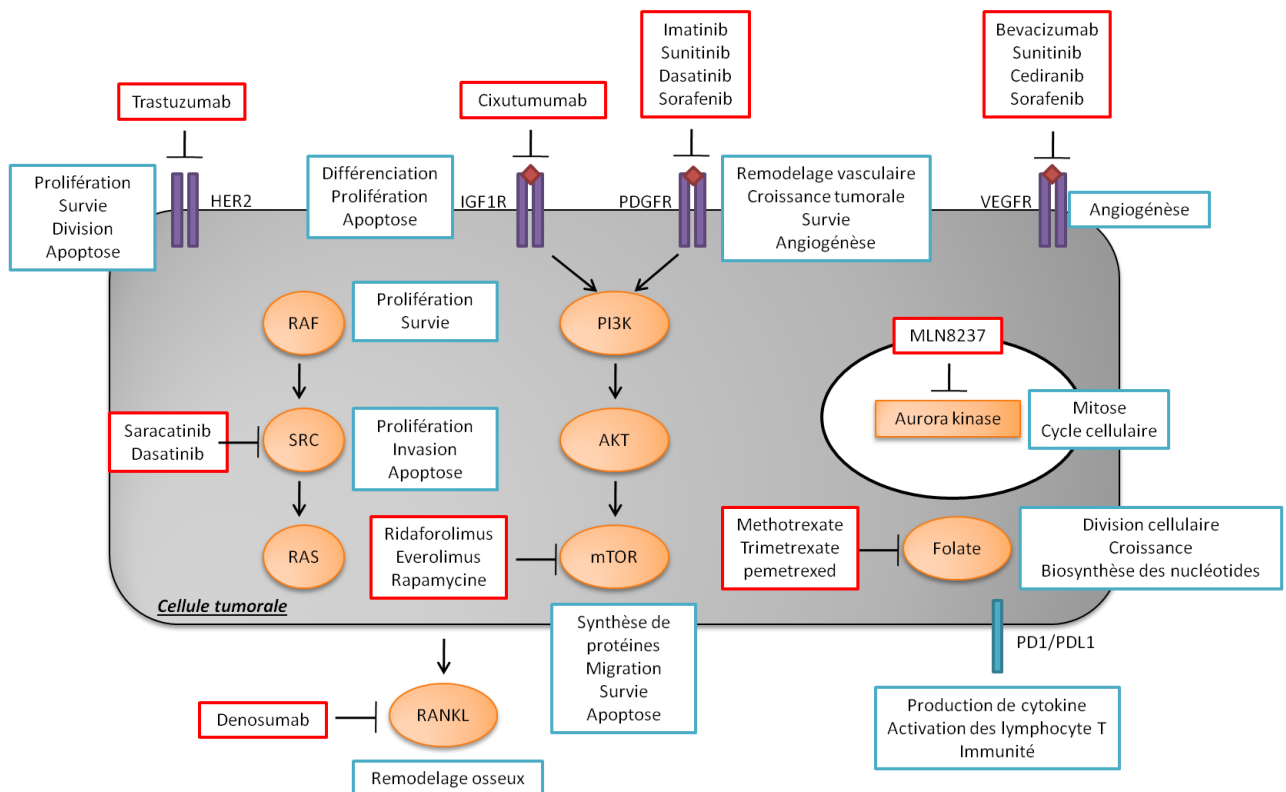


Figure 12 : Exemple de cibles thérapeutiques potentielles en développement dans l'OS. HER2 : human epidermal growth factor receptor 2, IGF-R : insulin-like growth factor 1 receptor, PDGFR : platelet-derived growth factor receptor, VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor, PD-1 : programmed cell death 1, PDL-1 : programmed cell death ligand 1, RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, HER2 : human epidermal growth factor receptor 2, mTOR : mammalian target of rapamycin, RANKL : Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, PI3K : Phosphoinositide 3-kinase. Adapté de (Shaikh et al., 2016).

Ainsi, de nombreuses cibles thérapeutiques sont actuellement étudiées dans le traitement de l'OS. Souvent très ciblées, elles pourraient se heurter à l'hétérogénéité tumorale. En effet, la tumeur est constituée d'un ensemble de populations clonogéniques qui ont évoluées et présentent des caractéristiques et des expressions géniques différentes. L'utilisation d'approches thérapeutiques ciblées vers une population tumorale restreinte expose notamment à des récives dues à la prolifération de populations cellulaires non affectées par le traitement.

Dans ce contexte, le ciblage d'un ou de mécanismes uniquement partagés par les cellules tumorales présente un avantage certain : impacter toutes les cellules tumorales, tout en épargnant les cellules saines. Une des caractéristiques partagée par toutes les cellules tumorales est le stress auxquelles elles sont soumises.

## **Le stress cellulaire**

Le stress est une modification plus ou moins durable des conditions de vie optimales des cellules, sous l'effet d'agents agresseurs externes (environnement) ou internes. Ces modifications mettent en danger le bon déroulement des processus cellulaires via la dégradation des macromolécules (ARN, ADN, protéines...), et forcent la cellule à s'adapter pour survivre et proliférer. Pour se faire, la cellule doit être capable de détecter les changements de son environnement, de son milieu interne, et mettre en place des mécanismes de réponse capables de contrecarrer et réparer les effets de l'agent agresseur (Brown et al., 2017; Jacob et al., 2017). De nombreux agents de stress ont été décrits.

### **Le stress thermique (Heat-shock)**

Les organismes vivent et sont adaptés à une échelle donnée de température. Un changement brutal de cette température a des effets négatifs sur l'homéostasie. Ainsi, il a été montré qu'une température de 47°C est suffisante pour détruire des cellules en culture. De plus, l'ingestion d'aliments à de fortes températures induit la destruction des tissus du tractus gastrointestinal, des maladies telles que des ulcères du duodenum, de l'estomac ou des carcinomes oesophagiques (Labbadia and Morimoto, 2015; Maghsudlu and Yazd, 2017; Pearson and McCloy, 1989).

Des hausses de température faibles infligées sur le long terme sont également dommageables pour l'organisme (Paul et al., 2008; Tobey et al., 1999). Ainsi, un choc thermique de 42°C infligé pendant 30 minutes à des souris en développement diminue la viabilité et la mobilité des spermatozoïdes en induisant des dommages à l'ADN (Pérez-Crespo et al., 2008). Chez l'humain, une augmentation de température au-delà de

40°C mène à un dysfonctionnement de plusieurs organes. Il a par exemple été décrit une destruction du myocarde diminuant la capacité du cœur à réguler la pression sanguine. Ces dysfonctionnements sont liés notamment à une inflammation systémique (systemic inflammatory response syndrome ou SIRS) due à la destruction de la paroi de l'intestin et à l'invasion de l'organisme par les bactéries se trouvant dans sa lumière (Bouchama and Knochel, 2002; Leon and Helwig, 2010). Des phénomènes de coagulation anormaux participent également à la dégradation des tissus suite à un stress thermique. Ils sont dus à un dépôt anormal de fibrine et l'agrégation de thrombocytes dans les capillaires sanguins, menant à des micro-thromboses, des saignements tissulaires, puis à la mort (Bouchama et al., 1996; Leon and Helwig, 2010; Mora Camilo et al., 2017). Les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , INF $\gamma$ ) dont les expressions sont induites par le stress thermique, augmentent ces phénomènes de coagulation.

La destruction thermo-induite des organes et des tissus s'explique au niveau cellulaire notamment par le fait que la chaleur modifie la fluidité et la perméabilité de la membrane plasmique, augmentant le flux d'ions et impactant les fonctions membranaires de protection et de communication avec l'extérieur. De plus, la modification de la membrane impacte la structure des radeaux lipidiques et la modification de la répartition des protéines transmembranaires, perturbant ainsi la signalisation intracellulaire (Maghsudlu and Yazd, 2017; Török et al., 2014). D'autres membranes intracellulaires voient également leurs propriétés modifiées par le stress thermique. L'augmentation de la perméabilité protonique de la membrane mitochondriale interne impacte la fonction de la chaîne de transport des électrons. Il y a en effet une diminution de la différence de concentration d'ions H<sup>+</sup> entre la matrice mitochondriale et l'espace inter-membranaire. La phosphorylation oxydative s'en trouve donc négativement affectée, ainsi que tous les processus ATP dépendants dont la signalisation, les réactions enzymatiques, la transcription, la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire... (Kantidze et al., 2015; Kühl and Rensing, 2000; Maghsudlu and Yazd, 2017).

Les protéines sont également concernées par le stress thermique. Une augmentation soutenue de la température est susceptible d'altérer la conformation tridimensionnelle des protéines, impactant ainsi leur fonction. La dénaturation des protéines a pour second effet d'exposer les groupements hydrophobes des chaînes peptidiques, entraînant la formation d'agrégats dangereux pour l'homéostasie cellulaire et à l'origine de nombreuses maladies

neurodégénératives (Lepock, 2004; Lepock et al., 1993; McColgan and Tabrizi, 2018; Riek and Eisenberg, 2016; Wilkening et al., 2018). Le stress thermique peut également entraîner une destruction du cytosquelette, menant à une perturbation de la signalisation intracellulaire, du fait de la destruction des microtubules (Richter et al., 2010). La dénaturation thermo-induite des protéines est problématique dans tous les compartiments cellulaires, mais surtout dans le compartiment nucléaire. Le noyau est évidemment riche en protéines liées à l'ADN. Ces protéines participent à la structuration, la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN. La dénaturation des protéines nucléaires et la formation d'agrégats dans ce compartiment inhibe ces processus, entraîne l'accumulation de dommages à l'ADN et met en péril la survie cellulaire (Roti, 2008; Wong et al., 1993).

Enfin, il a été démontré que le stress thermique entraîne la production d'anions superoxydes ( $O_2^-$ ) via la perturbation de la membrane mitochondriale et de la chaîne de transport des électrons, et il diminue la production de l'ARNm de l'enzyme SOD-1 (superoxyde dismutase 1) (G. Ahmad et al., 2017; Mols et al., 2011). Cela aboutit à l'augmentation de la quantité intracellulaire d'espèce réactives de l'oxygène (ROS), un autre type d'agent de stress connu (Marcén et al., 2017; Raj et al., 2011; Volodina et al., 2017; Zhao et al., 2018)

### *Le stress oxydatif (les ROS)*

Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS) sont un groupe d'ions et de molécules incluant  $OH$ ,  $O_2^-$ ,  $^1O_2$  et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Pizzino et al., 2017). Ils contiennent tous un électron de valence non apparié ou des liaisons instables (Brieger et al., 2012). Les ROS sont produits lors de la phosphorylation oxydative au niveau des mitochondries (durant la production d'énergie). Environ 1% de l'oxygène consommé par la mitochondrie donnera naissance à un anion superoxyde  $O_2^-$ . La mitochondrie est l'une des plus grosses sources endogènes de ROS mais elle n'est pas la seule. Des réactions biochimiques et des processus se produisant au sein de la cellule telles que la synthèse de la prostaglandine ou la phagocytose sont aussi producteurs de ROS... Ces derniers peuvent également être produits par des agents exogènes tels que les rayonnements ionisants, divers agents chimiques, l'ischémie, les infections ou même le stress thermique (de Jager et al., 2017, 2017; Dickinson and Chang, 2011; Zhao et al., 2018).

En faible quantité, les ROS ont des rôles bénéfiques dans plusieurs processus biologiques. Ils interviennent par exemple dans l'immunité. En effet, les phagocytes synthétisent et stockent les ROS afin de détruire les organismes pathogènes. Ainsi, les patients atteints de maladies granulomateuses chroniques sont incapables de produire des ROS du fait d'un manque de l'enzyme NADPH oxidase (NOX2). Ces individus subissent des infections répétées dues à l'incapacité des macrophages et neutrophiles à détruire efficacement les bactéries (Brieger et al., 2012; Pizzino et al., 2017). Les ROS permettent également la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , INF $\gamma$  et la mise en place de la réponse immunitaire (Mittler, 2017).

Il a également été montré que le peroxyde d'hydrogène est un cofacteur de la thyroperoxydase, l'enzyme permettant la production de l'hormone thyroïde. Un manque de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les dual oxydases (DUOX) 1 et 2 conduit à une forme rare d'hypothyroïdisme (Erdamar et al., 2008; Moreno et al., 2002).

Au niveau cellulaire il a été montré que lors de la différenciation des adipocytes, mTORC1 augmente la biogénèse et l'activité des mitochondries, entraînant ainsi une augmentation de la production des ROS. Les ROS seraient ensuite responsables de la mise en place de la transcription médiée par PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), le facteur de transcription majeur de la différenciation adipocytaire. En effet, l'inhibition du complexe III des mitochondries par shARN réduit la production des ROS, et a pour conséquence la diminution de la quantité d'ARNm codant pour PPAR $\gamma$ , et la diminution de la transcription de ses cibles (Tormos et al., 2011). Les ROS sont également impliqués dans la différenciation hématopoïétique. En effet, leur diminution ou augmentation dans les précurseurs hématopoïétiques (riches en ROS) retarde ou accélère la différenciation. L'activation des facteurs de transcription FoxO (Forkhead box) et JNK par les ROS serait responsable de cette différenciation induite par les ROS (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009). Morimoto et ses collaborateurs ont également montré que la prolifération des cellules souches spermatogoniales murines dépendait de l'activation des voies MAPK et JNK dépendante des ROS (Morimoto et al., 2013).

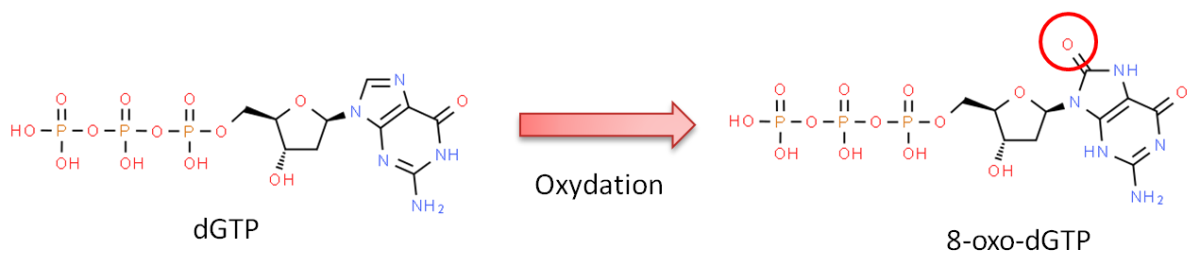
Les ROS sont bénéfiques pour la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que d'autres processus biologiques à l'échelle de l'organisme. Cependant, une forte concentration intracellulaire de ROS est dommageable et est à l'origine de plusieurs pathologies. C'est le cas des maladies cardiovasculaires. En effet, les ROS sont impliquées dans l'hypertension, via la dégradation du monoxyde d'azote (NO), qui joue le rôle vasodilatateur (Ceriello, 2008). Un haut niveau de ROS est également observé dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, mais aussi la dépression et la perte de mémoire. Dans la maladie d'Alzheimer, l'accumulation de  $\beta$ -amyloïde dans la mitochondrie entraîne une forte production de ROS qui induisent des effets cytotoxiques sur les neurones (W. Ahmad et al., 2017; Brieger et al., 2012; Christen, 2000; Pizzino et al., 2017). Les effets négatifs des ROS sont notamment dus à leur capacité à modifier les macromolécules (protéines, ARN, ADN, lipides) par oxydation (P. Chen et al., 2017).

La peroxydation lipidique est une réaction qui implique les ROS, des composés lipidiques, et conduit à la production de radicaux lipidiques. La peroxydation peut ainsi mener à la modification des propriétés de la membrane plasmique et à sa destruction. La destruction de la bicouche lipidique entraîne la modification des gradients, la perturbation des échanges entre la cellule et son milieu, la perturbation de nombreux processus cellulaires, et la mort cellulaire (Jaeschke and Ramachandran, 2018). La cytotoxicité des lipides oxydés se manifeste par un autre phénomène : les produits de dégradation de ces lipides modifiés sont en effet hautement réactifs. Ils peuvent former des liaisons covalentes avec les groupements amines des protéines et créer des interactions protéines-protéines. Ces interactions peuvent conduire à des inflammations, ou à des interactions protéines-ADN et induire des mutations de l'ADN (Gaschler and Stockwell, 2017; Yan et al., 2017).

Les molécules d'ADN peuvent également être directement modifiées par les ROS. Les ROS peuvent interagir chimiquement avec les nucléotides libres ou intégrés à la double hélice, générant des bases modifiées appelées nucléotides oxydés ou oxonucléotides (Boiteux et al., 1992). L'oxydation est plus susceptible de se produire pour les nucléotides libres que pour ceux intégrés à l'ADN (Kamiya and Kasai, 1995; Kasai and Nishimura, 1984). Les guanines sont les nucléotides les plus susceptibles à l'oxydation par les ROS (Figure 13). Leur exposition aux ROS entraîne une oxydation de leur carbone C8, donnant naissance au 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-dG), le plus abondant des oxonucléotides (avec le 2'-deoxy-2-



hydroxyadenosine triphosphate, 2-OH-dATP). Une fois intégré à l'ADN, le 8-oxo-dGTP peut s'apparier aux bases adénine ou cytosine lors de la réplication et entraîner des transversions (G->T ou A->C) (Barzilai and Yamamoto, 2004; Fleming and Burrows, 2017; Kasai et al., 1986; Katafuchi and Nohmi, 2010; Nakabeppu et al., 2006; Pavlov et al., 1994). Les mécanismes de réparation par BER (base excision repair) mis en place par la cellule peuvent mener à des cassures de la double hélice, puis à la mort cellulaire par apoptose via la voie p53 (Barzilai and Yamamoto, 2004; Sharpless and DePinho, 2002).



**Figure 13 : Oxydation de la désoxyguanosine triphosphate (dGTP). Le 8-oxo-dGTP provient de l'attaque du carbone C8 par des radicaux libres.**

Les protéines peuvent également être modifiées par les ROS, soit indirectement (via la réaction avec des sucres ou lipides oxydés), soit directement (via la modification de leurs acides aminés) (Levine and Stadtman, 2001). L'oxydation des protéines forme des groupements carbonyles (aldéhydes et cétones) sur leurs chaînes latérales (essentiellement sur les acides aminés R, K, T et P) (Dalle-Donne et al., 2003). L'oxydation des protéines entraîne la perte de la fonction et de la structure des protéines. Les modifications des protéines par les ROS perturbent donc les processus cellulaires. L'oxydation des protéines peut entraîner leur agrégation, ce qui peut mener à la mort cellulaire (Sies et al., 2017; Vasilaki et al., 2017). Il se crée une boucle: les agrégats protéiques inhibent la fonction du protéasome, et empêchent ainsi leur dégradation, ce qui amplifie la formation d'agrégats protéiques (Lefaki et al., 2017). Cela est notamment problématique dans le cerveau où est consommé 25% de l'oxygène absorbé. Dans cet organe, l'accumulation des protéines suite au stress oxydatif peut mener à la mort des cellules gliales et des neurones, et au développement de maladies neurodégénératives (Stefanatos and Sanz, 2018).

## *Le stress du réticulum endoplasmique*

Le réticulum endoplasmique (RE) est responsable du repliement et de la maturation d'environ 30% des protéines produites par la cellule (Oakes, 2017). Les protéines mal repliées sont prises en charge par le processus de dégradation associé au RE (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation : ERAD) (McCracken and Brodsky, 2003; Meusser et al., 2005). La machinerie de dégradation du RE peut cependant être submergée, menant à l'agrégation de protéines mal repliées dans le lumen, un phénomène appelé stress du RE.

De nombreux phénomènes tels que l'hypoxie, l'oxydation, le stress thermique, mais aussi les traitements peuvent entraîner une accumulation de protéines mal repliées et un stress du RE. À cela peuvent s'ajouter le manque de nutriments ou la perturbation de l'homéostasie calcique (via la modification des propriétés de la membrane plasmique par exemple). Le dérèglement de l'homéostasie calcique peut impacter les chaperonnes du RE calcium dépendantes telles que la calnexine, la calreticuline, GRP78/BiP (glucose-regulated protein78/Binding immunoglobulin protein) ou GRP94 (Bettigole and Glimcher, 2015; Carreras-Sureda et al., 2018). Les mutations géniques sont également susceptibles de mener à la formation d'agrégats via la modification de la conformation des protéines et l'exposition des régions hydrophobes des chaînes peptidiques (Klaips et al., 2018) (Figure 14). Les agrégats protéiques peuvent mener à la mort cellulaire, par apoptose. Celle-ci est induite par plusieurs mécanismes, dont la diminution de l'expression de la protéine anti apoptotique Bcl-2, mais aussi par la production de ROS dans le lumen (via l'activation de la transcription de l'oxydase ERO1 $\alpha$  (endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha) par le facteur de transcription CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein)) (Marciniak et al., 2004; Tabas and Ron, 2011). Les agrégats protéiques peuvent également être responsables d'inflammations. La mort cellulaire liée au stress du RE peut être la cause de maladies telles que le diabète, l'athérosclérose, les maladies rénales ou les maladies neurodégénératives (Kaufman, 2002). C'est le cas notamment de la sclérose latérale amyotrophique (ALS), une maladie neurodégénérative qui détruit les neurones moteurs dans le cerveau, le tronc cérébral et la moelle épinière. Le mauvais repliement et la subséquente agrégation de protéines dont la superoxyde dismutase (SOD1) ou l'ubiquitine 2

ont été mis en cause dans la destruction des neurones moteurs dans l'ALS (Parakh and Atkin, 2016).

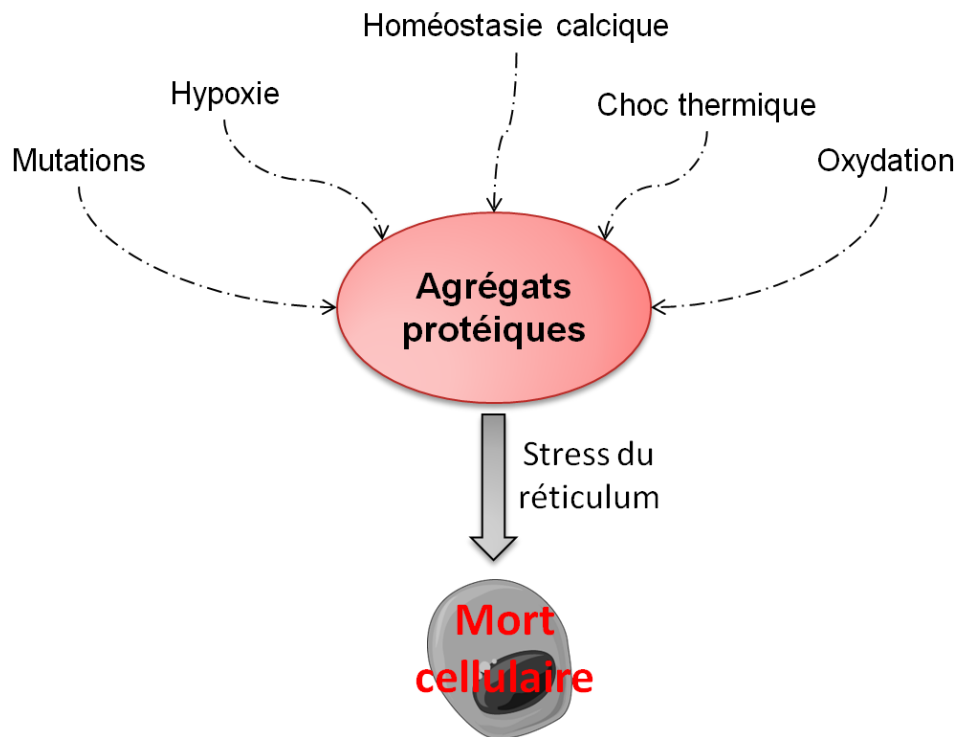


Figure 14 : Mécanismes à l'origine du stress du réticulum endoplasmique. Les mutations géniques, l'hypoxie, le stress oxydatif ou le dérèglement de l'homéostasie calcique peuvent entraîner l'agrégation de protéines dans le RE et mener à la mort cellulaire.

## L'hypoxie

L'oxygène est l'accepteur final des électrons dans la chaîne respiratoire. Sa présence est nécessaire à la vie des organismes complexes (Cavadas et al., 2017). L'hypoxie correspond à un déséquilibre entre la demande cellulaire en oxygène et sa disponibilité. Elle peut survenir en cas de thrombose, d'intoxication au monoxyde de carbone, d'anémie ou même d'inflammation et peut avoir des conséquences délétères sur l'organisme. L'absence de l'accepteur final des électrons empêche la production d'énergie via le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. Les conditions hypoxiques sont également génératrices de ROS

(Netzer et al., 2015) cette production de ROS se fait au niveau du complexe III de la mitochondrie (Azimi et al., 2017). Tel que décrit précédemment, les ROS peuvent oxyder les macromolécules et mener à la mort cellulaire (Gerber and Rutter, 2017).

### *Le rayonnement ultraviolet*

Les UV (rayonnements ultraviolets) sont une partie du spectre électromagnétique dont les longueurs d'onde vont de 100 à 400nm. Leurs effets vont de simples érythèmes, aux cancers, en passant par les gonflements, des douleurs et des effets sur la vue tels que la cataracte (Watson et al., 2016). Les UV sont capables d'induire des dommages et mutations de l'ADN (P. Mao et al., 2017). En effet, les UV (essentiellement les UV de type B de 290 à 320nm) sont capables de former des liaisons entre deux bases pyrimidines adjacentes sur le même brin d'ADN (Ichihashi et al., 2003). Mais les UV peuvent également induire des dommages à l'ADN via la production de ROS (Bossi et al., 2008; Yasui and Sakurai, 2000). La production de ROS serait le résultat de la stimulation de l'enzyme catalase par les UVB (Heck et al., 2003; Murakami et al., 2008).

## **Les mécanismes de protection contre le stress cellulaire**

Des mécanismes de défense sont apparus au cours de l'évolution pour permettre à la cellule de lutter contre le stress cellulaire. Leur relative conservation inter-espèces est la preuve de leur importance dans la survie des organismes (Brown et al., 2017).

### *La heat-shock response*

La découverte de la Heat-shock Response (HSR) a été faite par Ferruccio Ritossa au début des années 1960. Il travaillait sur la transcription des chromosomes polytènes, des chromosomes géants présents notamment dans les glandes salivaires des larves de *Drosophila*. L'observation de la transcription des polytènes est en effet visible au microscope

optique, sous la forme de « puffs », des régions diffuses où se fait la transcription. Suite à une augmentation accidentelle de la température de l'incubateur contenant son échantillon, Ritossa nota une modification rapide (deux à trois minutes) des régions transcrites. Un phénomène qu'il reproduira afin de l'étudier (De Maio et al., 2012; Park et al., 2005; Ritossa, 1996, 1962).

La HSR (Figure 15) est un mécanisme majeur de réponse au stress cellulaire qui, contrairement à ce que laisse penser son nom, est impliqué dans la réponse à plusieurs types de stress (le stress thermique, le stress oxydatif, les métaux lourds, les infections, les toxines...) (Akerfelt et al., 2010). Il s'agit d'un mécanisme très conservé au cours de l'évolution, retrouvé chez l'humain, les rongeurs, la volaille, mais aussi les végétaux et les levures (Brown et al., 2017; Jacob et al., 2017; Schopf et al., 2017). Le rôle de la HSR est la protection de la protéostasie (homéostasie protéique), en permettant le bon repliement des protéines. De ce fait, la HSR permet le maintien des fonctions protéiques et empêche la dégradation ou l'agrégation de protéines anormales, qui pourrait conduire à la mort cellulaire. Ce rôle de gardien des principaux effecteurs cellulaires que sont les protéines, implique donc indirectement les acteurs de la HSR dans de nombreux processus biologiques clés pour la cellule.

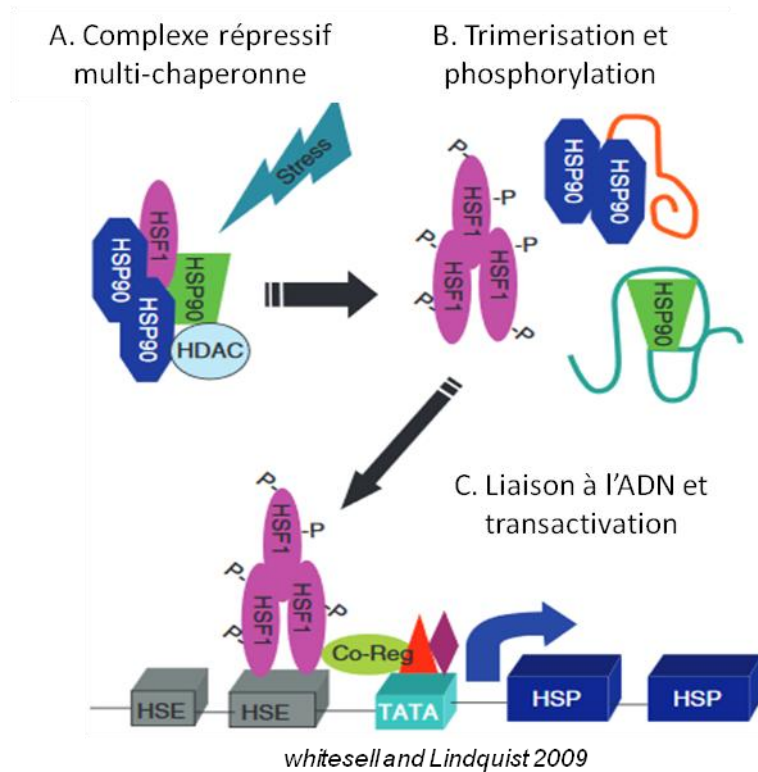


Figure 15 : Schéma de la régulation de la heat-shock response (HSR) par le facteur de transcription HSF1 (Heat shock factor 1). En condition normale, HSF1 est piégé dans un complexe cytoplasmique formé notamment par les protéines de la famille des HSP (heat-shock protein) 70 et 90. Le stress cellulaire induit un détournement des HSP de HSF1 vers les protéines dénaturées, libérant ainsi HSF1. Ce dernier est trimérisé, phosphorylé et transloqué dans le noyau où il se lie à l'ADN, sur des séquences HSE (Heat shock element) et induit la transcription de gènes cibles. Modifié de (Whitesell and Lindquist, 2009a).

Les protéines chaperonnes (Heat Shock Proteins ; HSP) sont au cœur de la HSR. Le consensus actuel est qu'il en existe 6 classes, en fonction de leurs poids moléculaires : HSP100, 90, 70, 60, 40 et les small HSP (sHSP) (Brandvold and Morimoto, 2015). Les chaperonnes reconnaissent les protéines mal repliées, appelées clientes, en détectant l'exposition d'acide aminés hydrophobiques (Richter et al., 2010). Elles permettent ensuite le bon repliement de ces protéines clientes, mais aussi le transport, l'ubiquitination et la dégradation des protéines par le protéasome (Brandvold and Morimoto, 2015; Doyle et al., 2013; Lindquist and Craig, 1988; Smith et al., 2015). Les chaperonnes empêchent donc l'agrégation de protéines dans les compartiments cellulaires.

Les chaperonnes sont régulées par un ensemble de facteurs de transcription appelés Heat-shock Factors (HSF). Ces protéines sont capables de reconnaître des séquences consensus

appelées Heat-shock Element (HSE) et de réguler la transcription des chaperonnes notamment après un stress cellulaire. Chez *Homo sapiens* la famille des HSF compte 6 membres : HSF1, 2, 4, 5, X et Y (la protéine HSF3 n'étant pas présente chez l'homme) (Åkerfelt et al., 2010). HSF1 est le membre le plus étudié. Il est le régulateur majeur de la HSR (Goodson et al., 1995). Sa structure et sa fonction seront abordées en détail plus tard dans ce manuscrit. HSF2 est le deuxième membre de la famille des HSF le plus étudié. Il est notamment impliqué dans le développement précoce et la régulation des sous-unités du protéasome. HSF2 intervient également dans l'expression constitutive des chaperonnes et peut interagir avec HSF1 pour réguler la HSR (De Thonel et al., 2011a; Fujimoto and Nakai, 2010; Lecomte et al., 2010; McMillan et al., 1998; Stephanou and Latchman, 2011). HSF4 serait impliqué dans le développement du cristallin et la délétion de son gène provoque des cataractes (Fujimoto et al., 2008). HSF4 induit l'expression des chaperonnes  $\alpha$ -Bcrystallin et HSP25 dans l'oeil en réponse à un stress chimique par la staurosporine (un inhibiteur de kinases) (Cui et al., 2015). La preuve de la traduction du transcrit codé par le gène HSF5 chez l'humain n'a pas encore été établie, mais il est impliqué dans la prolifération, la survie et la transduction du signal dans les gonades du zébrafish (Saju et al., 2018). Enfin, HSF X et Y sont peu étudiés, mais il a été démontré que la délétion du gène HSF Y entraîne l'infertilité masculine (Gomez-Pastor et al., 2018; Tessari et al., 2004).

Les HSF ne sont pas seules responsables de l'expression des chaperonnes. Plusieurs facteurs de transcription sont capables d'induire l'expression des chaperonnes en réponse à différents mécanismes. Stephanou et al. ont par exemple montré que les facteurs de transcription NF-IL6 et NF-IL6 $\beta$  (nuclear factor IL-6 et IL6 $\beta$ ), induits par l'IL-6 (Akira et al., 1990, p. 6; Wang et al., 2019), lient le promoteur de HSP90 et régulent positivement son expression dans des conditions de non-stress ou de heat-shock (Stephanou et al., 1997; Stephanou and Latchman, 2011). Cet effet est contraire à celui de STAT-3 (Signal transducer and activator of transcription-3) qui est lui aussi activé par l'IL-6 et capable de se lier au promoteur de HSP90. Cependant, son action sur l'expression de HSP90 est inhibitrice en cas de stress thermique (Stephanou et al., 1998; Stephanou and Latchman, 2011). Il a également été montré que STAT1 peut interagir avec HSF1, et que les deux facteurs de transcription induisent l'expression de HSP70 et HSP90 suite à une stimulation par l'interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Stephanou et al., 1999; Stephanou and Latchman, 2011).

## *L'unfolded protein response*

Comme son nom l'indique, l'UPR (unfolded protein response) (Figure 16) est déclenché quand un niveau critique de protéines mal-repliées, agrégées, est détecté dans le lumen. L'UPR permet transcription des gènes impliqués dans la réponse au stress du RE, notamment chaperonnes du RE. Tout comme la HSR, l'UPR est très conservée chez les eucaryotes (Bettigole and Glimcher, 2015; Tabas and Ron, 2011). Elle est basée sur trois protéines principales jouant le rôle de senseurs du stress du RE. Il s'agit de IRE1 $\alpha$  (inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ ), PERK (Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase), et ATF6 (activating transcription factor 6). Ces trois protéines possèdent chacune un domaine intraluminal capable de détecter le niveau de stress du RE. Dans les conditions normales, les régions intraluminales de PERK, ATF6 et IRE1 $\alpha$  sont masquées et maintenues inactives par la chaperonne GRP78/BiP, de la famille des HSP70 (Bertolotti et al., 2000). Cette dernière a cependant une plus grande affinité pour les protéines mal repliées induites par le stress. Son départ après un stress entraîne le démasquage des régions intraluminales des protéines senseurs, ce qui conduit à leur oligomérisation et à la transduction d'un signal vers le cytoplasme. Ce signal peut conduire à l'augmentation de la taille du RE par la production de lipides, le ralentissement de la synthèse protéique et l'augmentation de l'expression des chaperonnes du RE (Oakes, 2017). Tous ces processus visent à réduire le stress du RE en augmentant sa capacité à prendre en charge les protéines mal repliées présente dans sa lumière.

Des preuves de l'interconnection entre la HSR et l'UPR ont été décrites dans la littérature. Les deux mécanismes de résistance ont en effet des cibles communes, dont la chaperonne BiP qui est augmentée dans la HSR et l'UPR (Kohno et al., 1993). De plus, dans les cellules ayant une UPR défectueuse, l'activation constitutive de HSF1 est suffisante pour protéger du stress du RE (Liu and Chang, 2008a).



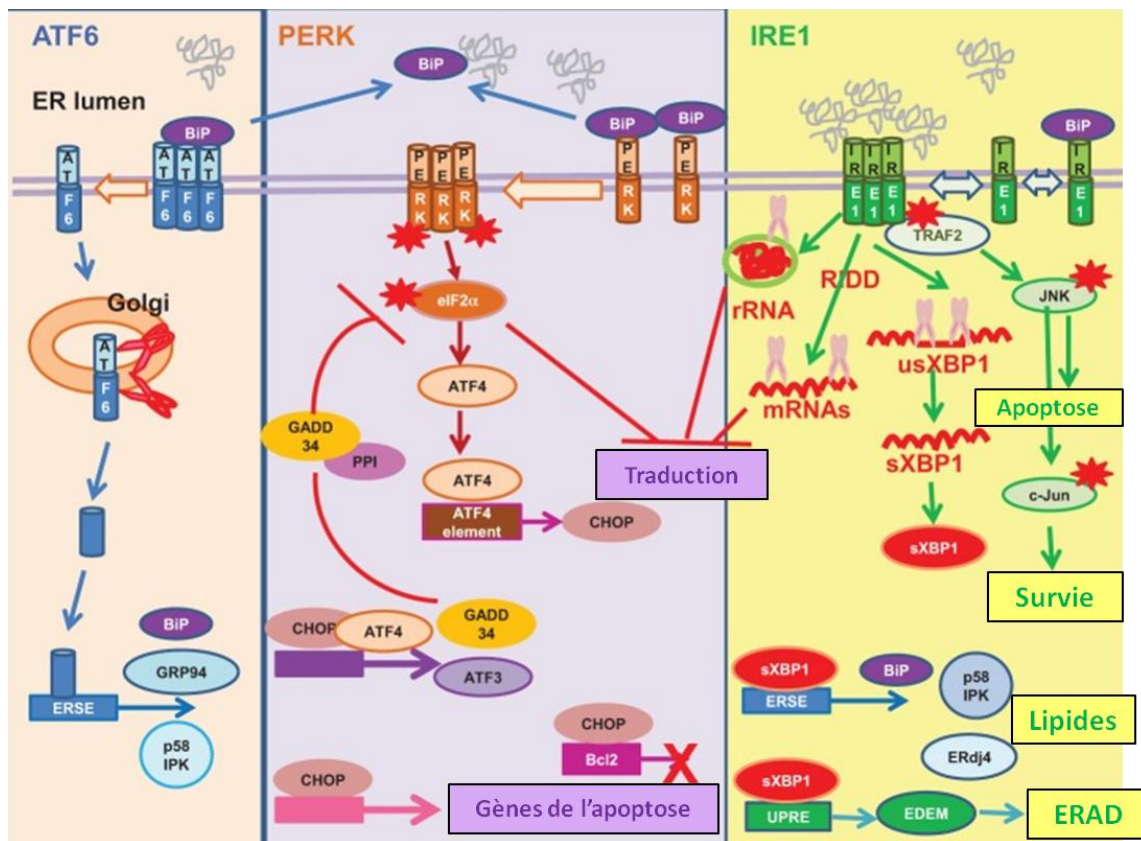


Figure 16 : Schéma de l'activation de l'unfolded protein response. Dans les conditions physiologiques, les régions intraluminales de PERK, ATF6 et IRE1 $\alpha$  sont masquées par BiP. Le stress entraîne le départ de BiP et le démasquage des régions intraluminales des protéines senseurs, ce qui conduit à leur oligomérisation et à la transduction d'un signal vers le cytoplasme et la transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress du RE. ER : Reticulum endoplasmique, ATF : Activating transcription factor, GADD34 : DNA damage-inducible protein 34, XBP-1 : X-box binding protein 1, TRAF2 : TNF receptor-associated factor 2, CHOP :CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein, JNK : c-Jun N-terminal kinase, ERAD : ER-associated degradation, EDEM : ERAD-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein, BiP : Binding immunoglobulin protein, IRE1 :Inositol-requiring enzyme 1, PERK : Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase. Modifié de (Chan, 2014).

### La protection contre les ROS : la voie NRF2-keap1

Le stress oxydatif est dû à une forte production de ROS. Les mécanismes de défense cellulaires visent donc à maintenir leur concentration à un niveau favorable à la survie. Pour ce faire, les cellules peuvent utiliser des antioxydants (Vitamine E, A, l'enzyme superoxydedismutase, le glutathion...) (Raj et al., 2011). Mais l'arsenal cellulaire anti-ROS est également constitué d'enzymes qui réparent les conséquences des ROS. Ainsi, des glycolases sont capables d'exciser des bases mésappariées. En effet, OGG1 excise les 8-oxo-dG appariés

à des cytosines dans la double hélice d'ADN, ou le MutYhomolog (MUTYH) excise les adénines appariées à des 8-oxo-dG (Oka and Nakabeppu, 2011). Ces enzymes amorcent ainsi la réparation de l'ADN.

Le facteur de transcription majeur régulant la réponse au stress oxydatif est NRF2 (NF-E2-related factor 2) (Hybertson et al., 2011; Itoh et al., 1997). Il fait partie du système Kelch-like ECH-associated protein 1-NF-E2-related factor 2 (Keap1-NRF2) qui protège du stress oxydatif, mais aussi du stress chimique.

Dans les conditions normales, la protéine Keap1 est liée à NRF2 grâce au domaine Neh2 de ce dernier. Keap1 est un adaptateur pour les ubiquitine ligases, il permet donc la dégradation de NRF2 par le protéasome (Itoh et al., 2003). Le stress oxydatif entraîne l'abolition de la liaison entre Keap1 et NRF2, et la translocation de ce dernier dans le noyau. NRF2 se fixe alors à des séquences ARE (Antioxidant Response Element) présentes dans les régions régulatrices de ses gènes cibles (Fuse and Kobayashi, 2017; Nguyen et al., 2009). Parmi les cibles de NRF2 se trouvent des enzymes qui diminuent le stress oxydatif. À titre d'exemple, la superoxyde dismutase 2 (SOD2) est une cible de NRF2. Il s'agit d'une enzyme qui catalysent la réaction  $2 O_2^{\cdot -} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ . Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) produit est transformé en eau par la catalase, une autre cible de NRF2 (Xiong et al., 2015). NRF2 régule également l'expression du complexe glutamate-cystéine ligase (Gcl), responsable de la production du glutathion, l'un des antioxydants majeurs de la cellule. Le glutathion est un tripeptide utilisé par plusieurs enzymes inactivatrices de ROS, telles que la glutathion peroxidase 2 (réductrice des lipides peroxydés) et plusieurs glutathion S-transferases. NRF2 régule également l'expression de l'enzyme thiorédoxine intervenant dans la réduction des protéines oxydées, limitant ainsi leurs effets délétères, précédemment décrits (Chanas et al., 2002; Harvey et al., 2009; Hawkes et al., 2014; Tonelli et al., 2018).

La voie NRF2-Keap1 et la réponse au stress oxydatif ne sont pas des processus isolés, ils interagissent avec les autres mécanismes de résistance au stress cellulaire. NRF2 est ainsi impliqué dans le stress du RE. Sa transcription est en effet activée par PERK en réponse à ce type de stress (Cullinan et al., 2003; Cullinan and Diehl, 2004). NRF2 possède des cibles communes avec HSF1, dont les chaperonnes HSP70 et 27 par exemple (Jain et al., 2010;

Samarasinghe et al., 2014), et la transcription de HSF1 est activée par NRF2 en cas de stress oxydatif, grâce à des séquences ARE contenues dans son promoteur (Paul et al., 2018a).

Le stress oxydatif peut être une conséquence de l'hypoxie (Azimi et al., 2017; Netzer et al., 2015), NRF2 est ainsi impliqué dans la réponse à la diminution d'oxygène via plusieurs mécanismes décrits dans la littérature (Toth and Warfel, 2017). Il a par exemple été démontré que NQO1 (NADH dehydrogenase quinone 1), cible de NRF2, inhibe la dégradation de HIF (Hypoxia-inducible factor) 1 $\alpha$  par le protéasome, augmentant ainsi sa disponibilité (Oh et al., 2016).

### *La réponse à l'hypoxie : le facteur de transcription HIF-1*

HIF-1 $\alpha$  est avec HIF-1  $\beta$  une sous-unité de HIF-1, un facteur de transcription régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie (Semenza and Wang, 1992; Toth and Warfel, 2017; Wang et al., 1995). En conditions normoxiques, HIF-1 $\beta$  est exprimé de manière ubiquitaire, tandis que HIF-1 $\alpha$  est hydroxylé sur deux de ses résidus proline (402 et 564) par PHD2 (prolyl hydroxylase domain 2). Cette hydroxylation induit l'interaction de HIF-1 $\alpha$  avec la protéine Von Hippel-Lindau (VHL) et sa destruction par le protéasome. Quand la concentration en oxygène chute en dessous de 2%, l'activité de PHD2 est diminuée. Cela entraîne une accumulation de HIF-1 $\alpha$  et son association avec HIF-1 $\beta$ . Le facteur de transcription HIF-1 régule l'expression de gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie (Fong and Takeda, 2008; Jaakkola et al., 2001; Kiers et al., 2016; Shimoda and Laurie, 2014).

HIF-1 induit par exemple l'angiogénèse et l'érythropoïèse, via la production de VEGF (Vascular endothelial growth factor) et d'EPO (érythropoïétine), afin d'augmenter la disponibilité et l'acheminement de l'oxygène jusqu'aux cellules (Cavadas et al., 2017). HIF-1 inhibe également la pyruvate déshydrogénase (PDH) via l'induction de la pyruvate déshydrogénase kinase-1 (PDK1). HIF-1 inhibe ainsi la transformation du pyruvate en acétyl CoA, et donc le cycle de Krebs. À l'inverse, HIF-1 induit la lactate déshydrogénase (LDHA) ainsi que les enzymes impliquées dans la glycolyse et les transporteurs de glucose (GLUT) (Cavadas et al., 2017; Masoud and Li, 2015). HIF-1 favorise ainsi la glycolyse aux dépens du

cycle de Krebs pour la production d'énergie. De ce fait, HIF-1 empêche une production importante de ROS résultant d'une chaîne respiratoire inefficace car privée d'oxygène, accepteur final d'électrons (Semenza, 2012).

La cellule dispose donc d'un système de défense très conservé afin de répondre à de nombreux stress aussi bien brefs que chroniques.

### *Le stress dans le cancer*

La transformation maligne fait subir à la cellule un stress constant. La cellule tumorale présente une prolifération importante servie par une forte production protéique et un métabolisme accéléré (Wander et al., 2011; Zoncu et al., 2011). Ceci implique évidemment une forte production de ROS et de leurs effets délétères (Jung et al., 2014; Sabharwal and Schumacker, 2014). Mais le stress oxydatif peut également résulter de l'environnement tumoral pauvre en vaisseaux sanguin, et donc hypoxique et acide (Amend and Pienta, 2015; Parks et al., 2013). Les cellules tumorales présentent également une instabilité génétique due à la prolifération rapide, une inhibition des régulateurs du cycle cellulaire, des mutations et une ploïdie anormale (Reva et al., 2011). Ces facteurs peuvent diminuer la stabilité des protéines et entraîner une accumulation des protéines anormales, ce qui constitue un autre facteur de stress. Afin de survivre, la cellule tumorale surexprime et utilise les moyens de protection contre le stress. Ces mécanismes deviennent indispensables à la survie de la cellule tumorale. Plusieurs études ont décrit l'addiction des cellules tumorales aux mécanismes de résistance au stress cellulaire.

### *Détournement de la HSR dans le cancer*

Afin de protéger son protéome affecté par les mutations, la cellule tumorale détourne la HSR et l'action des chaperonnes. En effet, les protéines chaperonnes sont surexprimées dans de nombreux types de cancers (cancer du poumon, du sein, de la vessie, cancer colorectal, carcinome, leucémie...) et souvent associées à un mauvais pronostic (Castilla et al., 2010; Isomoto et al., 2003; Kanazawa et al., 2003; Oka et al., 2001). Il a par exemple été montré que la chaperonne HSP90 possède parmi ses protéines clientes de nombreux oncogènes, tels que des protéines des voies MAPK et PI3K/AKT (HER-2, C-Raf, B-Raf, AKT...) (Barrott and

Haystead, 2013; Vartholomaiou et al., 2016). En préservant ces oncogènes de la dégradation par le protéasome, HSP90 favorise la prolifération cellulaire et la résistance aux traitements (Xiao et al., 2018). HSP90 chaperonne également HIF-1 $\alpha$ , bloquant ainsi son interaction avec RACK1 (Receptor for activated C kinase 1). De ce fait, HSP90 empêche l'ubiquitination de HIF-1 $\alpha$  et induit sa stabilisation (Jego et al., 2013; Liu et al., 2007). Gong et al. ont récemment montré que l'inactivation du gène codant pour HSP70 ralentit l'initiation tumorale et inhibe le développement de métastases dans un modèle murin de tumeur mammaire spontanée (Gong et al., 2015). De plus, HSP27 promeut l'angiogénèse et la migration cellulaire via l'augmentation du VEGF et de son récepteur de type II (Chatterjee and Burns, 2017; Thuringer et al., 2013).

Les nombreux effets décrits des chaperonnes dans les cancers ont encouragé le développement d'inhibiteurs. C'est le cas par exemple de la Myrtucommulone (MC), une molécule extraite de *Myrtus communis* qui inhibe la capacité des cellules leucémiques à produire de l'ATP et induit leur apoptose. La molécule MC, inhibe l'activité chaperonne de HSP60 (Tretiakova et al., 2008; Wiechmann et al., 2017). Le MKT-077 est un inhibiteur de l'activité des membres de la famille HSP70 et il a montré des effets cytotoxiques sur des lignées de cancer du sein, de colon, du pancréas ou de la vessie (Koya et al., 1996; Li et al., 2013). Malheureusement, il présente des effets néphrotoxiques en clinique (Britten et al., 2000). Le cmHsp70.1, un anticorps monoclonal ciblant HSP70, est actuellement testé en essai clinique de phase II en combinaison avec la radiochimiothérapie, dans le cancer du poumon (identifiant : NCT02118415). HSP90 est la chaperonne la plus étudiée (Khurana and Bhattacharyya, 2015). Le premier inhibiteur chimique de HSP90 est la geldanamycine dérivé de *Streptomyces hygroscopicus*, qui inhibe la fonction chaperonne de HSP90 en ciblant sa poche d'ATP. Il a montré des effets antiprolifératifs *in vitro*. Un essai clinique de phase I a cependant mis en lumière la toxicité hépatique de cette molécule (Patel et al., 2011; Supko et al., 1995). Il a néanmoins ouvert la voie au développement d'autres inhibiteurs tels que le 17-AAG et le 17-DMAG, des dérivés de la geldanamycine qui, malgré des effets antitumoraux, ont échoué en clinique pour des raisons de toxicité (Chatterjee and Burns, 2017). D'autres inhibiteurs prometteurs de HSP90, tels que AT13387 dérivé de l'inhibiteur naturel Radicol, XL888 ou TAS-116 sont actuellement en essais cliniques dans plusieurs types de cancers dont le cancer du sein, le cancer du poumon, le cancer colorectal, le cancer

du pancréas... (NCT01712217, NCT03095781, NCT02965885). Les inhibiteurs de HSF1, régulateur de la HSR, existent également et seront discutés plus tard dans ce manuscrit.

### *L'UPR dans le cancer*

La production anarchique de protéines dans les cellules tumorales peut être à l'origine d'un stress de réticulum, tout comme la surexpression d'oncogènes et l'instabilité génomique. Les chaperonnes du RE (GRP78/Bip et GRP94 par exemple), mais aussi ATF6 ou XBP1 (X-box binding protein 1) qui font partie du système IRE1 $\alpha$ , ont été décrites comme étant surexprimées dans plusieurs types de cancers (cancer du poumon, du sein, du colon, de la prostate ou cancer du foie) (Fernandez et al., 2000; Moenner et al., 2007; Shuda et al., 2003). Les patients atteints d'un cancer de la prostate présentant une forte expression de BiP ont par exemple deux fois plus de chance de subir une récurrence de leur cancer après traitement, ou de décéder, comparativement à ceux présentant une faible expression de la chaperonne (Daneshmand et al., 2007). Cela est notamment dû à l'implication de BiP dans la chimiorésistance (Virrey et al., 2008). La chaperonne GRP170/GRP78 est responsable de la sécrétion de VEGF. Dans le glioblastome, GRP170 permet la néovascularisation, la résistance aux conditions hypoxiques, et son inhibition par ARN interférence entraîne l'accumulation de VEGF dans le lumen (Ozawa et al., 2001). Le VEGF est également une cible directe de ATF4, effecteur de PERK dans l'UPR (Wang et al., 2012). Le potentiel thérapeutique du ciblage de l'UPR dans le cancer est exploité avec des molécules telles que le sorafénib, un inhibiteur de kinases, qui induit l'apoptose via un stress de réticulum et la diminution de l'expression de BiP. Le sorafénib est actuellement en essai clinique de phase II dans le cancer de la thyroïde (NCT02084732) (Rahmani et al., 2007). Plusieurs molécules spécifiques d'IRE1 $\alpha$ , ou PERK (KIRA6, GSK2606414, ISRIB) ont été testées dans les maladies neurodégénératives, métaboliques ou oculaires médiées par le stress du RE avec des résultats prometteurs. KIRA6 améliore par exemple la viabilité des photorécepteurs dans un modèle rongeur de dégénérescence rétinienne liée au stress du RE. Il diminue également l'hyperglycémie dans un modèle de souris diabétique (Atkins et al., 2013; Ghosh et al., 2014; Oakes, 2017). Dans le cancer, KIRA6 réduit la prolifération cellulaire *in vitro* dans la leucémie myéloïde aiguë.

### *La voie NRF2 permet le développement tumoral*

La prolifération importante des cellules tumorales est génératrice d'une forte quantité de ROS à cause notamment de mitochondries anormales et d'un dérèglement de la chaîne de transport des électrons. Les effets de ces ROS dans le cancer sont doubles : ils peuvent induire la prolifération cellulaire via la régulation des voies MAPK, PI3K-AKT et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Les mutations ROS induites peuvent également mener à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53 (Moloney and Cotter, 2017). Un niveau trop important de ROS peut cependant avoir des effets néfastes pour la biologie de la cellule tumorale et mener à la mort cellulaire. L'équilibre est maintenu par la sur-utilisation des mécanismes de défense qui mène à une addiction. Ainsi, des mutations gains de fonction de NRF2 ou perte de fonction de son inhibiteur Keap1 ont été décrites dans plusieurs types de cancers (sein, poumon, foie, œsophage...) (Fujimoto et al., 2016; Guichard et al., 2012; Kim et al., 2010; Nioi and Nguyen, 2007; Zavattari et al., 2015). Elles aboutissent à une activation de NRF2, menant à une augmentation des métastases et à la diminution de la survie chez les patients (Chen et al., 2016; Ji et al., 2013; Zhang et al., 2015, 2010). Dans le cancer du poumon par exemple, des mutations de Keap1 diminuant sa capacité à interagir avec NRF2 ont été décrites dans plusieurs lignées cellulaires et chez les patients (Ohta et al., 2008; Padmanabhan et al., 2006; Singh et al., 2006; Solis et al., 2010). Ces mutations sont facteurs de mauvais pronostic (Takahashi et al., 2010). Des mutations ont également été décrites dans le gène NRF2, au niveau de son domaine Neh2 de liaison à Keap1 (Shibata et al., 2008).

D'autres voies d'activation de NRF2 ont été décrites, telle que la surexpression de protéines interagissant avec Keap1 (la protéine p62 de l'autophagie par exemple), ou la surepression de protéines interagissant avec NRF2 (exemple du régulateur du cycle cellulaire p21)(Chen et al., 2009; Komatsu et al., 2010). Ces interactions se font aux dépens de l'interaction Keap1-NRF2. Dans le cancer, l'activation de NRF2 promeut la survie et la prolifération des cellules tumorales (Zhang et al., 2016). Elle induit également la néovascularisation via l'augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et la sécrétion de VEGF (Ji et al., 2014; Kim et al., 2011). NRF2 favoriserait également la migration et l'invasion, donc les phénomènes métastatiques, dans le cancer du sein ou du pancréas, via STAT3 (signal transducer and activator of transcription) et la GTPase Rho A (Y. S. Wu et al., 2017; Zhang et al., 2016).

Des inhibiteurs de NRF2 ont été développés afin de cibler l'addiction des cellules tumorales à ce facteur de transcription. Le Brusatol a été extrait de *Brucea javanica*. Il inhibe l'expression de NRF2 et diminue la viabilité et la croissance tumorale dans le cancer colorectal ou le cancer du pancréas (Hall et al., 1982; Lee et al., 1982; Liou et al., 1982; Ren et al., 2011; Xiang et al., 2017). Cependant sa spécificité est remise en doute (Vartanian et al., 2016). Il serait en effet inhibiteur de la traduction globale, tout comme l'halofuginone, une autre molécule inhibitrice de l'expression de NRF2 (Tsuchida et al., 2017). Ces molécules auraient ainsi des effets plus prononcés sur les protéines ayant une faible demi-vie telle que NRF2 (Taguchi and Yamamoto, 2017). Le ML385 serait spécifique de NRF2. Associée à la carboplatine, il induit une cytotoxicité des cellules présentant une addiction à NRF2, *in vitro* et *in vivo*, dans le cancer du poumon (Taguchi and Yamamoto, 2017).

### *HIF-1 dans le cancer*

L'hypoxie est l'une des caractéristiques majeure de l'environnement tumoral et est associée à la chimiorésistance et la surexpression d'oncogènes (Toth and Warfel, 2017; Zhou et al., 2006). Elle induit la production des facteurs de croissance IGF et EGF, qui inhibent l'apoptose (Popper, 2016). L'hypoxie est responsable de l'activation de HIF-1 observée dans les cancers (Balamurugan, 2016). Cette activation favorise l'effet Warburg, via l'activation de l'expression des transporteurs de glucose (GLUT) et d'enzymes telles que les hexokinases (Marín-Hernández et al., 2009). L'activation de HIF-1 est aussi responsable de la néo-angiogénèse via l'augmentation de l'expression du VEGF, cible directe de HIF-1 (Liu et al., 1995). HIF-1 favorise également la survie et la croissance tumorale en régulant directement le facteur de transcription FoxM1 (Forkhead box M1)(Xia et al., 2009). Enfin, HIF-1 induit la résistance aux drogues, notamment via l'augmentation de l'expression de transporteurs à efflux dont MDR1 (multidrug resistance 1) ou MRP2 (multidrug resistance-associated protein) (Comerford et al., 2002).

Plusieurs molécules sont capables d'inhiber le facteur de transcription HIF-1. PX-478 par exemple est un inhibiteur transcriptionnel de HIF-1 qui sensibilise les cellules à la radiothérapie dans le cancer de la prostate. Un essai clinique de phase I est actuellement en cours chez des patients atteints de lymphome ou de tumeurs solides avancées (Palayoor et



al., 2008) (NCT00522652). Le 2-méthoxyestradiol (2ME2) est un inhibiteur de la synthèse protéique de HIF-1 $\alpha$  présentant des effets anti-angiogéniques. Dans un essai clinique de phase II dans le myélome multiple, il s'est montré peu toxique mais a échoué à atteindre l'objectif de réduction de 50% de l'expression de l'immunoglobuline monoclonale dans le sérum (Rajkumar et al., 2007). D'autres inhibiteurs empêchent la dimérisation du facteur de transcription HIF-1. C'est le cas du peptide cyclo-CLLFVY qui empêche la dimérisation de HIF-1 en se fixant à HIF-1 $\alpha$ , et réduit la réponse à l'hypoxie (Miranda et al., 2013). Les inhibiteurs de HSP90, protéine chaperonne de HIF-1 $\alpha$ , induisent également la dégradation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  (Liu et al., 2007, p. 1; Yu et al., 2017).

## Objectifs de la thèse

Le ciblage des mécanismes de résistance au stress est une approche thérapeutique intéressante. De nombreuses preuves de son efficacité ont été citées dans les paragraphes précédents. Cette efficacité est due à un phénomène d'addiction des cellules tumorales aux protéines du stress cellulaire (Kitamura et al., 2017; Kitamura and Motohashi, 2018; Nagel et al., 2016). Ainsi, les cellules tumorales surexpriment des protéines de stress et les détournent de leurs fonctions physiologiques dans le but de servir la croissance tumorale. La conséquence est que les cellules tumorales sont dépendantes de ces protéines qui, bien que non oncogéniques, deviennent indispensables à leur survie.

Le but de ma thèse est d'évaluer l'intérêt du ciblage de la réponse au stress cellulaire dans l'OS, en utilisant notamment des modèles cellulaires et animaux. Deux études différentes sont décrites ici, avec comme point commun le ciblage l'addiction des cellules d'OS à des protéines intervenant dans le stress cellulaire. En l'occurrence, la partie I est une étude s'intéressant au rôle de HSF1 dans l'OS. Dans cette partie, nous tenterons d'évaluer les effets de l'inhibition de HSF1 par ARN interférence, *in vitro* et *in vivo* grâce à un modèle animal. Nous userons également de méthodes haut débit afin d'identifier les cibles transcriptionnelles de HSF1 ainsi que ses partenaires protéiques pouvant moduler ses fonctions biologiques. La partie II étudie l'inhibition de de l'hydrolase MTH1 dans l'OS. Dans cette partie, nous utiliserons deux inhibiteurs chimiques de l'activité enzymatique de

MTH1 afin de déterminer l'intérêt de son ciblage thérapeutique dans l'OS, *in vitro* et *in vivo*. L'objectif de cette thèse est d'envisager des alternatives thérapeutiques efficaces et moins toxiques aux traitements actuels, basées sur le ciblage thérapeutique de la réponse au stress.

# INTRODUCTION PARTIE I : Implication de HSF1 dans le développement de l'Ostéosarcome

## La protection cellulaire contre le stress : la HeatShockResponse

La réponse au stress est médiée par les chaperonnes (Heatshockproteins ; HSP) et régulée par le facteur de transcription HSF1 (Åkerfelt et al., 2010). HSF1 régule l'expression des protéines chaperonnes inductibles par un choc thermique (HSPs). Son inactivation dans des fibroblastes embryonnaires ou dans des cellules de moelle osseuse de souris abolit l'induction des chaperonnes par le stress thermique et réduit la thermoresistance (Åkerfelt et al., 2010). De même, les souris HSF1<sup>-/-</sup> ne présentent pas de HSR (Xiao et al., 1999). Ces études prouvent que HSF1 est essentiel à la HSR (Fujimoto et al., 2010, p. 3, 2004; McMillan et al., 2002).

## La structure du facteur de transcription HSF1

HSF1 présente une grande homologie entre les espèces. Il s'agit d'une protéine de 57kDa constituée de 4 domaines fonctionnels (Peteranderl and Nelson, 1992; Rabindran et al., 1993; Westwood and Wu, 1993).

HSF1 possède un domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA Binding Domain) en Hélice-coude-Hélice en N-terminal et un domaine d'oligomérisation car HSF1 lie l'ADN en trimère. La trimérisation est permise par l'interaction en superhélice des domaines d'oligomérisation. La trimérisation de HSF1 est nécessaire pour obtenir une liaison forte à l'ADN. Le domaine de régulation de HSF1 est le site de modifications post-traductionnelles telles que des

phosphorylations, acétylations, sumoylations, qui vont activer ou réprimer son activité transcriptionnelle. Enfin, HSF1 possède en C-terminal un domaine de transactivation. Celui-ci contrôle l'activation de HSF1 et le dirige vers différentes cibles (Anckar and Sistonen, 2011; Eastmond and Nelson, 2006; Sharma and Seo, 2018) (Figure 17).



Figure 17 : Structure de HSF1. (heat-shock element. DBD : DNA-binding domain, HR : Heptad repeats, TAD : Transactivation domain, RegD : Regulatory domain. Modifié de (Neudegger et al., 2016).

### L'Induction de HSF1 par le stress

En condition normale, HSF1 est un monomère piégé dans un complexe cytoplasmique avec notamment les protéines de la famille des HSP70 et 90. Certains stimuli (dont le stress thermique) induisent une libération de HSF1. Ce dernier est trimérisé, activé et transloqué dans le noyau où il se lie à l'ADN. HSF1 induit la transcription de gènes cibles en recrutant les composants de la machinerie transcriptionnelle (Dai and Sampson, 2016; Sharma and Seo, 2018) (Figure 18). La fixation de HSF1 à l'ADN se fait sur une séquence consensus appelée heat shock element (HSE) (Figure 19). Ces séquences très conservées au cours de l'évolution sont composées de motifs nGAAn inversés et répétés (Amin et al., 1988; Pelham, 1982; Sorger and Pelham, 1988). Chaque domaine de liaison à l'ADN reconnaît une séquence nGAAn (Gonsalves et al., 2011; Perisic et al., 1989; Xiao et al., 1991) et la force de liaison varie en fonction du nombre et de la séquence du HSE (Perisic et al., 1989; Xiao et al., 1991).

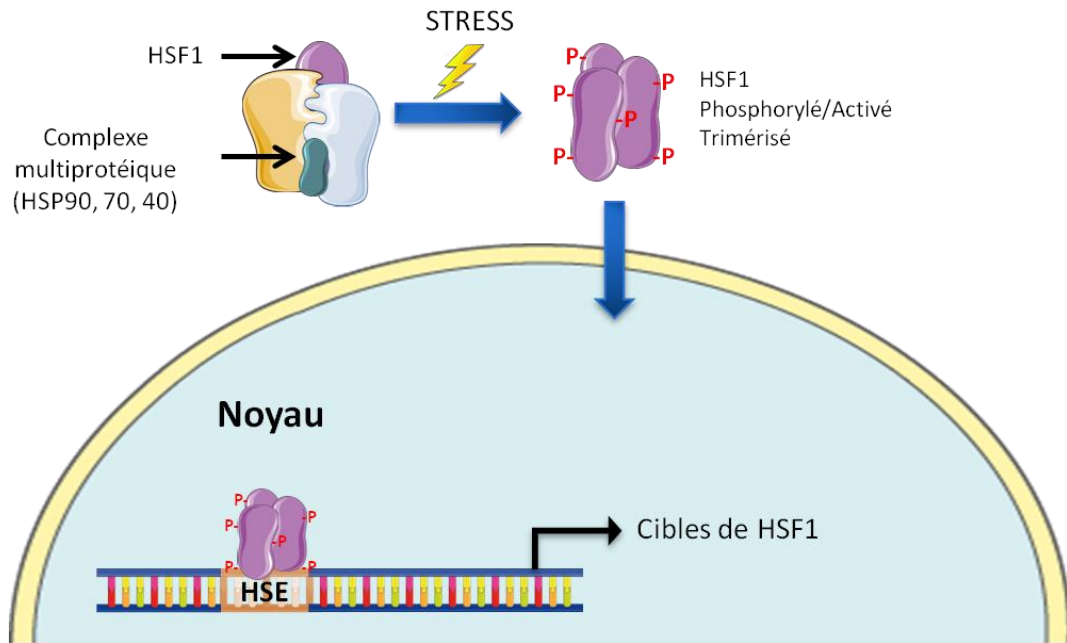


Figure 18 : Régulation de l'activité transcriptionnelle de HSF1 par le complexe multiprotéique. An absence de stress cellulaire, HSF1 est piégé dans un complexe cytoplasmique formé notamment par les protéines de la famille des HSP (heat-shock protein) 40, 70 et 90. Le stress cellulaire entraîne une libération de HSF1, sa trimérisation, sa phosphorylation et sa translocation le noyau. HSF1 se lie à l'ADN sur des séquences HSE (Heat shock element) et induit la transcription de ses gènes cibles.



Figure 19 : Séquence consensus de HSF1 Heat-shock element (HSE) avec pour motif nGAAn. Obtenu de la base de données Hocomoco.

Toutes les cibles de HSF1 ne possèdent pas de HSE dans leur promoteur, et la présence de HSE ne garantit pas la fixation de HSF1. Ceci indiquerait que la fixation de HSF1 à l'ADN ne dépend pas uniquement de la présence d'un site HSE, mais aussi d'autres facteurs tels que l'état de la chromatine (ouverte, fermée) ou l'interaction avec des partenaires protéiques (Elsing et al., 2014; Hahn et al., 2004; Mahat et al., 2016; Mendillo et al., 2012a; Takii et al., 2015, p. 1).

## La régulation de HSF1

HSF1 est régulée via des interactions protéine-protéine et des modifications post-traductionnelles (Anckar and Sistonen, 2011). L'un des modes de régulation de HSF1 est le fait que les HSPs inhibent son activité. Il s'agit donc d'un système d'auto-régulation capable de percevoir les modifications de la protéostasie, et d'ajuster la HSR en conséquence. En effet, HSF1 interagit spontanément avec un complexe contenant les chaperonnes HSP90, HSP70 et HSP40 (Abravaya et al., 1992; Zou et al., 1998). Fixé aux HSPs, HSF1 est incapable de fixer l'ADN. En cas de stress, si la capacité des cellules à assurer le bon repliement des protéines anormales (ou à les détruire) est dépassée, il y a une accumulation de ces dernières dans le cytoplasme. Ceci constitue un signal d'activation des HSPs comme démontré par Ananthan et al. (Ananthan et al., 1986). Il y a alors une compétition entre les protéines mal conformées et HSF1, pour la liaison aux HSP. La liaison HSF1-HSP est rompue, laissant HSF1 libre de former un homo-trimère capable de se fixer à l'ADN. La disparition du mécanisme à l'origine du stress entraîne une diminution des substrats des protéines chaperonnes. Le complexe chaperonnes-HSF1 est donc reformé et l'activation de ce dernier inhibée (Guo et al., 2001). Cette régulation en rétrocontrôle négatif assure que le niveau de HSF1 sera corrélé au niveau de stress.

L'activation de HSF1 n'est pas uniquement dépendante de ce mécanisme de rétrocontrôle. En effet, il a été montré qu'une hyperphosphorylation de HSF1 est indispensable à son activation. La phosphorylation des résidus sérine 230 et 326 (notamment par MEK, mTOR, CAMKII...) activent les capacités transcriptionnelles de HSF1 (Guettouche et al., 2005; Holmberg et al., 2001a, 2001b; J. Li et al., 2017). D'autres phosphorylations au contraire, répriment l'activité de HSF1. Les phosphorylations des sérine 303 (par la glycogènesynthase kinase 3, GSK3) et sérine 307 (par ERK1) sont des marques répressives de l'activation de HSF1 (Chu et al., 1996; Kline and Morimoto, 1997). La phosphorylation de la sérine 121 au niveau du DBD de HSF1, par les sérine/thréonine kinase MAPKAPK2 (mitogen activated protein kinase-activated protein kinase 2) diminue sa capacité à se lier à l'ADN et promeut son interaction avec HSP90 (Wang et al., 2006). La phosphorylation de la sérine 363 est également inhibitrice de l'activité de HSF1 (Chu et al., 1998; Wang et al., 2006, 2003).

D'autres modifications post-traductionnelles définissent la durée et l'intensité de l'activité de HSF1. Ainsi, la phosphorylation de la sérine 303 facilite la sumoylation de la lysine 298, ce qui inhibe les capacités trans-activatrices de HSF1 (Brunet Simioni et al., 2009; Hietakangas et al., 2006). La phosphorylation de la sérine 303 est médiée par HSP27 (Brunet Simioni et al., 2009).

SIRT1 (Sirtuin 1) est une déacétylase de la famille Sirtuin. Il a été montré que SIRT1 est capable de déacétyler les marques K80 et K118 de HSF1, prolongeant ainsi sa fixation sur l'ADN (Raychaudhuri et al., 2014; Westerheide et al., 2009). L'histone acétyltransférase p300 est également essentiel à la stabilisation de la protéine HSF1 (Raychaudhuri et al., 2014). Elle permet l'acétylation de HSF1 monomérique aux sites K208 et K298, ce qui inhibe sa dégradation par le protéasome. Cependant, elle peut également mettre un terme à la fixation de HSF1 à l'ADN. En effet, il a été montré que l'interaction de HSF1 et ATF1 (Activating transcription factor 1) après un stress thermique permet le recrutement de p300/CBP (CREB-binding protein), entraînant l'acétylation de HSF1 et l'interruption de sa liaison avec l'ADN (Takii et al., 2015).

L'activité de HSF1, comme tous les facteurs de transcription, est dépendante de l'accessibilité de l'ADN, et donc de l'état de la chromatine (Shivaswamy and Iyer, 2008; Q. Wu et al., 2017). HSF1 peut recruter le complexe SWI/SNF (Switch/Sucrose non-fermentable) de remodelage de la chromatine lors d'un stress cellulaire. Cela se fait notamment grâce à l'interaction de HSF1 avec ATF1, qui recrute la sous-unité BRG1 du complexe SWI-SNF (Takii et al., 2015). Il a également été montré que HSF1 peut interagir avec STAT-1 en réponse à une stimulation par l'IFN $\gamma$ , induisant ainsi l'expression de HSP70 et 90 (Stephanou et al., 1999; Stephanou and Latchman, 2011). Cette induction étant STAT-1 dépendante, il est probable que STAT-1 soit responsable de l'activation de HSF1 dans ce contexte. HSF1 interagit également avec la protéine DAXX impliquée dans l'apoptose. Cette interaction est permise par la phosphorylation de la sérine 326 de HSF1, et elle empêche l'interaction de HSF1 avec le complexe multichaperonique répresseur par un phénomène de compétition (Boellmann et al., 2004).

Les autres membres de la famille HSF peuvent également réguler l'expression et l'activité de HSF1. Il a été montré que HSF1 et HSF2 peuvent former des hétérotrimères, contenant 2

protéines HSF1 et une protéine HSF2. Cette interaction est renforcée par un stress thermique (Alastalo et al., 2003; He et al., 2003; Korfanty et al., 2014; Loison et al., 2006; Sandqvist et al., 2009). Le trimère HSF1/HSF2 peut se lier à des séquences HSE régulant les chaperonnes et d'autres gènes induits par le stress (He et al., 2003; Loison et al., 2006; Sandqvist et al., 2009; Vihervaara et al., 2017). De plus la surexpression de HSF2 augmente la HSR, mais uniquement en présence de HSF1 (He et al., 2003; Ostling et al., 2007). Ceci indique que HSF2 augmente l'activité de HSF1 en cas de stress. Cependant, HSF2 peut également inhiber l'activité de HSF1, notamment au cours de la mitose. Elsing et al. ont démontré que HSF2 inhibe la transcription de HSP70 par HSF1 pendant la mitose. Cette inhibition est due à la phosphorylation de la serine 10 de l'histone 3 qui ferme ainsi la chromatine au niveau du promoteur de HSP70 (Elsing et al., 2014).

HSF1 et HSF4 peuvent interagir dans le cristallin. Plus précisément la région N-terminale de HSF1 interagit avec le domaine DBD de HSF4. Cette interaction entraîne la dégradation de HSF1 par le protéasome et donc la réduction de son expression protéique de HSF1 (Cui et al., 2015).

Modifications répressives		Modifications activatrices	
Modification	Résidu	Modification	Résidu
Acétylation	K80	Phosphorylation	T142
Acétylation	K118	Phosphorylation	S195
Phosphorylation	S121	Acétylation	K208
Sumoylation	K293	Phosphorylation	S230
Phosphorylation	S303	Acétylation	K298
Phosphorylation	S307	Sumoylation	S320
Phosphorylation	S363	Phosphorylation	S326
		Sumoylation	S333
		Phosphorylation	S419

Tableau V : Modifications post-traductionnelles de HSF1. Modifié de (Sharma and Seo, 2018).



## *Au-delà de la HSR : les autres rôles de HSF1*

Jusqu'au début de ce siècle, le rôle de HSF1 était considéré comme étant limité à la HSR. De nos jours, plusieurs études ont montré que suite à un HS, de nombreux gènes sont augmentés et diminués indépendamment de HSF1, mais aussi que HSF1 régule des gènes non impliqués dans la HSR (cycle cellulaire, apoptose, vieillissement, résistance aux traitements, immunité) (Jian Li et al., 2016; Mahat et al., 2016; Trinklein et al., 2003). HSF1 est par exemple impliqué dans la réponse au stress oxydatif : il a été montré que le stress oxydatif causé par de l'eau oxygénée est capable d'induire la trimérisation de HSF1 (Ahn and Thiele, 2003). Les résidus Cys35 et 105 du DBD de HSF1 sont des senseurs de l'état d'oxydo-réduction de la cellule. Leur remplacement par des sérines n'entraîne pas d'homotrimérisation de HSF1 après un stress oxydatif (Ahn and Thiele, 2003).

De plus, NRF2 (régulateur majeur de la réponse au stress oxydatif) partage des cibles avec HSF1 (telles que HMOX1 (heme oxygenase 1), SQSTM1 (Sequestosome 1), p62, Atf3, HSP70, HSP25/27) (Inouye et al., 2018; Jain et al., 2010; Samarasinghe et al., 2014). NRF2 active également l'expression de HSF1 en cas de stress oxydatif (Paul et al., 2018b). Enfin, certaines HSPs telles que HSP25 ou HSPB5 sont connues pour participer au maintien de l'état redox des cellules, réduisant ainsi les dommages causés par le stress oxydatif (Barna et al., 2018a). HSF1 participe également à l'UPR. En effet, il a été montré que l'activation constitutive de HSF1 augmente la tolérance au stress du RE (Liu and Chang, 2008b; Weindling and Bar-Nun, 2015).

HSF1 a aussi été décrit comme étant impliqué dans l'UPS (Ubiquitin proteasome system). Le système UPS participe à la dégradation des protéines anormales ou non (notamment dans le cadre du contrôle de leur activité). L'inhibition de ce système entraîne une surexpression de HSF1 et HSF2. HSF1 et HSF2 sont également capables de se lier et de réguler les gènes Ubb et Ubc codant pour l'ubiquitine. Il est probable que HSF1 active la régulation des gènes impliqués dans l'UPS en cas de stress protéotoxique (Pirkkala et al., 2000; Song et al., 2010; Vihervaara et al., 2013).

Il a été décrit qu'un stress thermique peut induire l'autophagie. Ce mécanisme consiste en la dégradation d'une partie du cytoplasme et d'organelles, par le lysosome. Il permet la dégradation des protéines et organismes vieillissant, mais aussi l'adaptation et la survie. Le

rôle de HSF1 vis-à-vis de l'autophagie est sujet à débat car des résultats d'études se contredisent et lui attribuent à la fois la fonction d'activateur et d'inhibiteur de ce processus. Ainsi, l'activation constitutive de HSF1 par exemple inhiberait l'autophagie induite par la rapamycine, inhibiteur de mTOR, ainsi que l'autophagie basale. Cependant, il a été montré qu'en réponse à un traitement par un inhibiteur de la réplication (la carboplatine), HSF1 active l'expression d'ATG7, initiateur de l'autophagie, en se fixant directement à son promoteur. Ceci a pour effet d'augmenter l'autophagie (Dayalan Naidu et al., 2017; Desai et al., 2013, p. 7).

Des études indiquent que HSF1 est impliqué dans le développement et la différenciation des gamètes. Le génotype HSF1<sup>-/-</sup> est par exemple létal chez la mouche et la levure mais contre-balançé par l'expression constitutive de HSP70 et HSP90 (Solís et al., 2016). Chez la souris, un KO (Knock-out) HSF1 est létal pour une partie des embryons et induit un retard de croissance post-natal. Chez ces souris, de nombreuses fonctions sont impactées : la thermotolérance, la régulation de la température, l'immunité, la mémoire, les activités motrices et la perception sensorielle entre autres (Widlak and Vydra, 2017). Malgré ces défauts, les souris HSF1<sup>-/-</sup> peuvent survivre dans des conditions normales. Les souris mâles HSF1<sup>-/-</sup> ont cependant une production de spermatozoïdes inférieure à la moyenne. De plus, leurs spermatozoïdes présentent une morphologie anormale. Les souris femelles HSF1 KO sont complètement stériles (Abane and Mezger, 2010). Le KO HSF1 entraîne un arrêt de la méiose des ovocytes en phase I ou II (Metchat et al., 2009). De plus, le complexe synaptonemal et la réparation de l'ADN sont compromis dans les ovocytes mutants HSF1<sup>-/-</sup> (Barna et al., 2018b).

HSF1 est impliqué dans la différenciation d'autres types cellulaires. Il a été montré que la différenciation des cellules souches de moelle osseuse en cardiomyocytes est inhibée par un shARN spécifique de HSF1 (Dai et al., 2018). HSF1 intervient également dans la différenciation des monocytes en macrophages, via l'activation de la transcription de PU.1/Spl1, mais aussi via la régulation de HSP70 qui chaperonne SPI1 et empêche sa dégradation par le protéasome (Jego et al., 2014). Il de plus été montré que HSF1 régule positivement et directement l'expression du facteur de transcription MITF impliqué dans l'ostéoclastogénèse. En corrélation avec cette observation, l'inhibition de HSF1 par ARN interférence réduit l'ostéoclastogénèse (Chai et al., 2014).

## Implication de HSF1 dans les cancers

HSF1 est impliqué dans les cancers. Il n'est pas un oncogène *per se*, mais plutôt un facilitateur dont la fonction est détournée et amplifiée pour servir la cellule tumorale. Aucune mutation du gène codant pour HSF1 n'a été identifiée dans les cancers, et sa surexpression n'entraîne pas de transformation de la cellule (De Thonel et al., 2011b). Ainsi, la fonction de HSF1 est détournée dans la cellule tumorale et régulée de manière aberrante par des voies oncogéniques telles que la voie RAS/MAPK par exemple. Cette voie est très importante dans les cellules tumorales et mutée dans environ 30% des cancers (Fernández-Medarde and Santos, 2011; Naidu and Dinkova-Kostova, 2017). MEK, ERK, et p38 de la voie MAPK activent HSF1 par la phosphorylation de la sérine 326. Il a été montré que les souris HSF1<sup>-/-</sup> traitées avec les agents cancérigènes induisant une mutation de RAS (diméthylbenzanthracène (DMBA) et 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA)) ont une incidence de tumeur inférieure aux souris HSF1<sup>+/+</sup> (Dai et al., 2007). De plus, l'apparition des tumeurs est plus tardive et la survie est plus importante chez ces souris HSF1<sup>-/-</sup> que chez les souris HSF1<sup>+/+</sup> (Dai et al., 2007). Dai et al. ont également montré que des souris présentant une mutation de p53 développent moins de tumeurs (sarcomes, lymphomes et carcinomes) quand elles sont de génotype HSF1<sup>-/-</sup> comparativement aux génotypes HSF1<sup>+/-</sup> ou HSF1<sup>+/+</sup>. Ceci montre l'importance de HSF1 dans l'initiation tumorale médiée par l'activation de RAS et la mutation de p53. De manière surprenante, l'extinction d'un seul allèle HSF1 réduit l'incidence des sarcomes mais pas d'autres cancers, dans un contexte de mutation p53 (Dai et al., 2007).

L'implication de HSF1 dans les cancers est notamment due à son rôle de régulateur de la HSR. En effet, HSF1 est indirectement impliqué dans les cancers via les chaperonnes, en permettant aux cellules tumorales de résister au stress oncogénique (J. Li et al., 2017). Comme mentionné précédemment, les protéines chaperonnes sont surexprimées dans les cancers et associés à un mauvais pronostic (Castilla et al., 2010; Isomoto et al., 2003; Kanazawa et al., 2003; Oka et al., 2001). Ils chaperonnent des oncogènes dont des protéines des voies MAPK et PI3K/AKT (Barrott and Haystead, 2013; Vartholomaiou et al., 2016) et empêchent leur dégradation par le protéasome (Jego et al., 2013; Liu et al., 2007; Xiao et al., 2018). De nombreuses études montrent cependant que l'implication de HSF1 dans les

cancers peut aussi être directe. En effet, HSF1 est surexprimé dans plusieurs types de cancers (sein, prostate, myélome...) comparé aux cellules saines (Fok et al., 2018; Jiang et al., 2015; Tang et al., 2005), mais son expression ne corrèle pas toujours avec celles des HSPs (Tang et al., 2005). De plus, l'inhibition de HSF1 ne diminue pas l'expression des HSPs dans certains types de cancers (Tang et al., 2005). Cela indique que la surexpression de HSF1 ne conduit pas à une HSR classique, mais que d'autres cibles sont régulées par HSF1 et responsables des phénotypes observés (Kurahashi et al., 2007; Meng et al., 2010). Mendillo et al. ont montré que HSF1 régule des gènes dans les cellules tumorales malignes, qui sont différents de ceux régulés dans les cellules non tumorales, même après un stress. Ces cibles de HSF1 interviennent dans des fonctions biologiques variées telles que la prolifération, la survie, la synthèse protéique, le métabolisme du glucose... des fonctions soutenant la malignité (Mendillo et al., 2012a). Cette implication de HSF1 dans les cancers est confirmée par diverses expériences d'inhibition de HSF1. Ainsi, en utilisant des méthodes d'ARN interférence, il a été montré que l'inhibition de HSF1 diminue la migration, l'invasion des cellules d'OS et leurs capacités prolifératives, ce qui entraîne *in vivo*, la réduction de la croissance tumorale (Z. Zhou et al., 2017).

Les effets de l'inhibition HSF1 dans les cancers ont été confirmés dans d'autres études. Dans le myélome, l'inhibition de HSF1 par shARN induit la mort cellulaire par apoptose (Fok et al., 2018). Un ARN aptamer inhibant la fixation de HSF1 à son HSE induit l'apoptose dans les cellules de la lignée HeLa de cancer du col de l'utérus (Salamanca et al., 2014).

HSF1 est également impliqué dans la résistance aux traitements, notamment via l'augmentation de l'activité de l'ATP binding cassette ABCB1 (MDR1). Ceci entraîne un efflux des agents de chimiothérapie doxorubicine et paclitaxel, et donc une résistance à ces molécules. (Tchénio et al., 2006; Vilaboa et al., 2000; Vydra et al., 2013)

### [Les inhibiteurs de HSF1](#)

De nombreuses études attestent de l'intérêt de l'inhibition de HSF1 dans les cancers et décrivent des effets anti-tumoraux (Dai et al., 2007; Fok et al., 2018, 2018; Fujimoto et al., 2017; Jiang et al., 2015; Mendillo et al., 2012a; Scherz-Shouval et al., 2014; Whitesell and

Lindquist, 2009b; Z. Zhou et al., 2017). La médication de HSF1 est relativement complexe. Cela est notamment dû au fait que les voies de signalisation impliquées dans l'activation de HSF1 et la durée de cette activation varient en fonction de l'intensité du stress (Whitesell and Lindquist, 2009b). Toutefois, de nombreuses molécules chimiques ou naturelles ont montré une inhibition de l'activité de HSF1 avec des modes d'action différents (Sharma and Seo, 2018) (Tableau VI).

### *Les inhibiteurs de l'activation et de la fixation de HSF1 à l'ADN*

La quercétine est l'un des premiers inhibiteurs de HSF1 découvert. Il est naturel et appartient à la famille des flavones. Il inhibe la fixation de HSF1 au HSE sans affecter sa trimérisation (Nagai et al., 1995). Cette molécule diminue ainsi l'expression des HSPs, et sensibilise les cellules de neuroblastome et de sarcome d'Ewing à la doxorubicine (Zanini et al., 2007). La quercétine est connue pour être un inhibiteur de kinases dont JNK et p38 (Hosokawa et al., 1990; Chengqiu Li et al., 2016; Li et al., 2019). Elle pourrait ainsi inhiber la phosphorylation de HSF1 et n'est donc pas spécifique de ce dernier (Hosokawa et al., 1990). Il a été montré que la quercétine inhibe la prolifération et les capacités métastatiques des cellules d'OS notamment par la diminution de l'ARNm codant pour la PTHR1 (parathyroid hormone receptor 1) (Li et al., 2019). En 2016, une étude a identifié par screening trois molécules (PW3405, CB14649, CB01587) inhibant également la phosphorylation de HSF1. Ces inhibiteurs ont une efficacité de l'ordre du nanomolaire. L'efficacité de ces molécules est réduite dans les cellules exprimant stablement un shARN ciblant HSF1, ce qui indiquerait une certaine spécificité des molécules (Zhang and Zhang, 2016). Le KNK437 et le Rohinitib ont été décrites dans des études datant de 2000 et 2013 respectivement (Santagata et al., 2013; Yokota et al., 2000). Ces deux molécules se sont montrées capables d'inhiber la liaison de HSF1 à l'ADN.

### *Les molécules inhibant le recrutement de partenaires protéiques*

Le KRIBB11 (N2 - (1H - indazole - 5 - yl) - N6 - methyl - 3 - nitropyridine - 2,6 - diamine) est un inhibiteur de HSF1 identifié par screening (Yoon et al., 2011, p. 11). KRIBB11 empêche le recrutement de p-TEFb (positive transcription elongation factor b) par HSF1, bloquant

ainsi le processus d'élongation par l'ARN polymérase II. Dans le myélome, KRIBB11 induit la mort cellulaire et réduit la croissance tumorale dans un modèle murin (Fok et al., 2018). L'inhibiteur I<sub>HSF</sub>115, découvert par Vilaboa et al. est également capable d'empêcher l'interaction de HSF1 avec un de ses partenaires, le facteur de transcription ATF1 (Vilaboa et al., 2017). De ce fait, cette molécule bloque le remodelage de la chromatine induit par HSF1. Les effets de I<sub>HSF</sub>115 ont été évalués sur la viabilité de 33 lignées cancéreuses, provenant de 12 cancers différents incluant des lignées d'OS, de sarcome d'Ewing, de myélome multiple, de leucémie, de cancer du sein, de la prostate, du poumon, du col de l'utérus, de l'ovaire, le neuroblastome... Près de 88% des cellules tumorales présentaient une concentration inhibitrice médiane (IC50) comprise entre 1,7 et 10µM (Vilaboa et al., 2017). De manière intéressante, I<sub>HSF</sub>115 ne diminue pas la viabilité des cellules WI-38 (poumon fœtal) non cancéreuses en dessous de 80%, même à 25µM. Pourtant, cette dose réduit de plus de 80% la viabilité de 28 des 33 lignées tumorales testées. Le triptolide (de *Tripterqium wilfordii*), l'un des inhibiteurs de HSF1 les plus efficaces, pourrait également faire partie de la catégorie des inhibiteurs de HSF1 empêchant le recrutement de partenaires protéiques. En effet, il inhibe la transactivation de HSF1 (mais aussi d'AP-1 et NF-κB) par un mécanisme non élucidé (Naidu and Dinkova-Kostova, 2017; Westerheide et al., 2006). Le triptolide a été chimiquement modifié pour obtenir le minnelide, actuellement testé dans deux essais cliniques de phase I : l'un dans la leucémie myéloïde aiguë (NCT03760523) et l'autre dans plusieurs cancers solides (cancer gastrique, cancer colorectal, cancer du sein, du pancréas, de la prostate...) (NCT03129139).

Composé	Classe chimique	Mécanisme d'action
<b>Inhibiteurs naturels</b>		
<b>Quercetin</b>	Flavonoïde	Downrégulation de HSF1 et inhibition de sa phosphorylation
<b>Stresgenin B</b>	Carboxamide	Non identifié
<b>Triplotide</b>	Diterpene Epoxide	Inhibe l'activité transcriptionnelle
<b>Cantharidin</b>	Terpenoïde	Inhibe l'activité transcriptionnelle
<b>Fisetin</b>	Flavonoïde	Inhibe la liaison de HSF1 au promoteur de HSP70
<b>Rocaglamide A</b>	Flavaglines	Diminue la liaison de HSF1 aux promoteurs

<b>2,4-Bis(4-hydroxy benzyl)Phenol</b>	Phénol	Déphosphorylation et dégradation de HSF1
<b>CL-43</b>	Cardenolide	Non identifié
<b>Inhibiteurs chimiques</b>		
<b>KNK437</b>	Lactame	Bloque la transcription médiée par HSF1 et induit l'apoptose
<b>NZ-28</b>	Éméline	Inhibition de la traduction des ARNm des HSP
<b>KRIBB11</b>	Pyridinediamine	Lie HSF1
<b>PW3405</b>	Anthraquinone	Inhibe la phosphorylation de HSF1
<b>I<sub>HSF</sub>115</b>	Thiazole Acrylamide	Lie le domaine de liaison de l'ADN de HSF1 et inhibe l'activité transcriptionnelle
<b>4,6-Disubstituted Pyrimidine</b>	Pyrimidine	Inhibe les modifications post-traductionnelle
<b>CCT251236</b>	Bisamide	En cours d'étude
<b>α-Acyl Carboxamides</b>	<b>amino</b> Aminocarboxamides	Diminution de la stabilité de la protéine HSF1 et de la traduction de l'ARNm HSF1

Tableau VI : Molécules inhibitrices de l'activité de HSF1.

## Objectifs de la partie I

La fonction de HSF1 n'est donc pas limitée au stress. Son implication dans les cancers, y compris l'OS, a été démontrée dans différentes études. Cependant les mécanismes de cette implication restent encore relativement peu compris. La compréhension des mécanismes d'action de HSF1 est pourtant indispensable. Elle permettra la prédiction des effets des inhibiteurs thérapeutiques de HSF1, mais aussi la neutralisation d'éventuels mécanismes de résistance.

Le but de ce projet est d'investiguer l'implication de HSF1 dans le développement et la progression de l'OS. En utilisant des méthodes d'ARN interférence, nous étudierons l'implication de HSF1 dans les processus tumoraux tels que la prolifération, le cycle cellulaire ou la mort des cellules d'OS. Expliquer les effets de l'inhibition de HSF1 passe par l'identification de ses cibles transcriptionnelles. Pour ce faire, des expériences de CHIP-

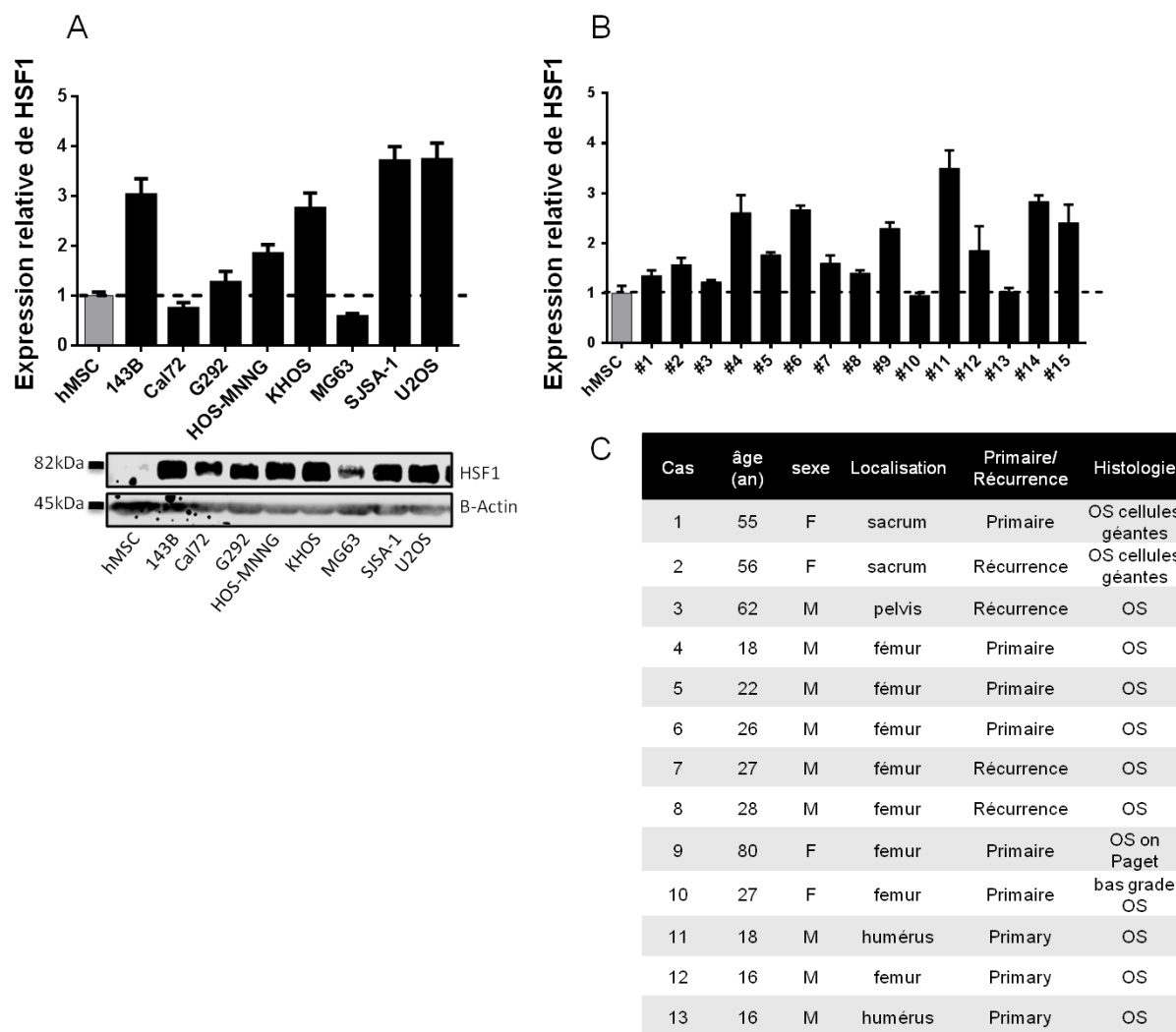
sequencing et de RNA-sequencing ont été réalisées afin d'établir une carte du réseau transcriptionnel de HSF1 dans l'OS. Enfin, compte tenu de l'importance des partenaires protéiques de HSF1 dans la régulation de ses fonctions biologiques, un RIME (Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins) a été réalisé afin de définir les partenaires protéiques de HSF1 dans l'OS et leurs rôles dans l'action pro-tumorale de HSF1.

## RESULTATS PARTIE I

### *HSF1 est activé et surexprimé dans l'OS*

Plusieurs études ont montré la surexpression de HSF1 dans différents cancers (Fok et al., 2018; Jiang et al., 2015; Tang et al., 2005). Son expression a donc été analysée dans 8 lignées d'OS, par qPCR et par WB, et comparée à des cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC) utilisées comme contrôle (Figure 20).





**Figure 20: HSF1 est surexprimé dans dans l'OS. (A) Expression de l'ARNm et de la protéine HSF1 évaluée par qPCR et western blot dans 8 lignées d'OS (143B, Cal72, G292, HOS-MNNG, KHOS, MG63, SJS-1 U2OS) et dans une population de cellules souches mésenchymateuse humaines (hMSC) (N=1, triplicats). (B) Expression de HSF1 évaluée par qPCR dans 15 biopsies provenant de patients atteints d'OS, et dans des cellules hMSC (N=1, triplicats). (C) Caractéristiques cliniques des différents patients.**

L'expression de HSF1 apparaît plus élevée dans les lignées d'OS que dans les hMSC. Les lignées SJS-1, 143B et U2OS sont celles qui présentent la plus forte expression de HSF1. La lignée MG63 exprime faiblement HSF1, bien que l'expression protéique de HSF1 soit plus élevée que dans les hMSC. L'ARNm de HSF1 est également surexprimé dans des biopsies provenant de patients atteints d'OS, comparativement à des hMSC (cellules souches mésenchymateuses humaines) provenant d'individus sains. De plus, par l'analyse de données de la littérature (Ho et al., 2017), nous avons évalué chez 15 patients l'expression de HSF1 dans les tumeurs et dans les tissus sains environnants (Figure 21). L'expression de

HSF1 est significativement plus élevée dans la tumeur que dans le tissu sain autour de la tumeur ( $p < 0,05$ ).

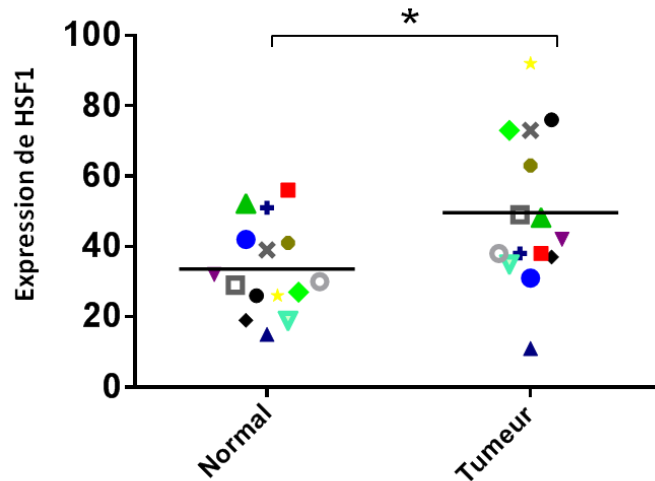


Figure 21 : L'expression transcriptionnelle de HSF1 est plus élevée dans la tumeur que dans le tissu sain environnant. Les résultats proviennent de l'analyse d'un RNA-sequencing de (Ho et al., 2017). L'expression de HSF1 a été quantifiée chez le même patient, dans le tissu tumoral et dans le tissu sain environnant. Chaque couleur/symbole représente un patient. (\* =  $p < 0,05$ ).

HSF1 est donc surexprimé dans l'OS, mais également constitutivement activé. En effet, des expériences d'immunohistochimie ont été réalisées sur des biopsies provenant de patients atteints d'OS (Figure 22). Les résultats montrent que HSF1 et sa forme phosphorylée sur la sérine 326 (pHSF1 S326) sont localisés au niveau nucléaire. Ces résultats ont été confirmés dans des biopsies provenant de modèles murins obtenus par xélogreffe de cellules d'OS humaines (cellules HOS-MNNG).

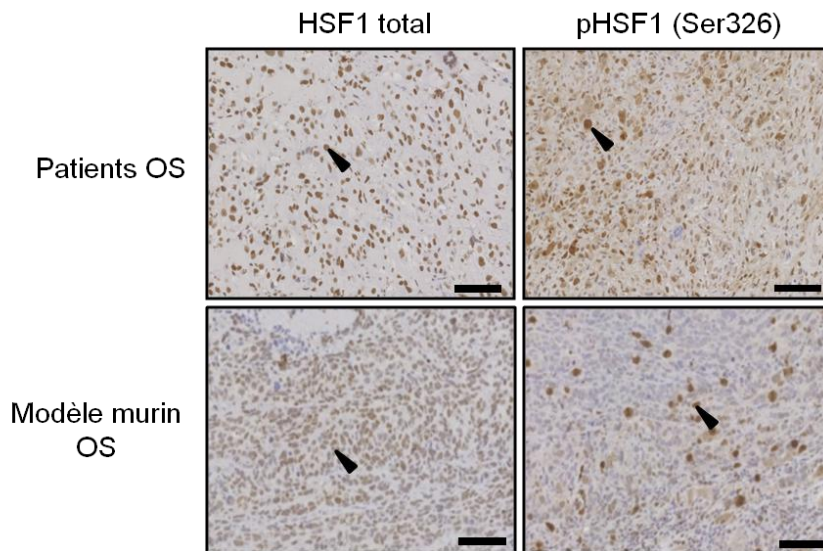


Figure 22 : HSF1 est constitutivement activé dans l'OS. HSF1 total et HSF1 activé, c'est-à-dire phosphorylé sur sa sérine 326 [pHSF1 (Ser326)] ont été marqués par immunohistochimie. Le marquage a été réalisé dans des tumeurs provenant de patients atteints d'OS, ou dans des tumeurs de modèles murins obtenus par xélogreffe de cellules tumorales humaines (lignée HOS-MNNG d'OS). La barre d'échelle correspond à 100µm.

Afin de déterminer la signification de l'activation et de la surexpression de HSF1 sur le pronostic vital des patients, les résultats de Kuijjer et al (Kuijjer et al., 2012) disponibles sur la base de données R2 ont été analysés (Figure 23). Des patients de cette base de données ont été séparés en deux groupes, en fonction de l'expression élevée (40 patients) ou faible (48 patients) de HSF1. Les individus ayant une forte expression de HSF1 présentent une survie sans métastase moins importante que ceux ayant une faible expression de HSF1. Ces résultats significatifs ( $p < 0,05$ ) corréleront donc l'expression de HSF1 avec l'apparition de métastases.

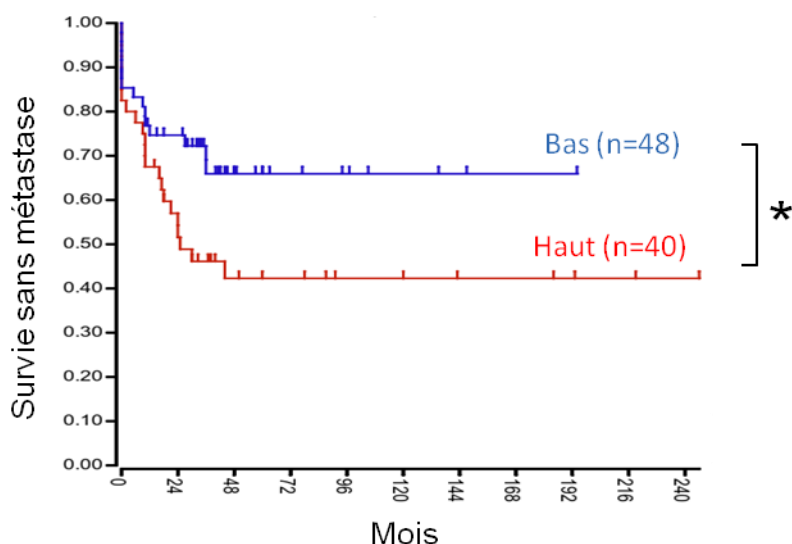
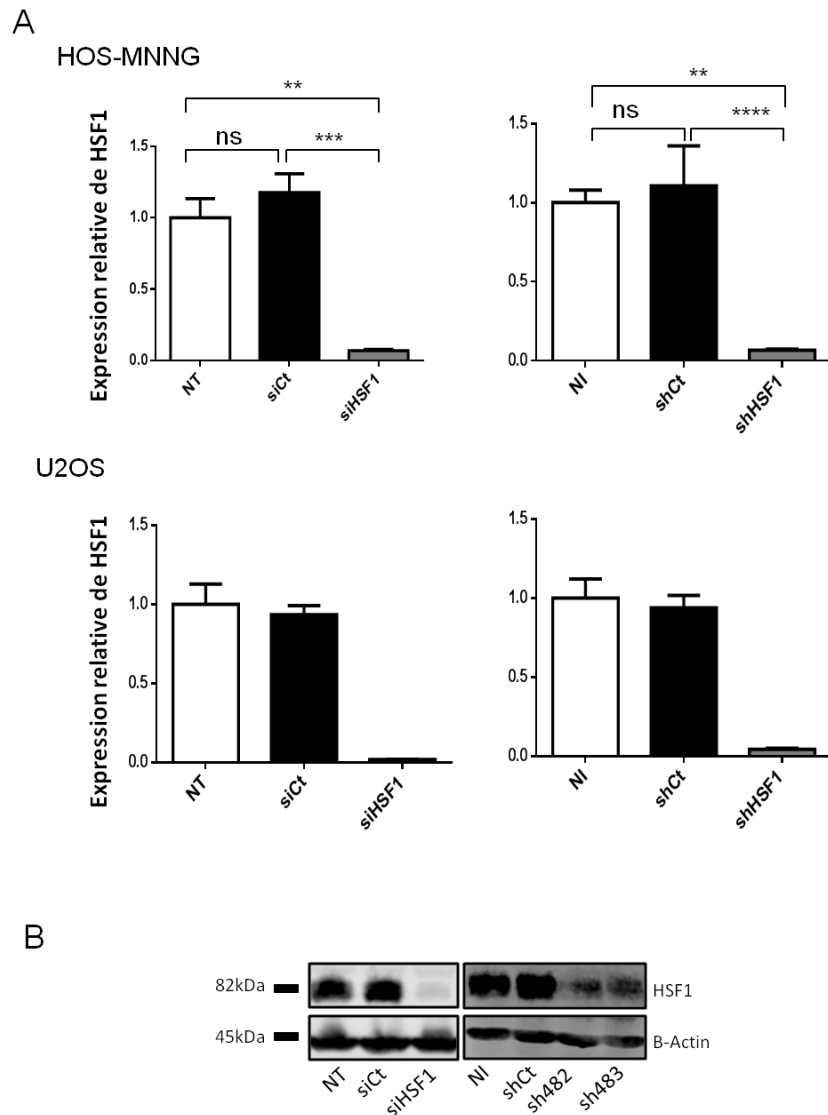


Figure 23 : L'expression élevée de HSF1 est facteur de mauvais pronostic dans l'OS. La survie sans métastase de patients atteints d'OS dans le temps, en fonction du niveau d'expression de HSF1. Ces données ont été analysées à partir des données cliniques de Kuijjer et al. obtenues de la base de données R2 (Kuijjer et al., 2012). (\* =  $p < 0,05$ ).

### *L'inhibition de HSF1 réduit la prolifération et induit la mort dans un modèle in vitro d'OS*

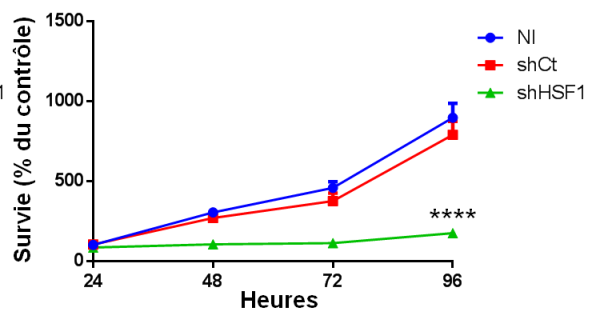
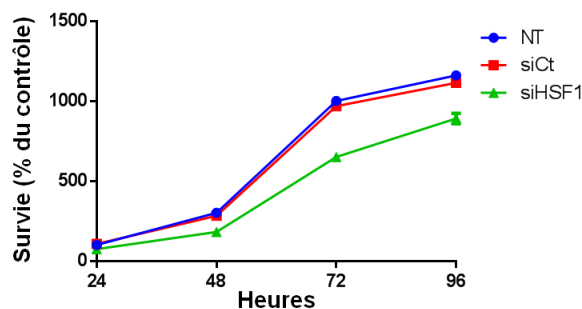
HSF1 étant surexprimé et activé dans l'OS, nous avons émis l'hypothèse qu'il participait à la fonction tumorale. L'importance de HSF1 dans les processus cellulaires pro-tumoraux a donc été évaluée par inhibition, via des méthodes d'ARN interférence (siARN et shARN). Les capacités d'inhibition d'un siARN (constitué de 3 oligonucléotides) et d'un shARN ciblant HSF1 (appelés respectivement siHSF1 et shHSF1) ont été validées par QPCR et par western blot (Figure 24). Dans les lignées cellulaires HOS-MNNG et U2OS, une inhibition de HSF1 supérieure à 90% est obtenue à 48h, en utilisant 30nM de siHSF1, comparativement à des cellules non transfectées (NT), ou transfectées avec un siARN sans cible (siCt). Le shARN (MOI20) permet également une inhibition de HSF1 supérieure à 90% à 72h, dans les deux lignées d'OS, comparativement aux cellules tumorales non infectées (NI) ou infectées avec un shARN sans cible (shCt). Le siHSF1 et le shHSF1 diminuent également l'expression protéique de HSF1 dans la lignée HOS-MNNG.



**Figure 24 : Expression de HSF1 après inhibition par siARN ou shARN. (A)** Les cellules HOS-MNNG ou U2OS ont été transfectées 48h avec un siARN (siHSF1, 30nM) ou transduites 72h (MOI20) avec un shARN (shHSF1) ciblant spécifiquement HSF1. L'expression de HSF1 a été évaluée par qPCR dans ces cellules et comparée à des cellules transfectées avec un siARN contrôle (siCt), ou transduites avec un shARN contrôle (shCt), mais également avec des cellules non modifiées (NT = non transfectées ; NI = non transduites). L'expérience a été réalisée 3 fois (N=3) en triplicat dans la lignée HOS-MNNG (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ). L'expérience n'a été réalisée que 2 fois en triplicat dans la lignée U2OS. De ce fait, aucun test statistique n'a été réalisé pour cette lignée. Les résultats présentés ici correspondent à une expérience représentative. (B) L'expression de HSF1 a été évalué dans la lignée HOS-MNNG par western blot après transfection ou transduction selon les paramètres expérimentaux décrits précédemment. Le shARN 483 correspond au shHSF1 utilisé dans l'étude. Le shARN 482 est un shARN abandonné du fait de la détection d'effets off-target.

Grâce à ces outils d'ARN interférence, les effets de l'inhibition de HSF1 ont été évalués dans différents processus cellulaires. Un test de prolifération au crystal violet a été réalisé. Pour cela, des cellules HOS-MNNG ou U2OS ont été transfectées avec le siHSF1 (30nM durant 48h) ou transduites avec le shHSF1 (MOI 20 durant 72h). Les résultats sont présentés en pourcentage de la prolifération du contrôle NT ou NI à 24h post ré-ensemencement (Figure 25). Le siHSF1 diminue la prolifération des cellules HOS-MNNG comparativement aux contrôles (NT et siCt). Bien que reproductible (N=4) l'écart peu important n'a pas permis d'obtenir de résultats statistiquement significatifs ( $p=0,051$ ) pour un risque  $\alpha=0,05$ . Dans la lignée U2OS, le siHSF1 diminue également la prolifération des cellules tumorales, cependant l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. En effet, le siCt utilisé s'est avéré avoir une activité plus ou moins prononcée dans la lignée U2OS. Les expériences seront donc reproduites dans cette lignée avec un siCt inactif.

#### HOS-MNNG



#### U2OS

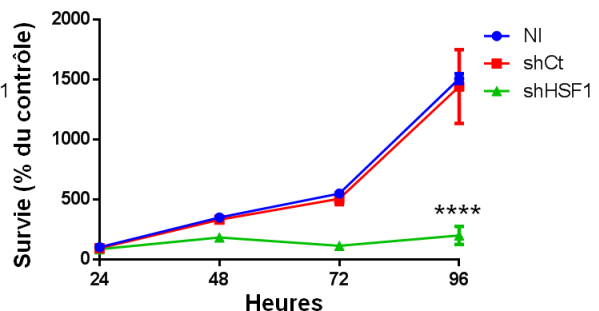
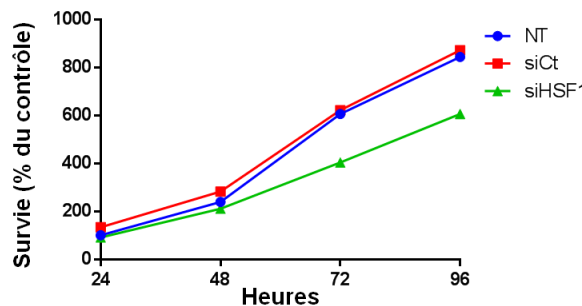


Figure 25: L'inhibition de HSF1 réduit la prolifération cellulaire (test de prolifération au crystal violet). Les cellules HOS-MNNG ou U2OS ont été transfectées avec 30nM de siHSF1 ou transduites avec le shHSF1 (MOI20). 48h après transfection ou 72h après transduction les cellules ont été décollées, comptées et ré-ensemencées en plaques de culture 96 puits. Le test de prolifération a été réalisé 24, 48, 72 ou 96h après ré-ensemencement. La viabilité est exprimée en pourcentage. La viabilité de la population NT (transfection) ou NI (transduction) à 24h représente 100%. Toutes les expériences ont été réalisées N=4 en triplicats exceptée la transfection U2OS réalisée une fois en triplicat. Les résultats présentés correspondent à une expérience représentative. Les étoiles (\* =  $p<0,05$  ; \*\* =  $p<0,01$  ; \*\*\* =  $p<0,0001$ ) illustrent la

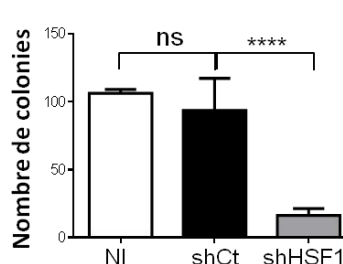
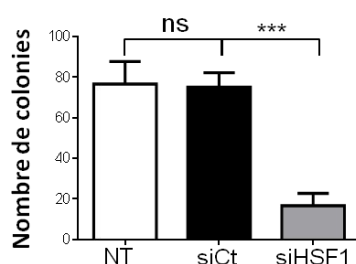
significativité statistique de la différence entre les conditions siCt vs siHSF1 ou shCt vs shHSF1, à 96h de prolifération. La différence entre les conditions NT et siCt ou NI et shCt n'est pas statistiquement significative.

Les résultats du test de prolifération après transfection siHSF1 ont été confirmés par la transduction avec le shHSF1. En effet, l'inhibition de HSF1 par shARN diminue de manière significative ( $p < 0,0001$ ) la prolifération des cellules HOS-MNNG et U2OS. A 96h, la prolifération est réduite de 80,6% dans la lignée HOS-MNNG et de 86,8% dans la lignée U2OS par rapport au contrôle shCt.

La clonogénicité des cellules d'OS est également affectée par l'inhibition de HSF1 (Figure 26). Ainsi, les cellules HOS-MNNG transfectées 48h avec le siHSF1 voient leurs capacités clonogéniques diminuer significativement ( $p < 0,001$ ) de 77,8% (16 colonies) comparé à la condition contrôles siCt (75 colonies). Concernant les cellules U2OS, siHSF1 réduit la clonogénicité de 30,5% dans la population transfectée (90 colonies) comparé à la population siCt (130 colonies). Cette expérience n'a été réalisée qu'une fois dans la lignée U2OS, pour les mêmes raisons que précédemment.

L'inhibition de HSF1 par shARN réduit également la clonogénicité des cellules HOS-MNNG et U2OS de manière significative, 72h après transduction. La clonogénicité de cellules HOS-MNNG transduites avec le shHSF1 (16,33 colonies dénombrées) est ainsi réduite de 82,57% ( $p < 0,0001$ ) par rapport à la condition shCt (93,66 colonies). Dans la lignée U2OS, la réduction de la clonogénicité est de 50% ( $p < 0,01$ ) entre les cellules transduites avec le shHSF1 (60,33 colonies) et celles transduites avec le shCt (120,66 colonies).

## HOS-MNNG



## U2OS

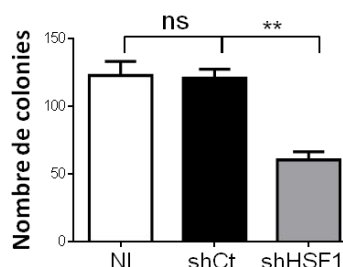
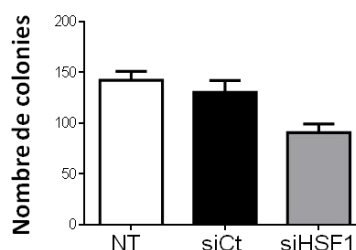
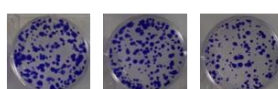


Figure 26 : L'inhibition de HSF1 diminue les capacités clonogéniques des cellules d'OS. Les cellules HOS-MNNG ou U2OS ont été transfectées avec 30nM de siHSF1 ou transduites avec le shHSF1 (MOI 20). 48h après transfection ou 72h après transduction les cellules ont été décollées, comptées et ré-ensemencées en plaques de culture 6 puits. Après une semaine, les colonies cellulaires ont été colorées au crystal violet et comptées. Les résultats présentés correspondent à une expérience représentative (N ≥ 4, excepté pour la transfection U2OS, réalisée une seule fois). (\* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001, \*\*\*\*=p<0,0001).

La diminution de la prolifération et de la clonogénicité subséquente à l'inhibition de HSF1 pourrait être due à un blocage du cycle cellulaire. C'est pourquoi cette possibilité a été testée grâce à une observation du cycle cellulaire par cytométrie en flux, après inhibition de HSF1 par shARN et marquage de l'ADN au iodure de propidium (PI) (Figure 27). Les cellules HOS-MNNG transduites avec un shHSF1 présentent de manière reproductible (N=4) un blocage du cycle en G0/G1. En effet, la proportion de cellules tumorales en phase G0/G1 du cycle cellulaire augmente après inhibition de HSF1 (71,9%), comparativement aux cellules HOS-MNNG transduites avec shCt (44,1%) et aux cellules HOS-MNNG NI (46,4%). Concernant



la lignée U2OS, le shHSF1 induit de faibles variations de la répartition cellulaire dans les conditions expérimentales utilisées. La phase G0/G1 est augmentée de 3,3% et 4,8% dans la condition shHSF1 comparé respectivement aux conditions shCt et NI. Il est possible que des modifications du protocole soient nécessaires pour observer un blocage du cycle dans ces lignées.

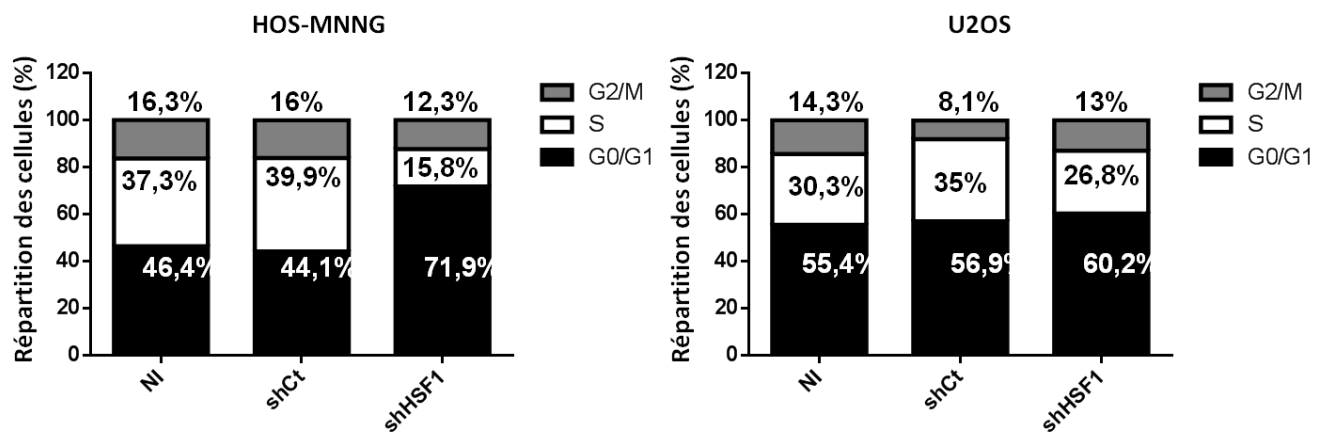


Figure 27 : L'inhibition de HSF1 induit un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 dans les cellules HOS-MNNG. Les cellules ont été transduites pendant 72h avec le shHSF1 (MOI 20). Elles ont ensuite été fixées et marquées au iodure de propidium. La lecture du marquage a été réalisée par cytométrie en flux et l'analyse des résultats a été réalisée avec Flowlogic (Invai Technologies). L'expérience a été réalisée N=4 en triplicat pour la lignée HOS-MNNG et N=2 en triplicat pour la lignée U2OS.

La diminution de la prolifération induite par HSF1 peut s'expliquer par un blocage du cycle cellulaire, mais elle pourrait également s'expliquer par une induction de la mort. Un test de l'activité enzymatique des caspases-3 et 7 a donc été effectué afin de vérifier cette hypothèse (Figure 28). Le test réalisé après inhibition de HSF1 par siARN (30nM pendant 48h) ou par shARN (MOI20 pendant 72h), montre une augmentation significative de l'activité des caspases-3 et 7, et donc de l'apoptose. L'inhibition de HSF1 par siARN augmente significativement l'activité des caspase-3/7 par 6,4 fois dans les cellules HOS-MNNG comparativement aux cellules contrôles (siCt). L'activité enzymatique des caspases-3/7 est ainsi de 370,29UA dans la population siCt et de 2388,1UA dans la population siHSF1 ( $p < 0,001$ ). La transduction par le shHSF1 multiplie l'activité des caspases-3/7 dans les cellules HOS-MNNG par 4, passant de 238,8UA dans la population shCt à 982,9UA dans la population shHSF1 ( $p < 0,05$ ). Concernant la lignée U2OS, la transduction par le shHSF1

(796,58UA) multiplie l'activité caspases-3/7 par 7 comparativement aux cellules U2OS traitées avec le shCt (112,35UA). Le siHSF1 n'augmente cependant pas l'activité caspases-3/7 comparativement au siCt. En effet, le siCt induit une augmentation de l'activité des caspases-3/7. Cela corrèle avec le fait que comme indiqué précédemment, le siCt réduit la prolifération des cellules U2OS (potentiel effet off-target du siCt dans les cellules U2OS).

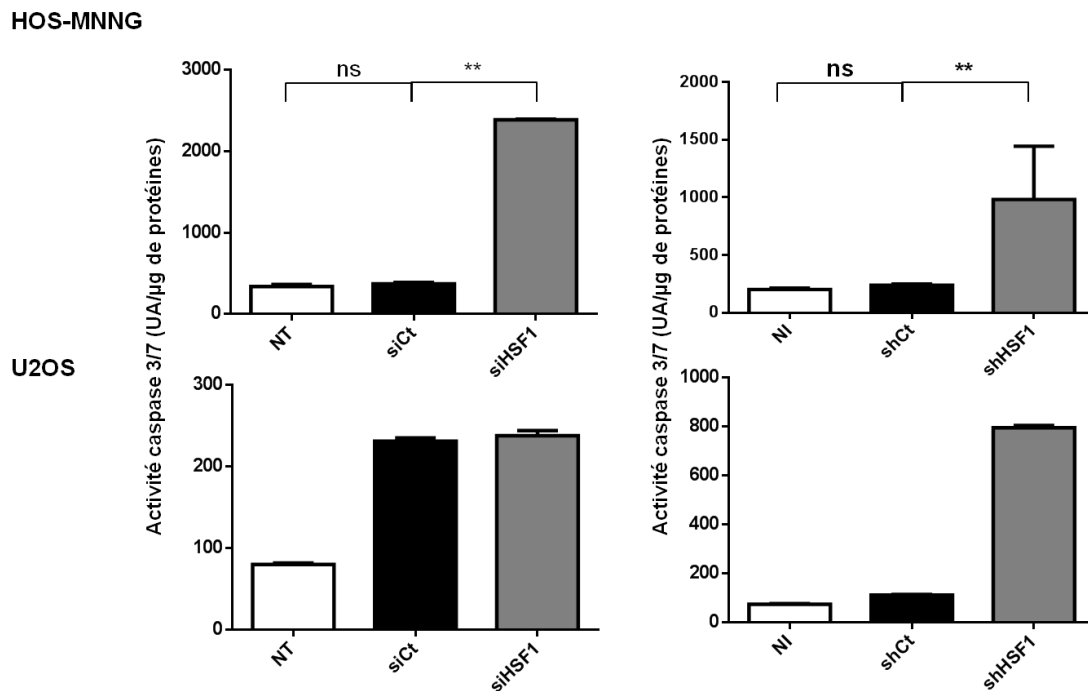


Figure 28 : L'inhibition de HSF1 induit la mort cellulaire par apoptose dépendante des caspases. L'activité des caspases-3/7 a été évaluée par un test enzymatique, après 48h de transfection avec le siHSF1 (30nM) ou 72h de transduction avec le shHSF1 (MOI 20). L'activité des caspases-3/7 est rapportée à 1µg de protéines et exprimée en unité arbitraire (UA) par µg de protéines. L'expérience a été réalisée trois fois en duplicat pour la lignée HOS-MNNG et deux fois en duplicat pour la lignée U2OS. \*\* = p<0,01.

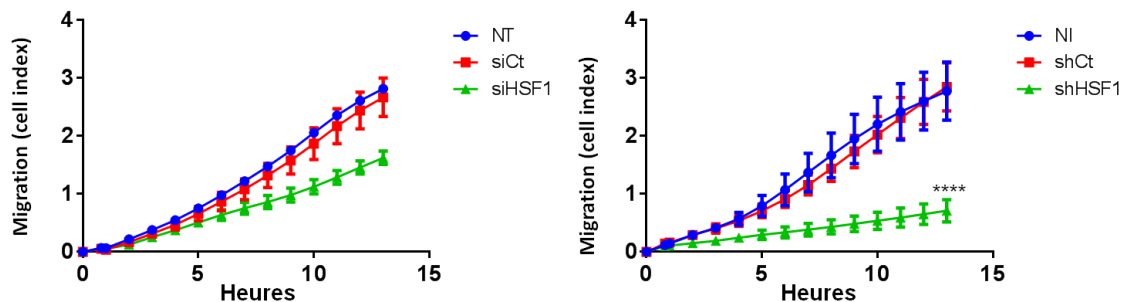
### L'inhibition de HSF1 réduit la migration des cellules d'OS

Plusieurs études ont auparavant décrit une implication de HSF1 dans la migration des cellules tumorales (Fang et al., 2012; Kim et al., 2018; Nakamura et al., 2014; Toma-Jonik et al., 2015). Nous avons donc testé les effets de l'inhibition de HSF1 (par siHSF1 ou shHSF1) sur ce processus dans notre étude. Pour cela, nous avons utilisé l'appareil Xcelligence d'ACEA qui quantifie la migration en temps réel par mesure de l'impédance (l'opposition des cellules

au passage du courant) et l'exprime en une valeur appelée Cell index (Figure 29). Huit heures après le début de l'expérience, le siHSF1 réduit la migration (le cell index) des cellules HOS-MNNG de 34,8% par rapport au siCt, et le shHSF1 réduit la migration des cellules HOS-MNNG de 70% par rapport au shCt. L'effet du shHSF1 sur la migration est statistiquement significatif ( $p < 0,0001$ ), mais celui du siHSF1 ne l'est pas ( $p = 0,059$ ) pour un risque  $\alpha$  de 0,05. La répétition de l'expérience ( $N=3$  pour le moment) sera nécessaire afin d'obtenir un résultat significatif.

Concernant la lignée U2OS, le siHSF1 et le shHSF1 réduisent la migration de manière significative ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$  respectivement). Cette diminution est de 31,53% pour le siHSF1 à 8h, comparé au siCt, et de 81,37% pour le shHSF1 à 8h comparé au shCt.

#### A : HOS-MNNG



#### B : U2OS

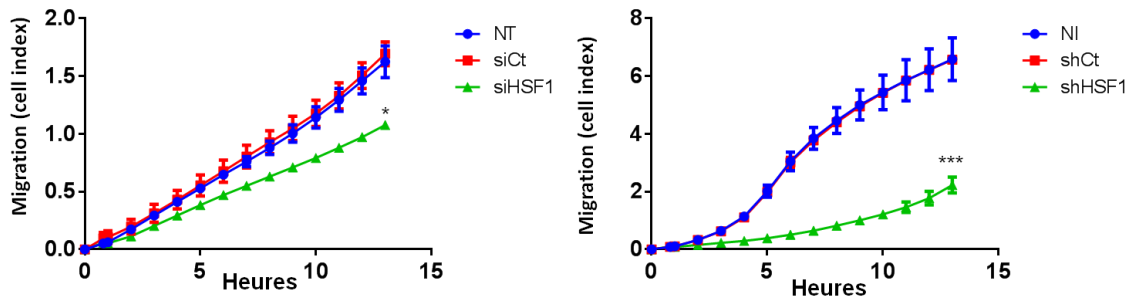


Figure 29 : L'inhibition de HSF1 réduit la migration des cellules d'OS. Des cellules HOS-MNNG ou U2OS ont été transfectées pendant 24h avec 30nM de siHSF1 ou transduites pendant 72h avec un shHSF1 à MOI 20. La migration a été évaluée en temps réel grâce à l'Xcelligence d'ACEA et exprimée en une valeur appelée cell index. Les expériences ont été réalisées  $N \geq 3$ . Les résultats présentés ici correspondent à une expérience représentative. Les étoiles (\* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,01$  ; \*\*\* =  $p < 0,0001$ ) illustrent la significativité statistique de la différence entre les conditions siCt vs siHSF1 ou shCt vs shHSF1, à 13h de migration. La différence entre les conditions NT et siCt ou NI et shCt n'est pas statistiquement significative.

## L'inhibition de HSF1 réduit la croissance tumorale dans un modèle vivo d'OS

Afin de mesurer l'effet de l'inhibition de HSF1 sur la croissance tumorale *in vivo*, des souris nues ont été injectées avec 2 millions de cellules HOS-MNNG transduites avec le shCt ou le shHSF1. À partir d'une semaine après l'injection, dès que la tumeur était palpable, la croissance a été mesurée 2 fois par semaine pendant 33 jours (Figure 30). L'inhibition de HSF1 réduit significativement la croissance tumorale ( $p < 0,01$ ). À 33 jours, le volume tumoral moyen dans le groupe shCt était de  $1711,82\text{mm}^3$  et de  $1016,92\text{mm}^3$  dans le groupe shHSF1. À la fin de l'expérimentation, 4 souris sur 6 avaient un volume tumoral supérieur à  $1500\text{mm}^3$  dans le groupe shCt (Figure 30), alors que dans le groupe shHSF1 aucune souris n'avait dépassé le seuil de  $1500\text{mm}^3$  à la fin de l'expérimentation.

Après 33 jours les souris ont été sacrifiées, les pattes tumorales et les poumons ont été récoltés pour l'observation de la densité osseuse par micro-scanner (Figure 31) ainsi que pour des expériences d'immunohistochimie. Le nombre de métastases pulmonaires, la quantification des cellules prolifératives et de la densité vasculaire dans la tumeur sont les paramètres qui seront observés dans le futur.

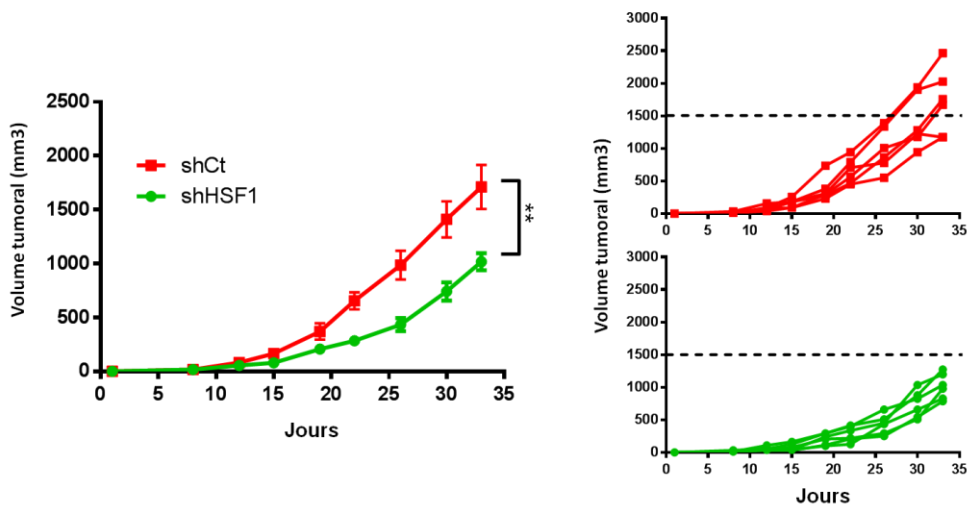


Figure 30 : L'inhibition de HSF1 par shARN ralentit la croissance tumorale dans un modèle préclinique d'OS. Le modèle animal est un modèle murin obtenu par injection de cellules tumorale HOS-MNNG en paratibial. Deux groupes de N=6 souris ont été constitués et injectés avec 2 millions de cellules HOS-MNNG transduites soit avec le shHSF1 ou le shCt. La croissance tumorale a été mesurée 2 fois par semaine pendant 33 jours. Le graphe à gauche représente les volumes tumoraux moyens dans les deux groupes (+/- S.E.M). Les deux graphes à droite représentent les volumes tumoraux individuels. (\*\* =  $p < 0,01$ ).

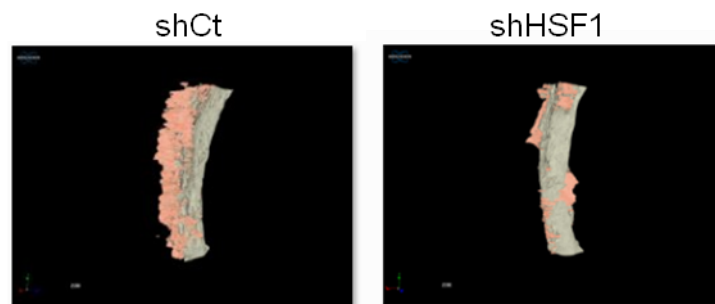


Figure 31 : Quantification de l'os ectopique dans les groupes shCt et shHSF1. Les pattes portant la tumeur ont été prélevées après le sacrifice des souris, et les paramètres osseux ont été mesurés par micro-scanner.

## *Le choc thermique modifie les sites de fixation de HSF1 dans les cellules HOS-MNNG*

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires et transcriptionnels à l'origine des effets biologiques observés après inhibition, nous avons utilisé des approches haut débit (ChIP-

sequencing and RNA-sequencing). Par ces approches, nous souhaitons définir le réseau transcriptionnel régulé par HSF1 dans l'OS.

Dans ce but, un ChIP-sequencing (immunoprécipitation de chromatine) a été effectué dans des cellules HOS-MNNG. Deux conditions ont été réalisées : des cellules HOS-MNNG normale (control, Ct) ou des cellules HOS-MNNG soumises à un choc thermique (Heat-shock, HS) d'une heure à 43°C. Le HS permet de différencier les sites de fixations de HSF1 liés à sa fonction de régulateur du stress, de ceux potentiellement lié à l'état malin fixé par HSF1 de manière constitutive dans les cellules HOS-MNNG contrôle. Les séquences brutes obtenues suites au séquençage ont été alignées sur le génome humain (version hg19) avec l'outil bwa mem, ce afin de déterminer les fragments génomiques qui sont immunoprécipités avec notre protéine d'intérêt (HSF1). Trois fichiers ont été obtenus du séquençage : l'immunoprécipitation de HSF1 en condition contrôle, en condition choc thermique et l'input. Ce dernier correspond à l'échantillon sans ajout d'anticorps HSF1. Il va servir comme contrôle pour estimer le bruit de fonds et éventuellement corriger les sites d'altérations en nombre de copies dans le génome. Puis les régions génomiques significativement plus enrichies en séquences dans la condition HS ou Ct comparée à l'input ont été déterminées : c'est le peak-calling.

Après le peak calling par MACS2 (version 2.1.3) (Zhang et al., 2008), 12211 pics de fixation de HSF1 ont été identifiés dans la condition contrôle (Ct) et 10994 dans la condition HS (la q value seuil choisie est de  $10^{-12}$ ). Les pics de fixation de HSF1 ont été annotés en utilisant le package ChIPseeker R (Yu et al., 2015). La figure 32 illustre la répartition des pics de HSF1 sur l'ADN dans la condition Ct. Environ 25% des pics sont situés dans une zone de 1kb en amont et 200pb en aval du site de départ de la transcription (TSS). C'est pourquoi dans notre étude nous avons choisi de considérer cette région comme la région promotrice des gènes. Il est intéressant de noter par ailleurs qu'un tiers des pics de HSF1 se situent dans des régions intergéniques (-10 à -100kb en amont du TSS) pouvant correspondre à des régions d'enhancers. Par conséquent, HSF1 semble se fixer sur l'ensemble des régions régulatrices de la transcription dans le génome (exon, intron, promoteur, enhancer...).

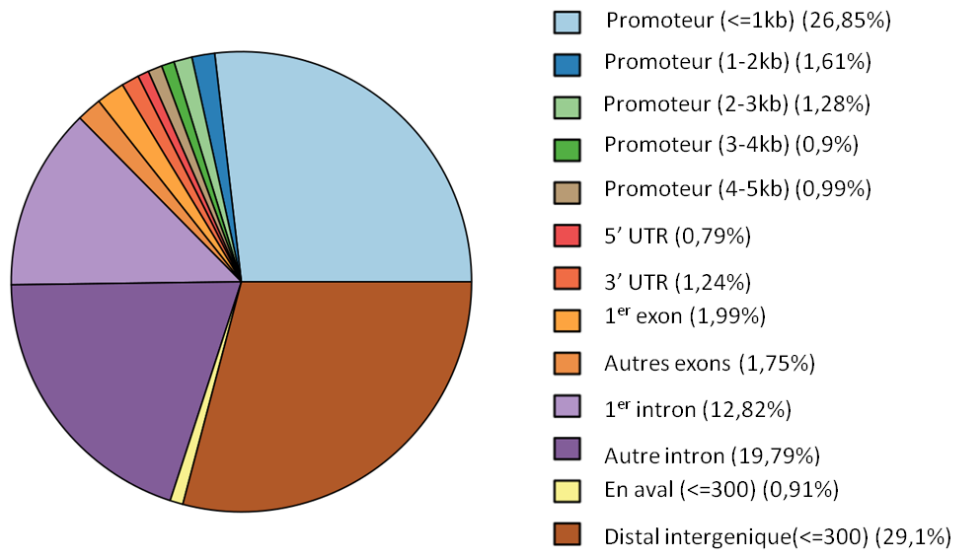


Figure 32 : Répartition des pics de fixation de HSF1 obtenus par ChIP-sequencing, dans le génome de cellules HOS-MNNG contrôles (non stressées). L'annotation des pics de fixation HSF1 a été réalisée avec le package R ChIPseeker (Yu et al., 2015).

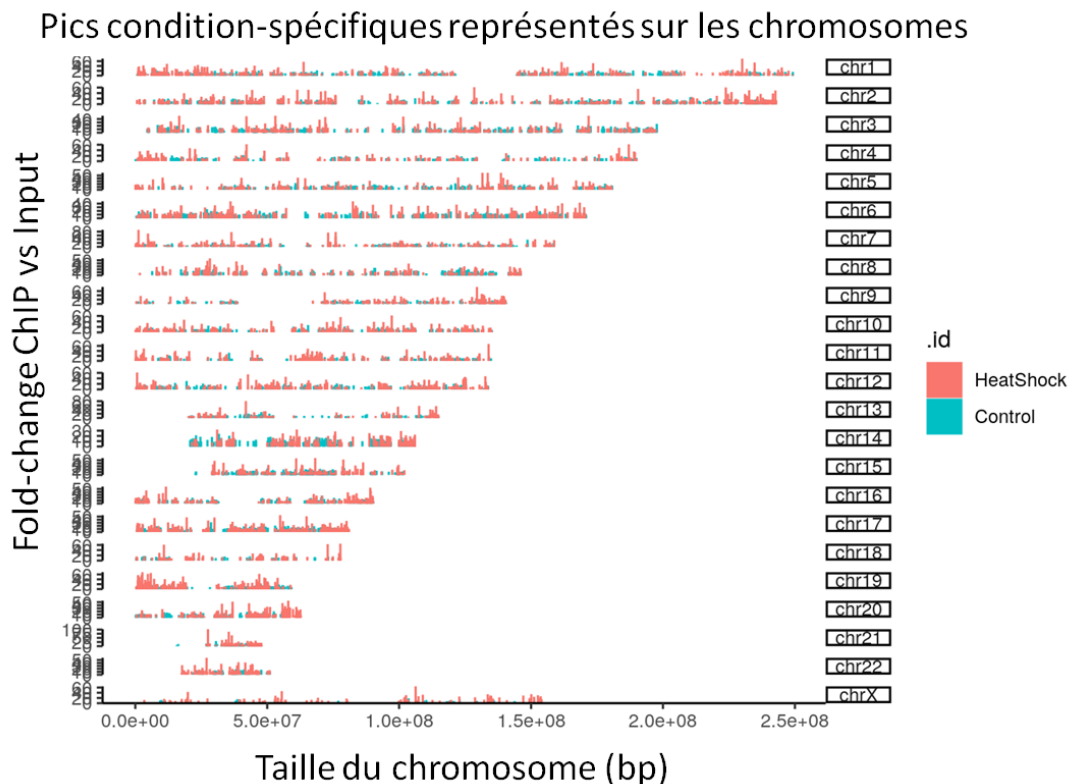
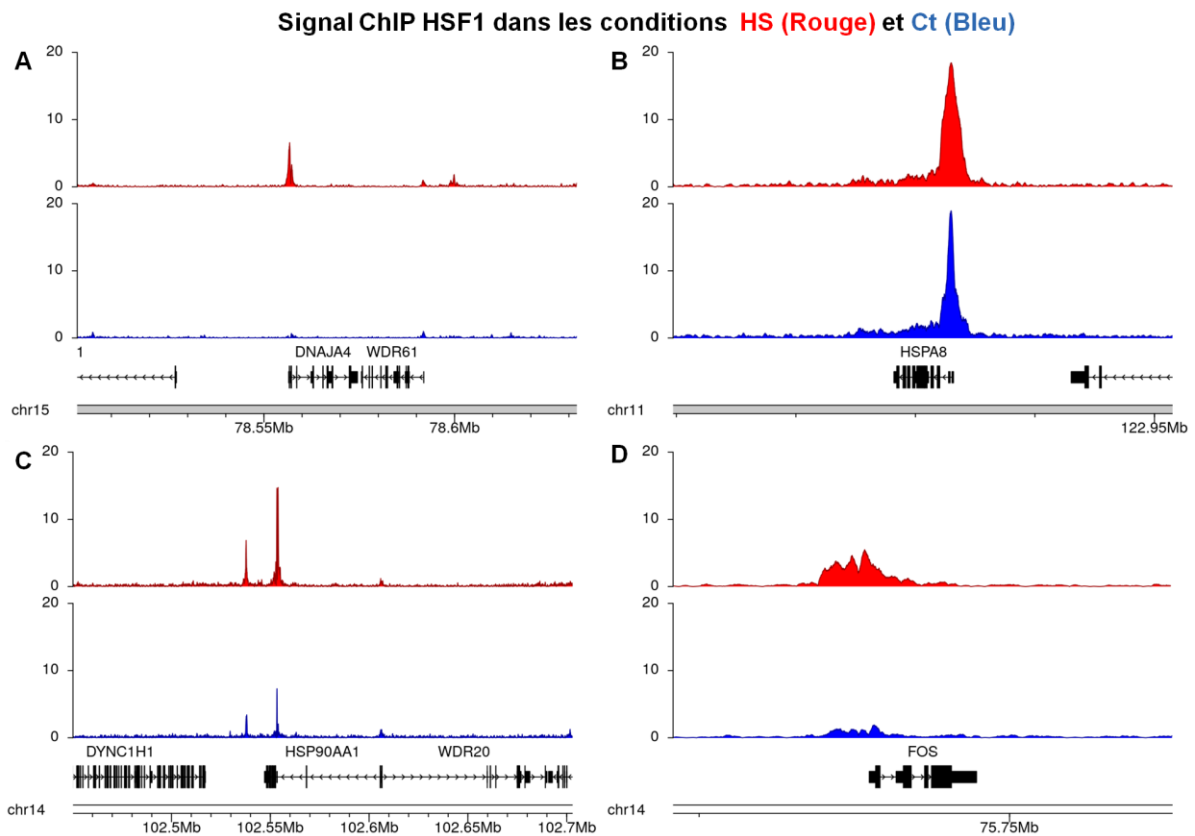


Figure 33 : Les zones de fixation de HSF1 sur le génome, dans les conditions HS (pics rouges) ou Ct (pics bleus). Les chromosomes fixés sont indiqués à droite de l'image. La hauteur du pic illustre le fold-change (rapport de l'intensité du pic maximal dans une condition et dans une région donnée, sur le pic maximal dans la même région dans l'input).

Afin d'avoir un aperçu global des sites de fixation de HSF1 dans les deux conditions, Ct et HS, les pics significativement enrichis ont été visualisés sur l'ensemble du génome. La Figure 33 est une illustration de la fixation de HSF1 sur le génome entre les conditions HS ou Ct, avec en ordonnées le fold-change de la fixation [le fold-change est le rapport de l'enrichissement en séquences du pic maximal dans une région sur celui dans la condition input (*i. e.* sans immunoprécipitation) pour cette même région]. Environ 40% des pics de fixation de HSF1 sont conservés entre les conditions HS et Ct, mais il existe des pertes ou des gains de sites de fixation après le HS. Environ 2538 gènes sont liés dans leur promoteur par HSF1, uniquement en absence de HS, et 1811 gènes sont liés par HSF1 uniquement après un HS. HSF1 se fixe par exemple *de novo* au niveau du gène codant pour la chaperonne DNAJA4 après HS validant ainsi notre condition stress thermique (Figure 34A). De plus, bien qu'il soit déjà présent avant HS, HSF1 est enrichi après HS au niveau des gènes des chaperonnes HSPA8 (HSC70) et HSP90AA1 (Figure 34B et C). Mais de manière surprenante, HSF1 est également lié dans la condition Ct au niveau du promoteur de l'oncogène FOS par exemple (Figure 34D).





**Figure 34 : Comparaison des pics de fixation de HSF1 sur les promoteurs de (A) DNAJA4, (B) HSPA8/HSC70, (C) HSP90AA1 et (D) FOS, entre les conditions HS (rouge) et Ct (bleu). Le signal est exprimé en read par million (rpm).**

L'analyse comparative des données ChIP-sequencing de HSF1 indique donc que le HS induit bien une fixation de HSF1 sur des zones propres à sa fonction de régulateur du stress. Peut-être du fait de sa surexpression et de son activation constitutive, HSF1 est également fixé en condition contrôle, sur des cibles autres que celles en relation avec le stress cellulaire. Cette « neo » fixation pourrait être due au stress intrinsèque à la transformation maligne, mais elle pourrait également être présente dans un contexte physiologique. De manière intéressante, la fixation de HSF1 à l'ADN apparaît plus forte dans la condition HS que dans la condition contrôle, comme le montre la (Figure 35). Il s'agit d'un scatter plot représentant les fold-changes des pics uniques à chaque condition, Ct ou HS, calculés comme indiqué précédemment (rapport pic maximal condition (HS ou CT) sur pic maximal input, dans une région donnée). Plus le fold-change est élevé, plus l'intensité de la fixation de HSF1 est forte.

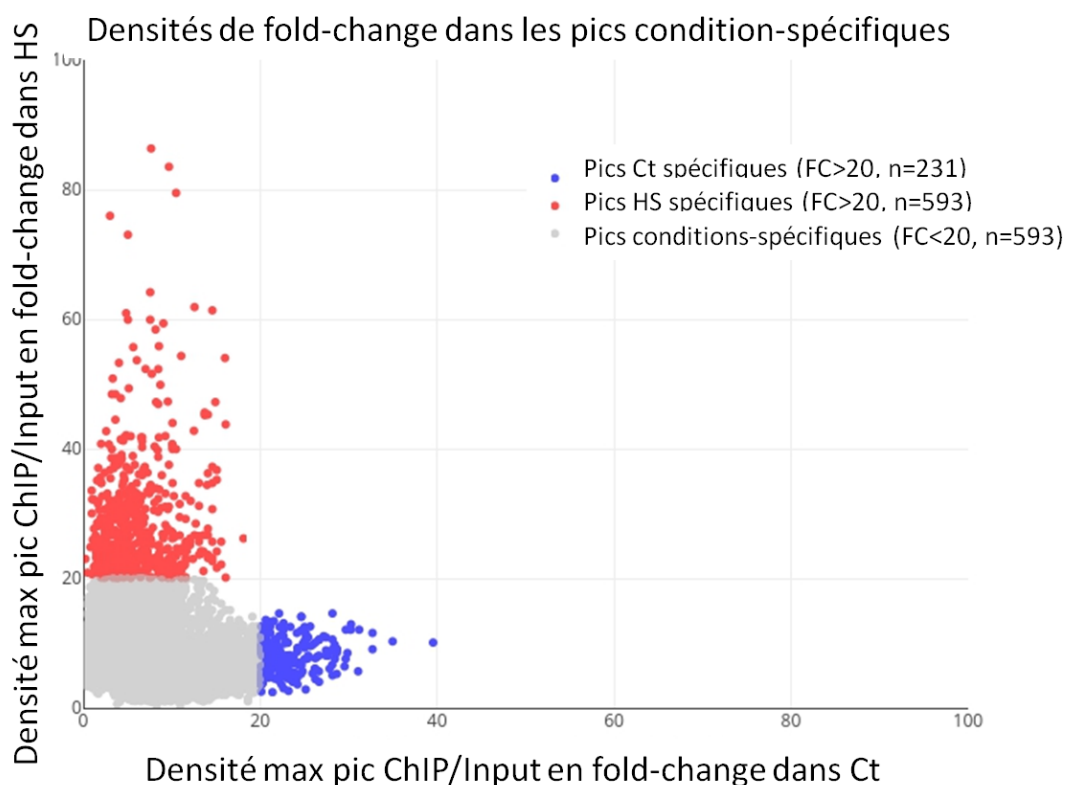


Figure 35 : L'affinité de la fixation de HSF1 à l'ADN est plus forte après un HS. Le fold-change (FC) des pics de fixation de HSF1 sur l'ADN, dans les conditions HS (rouge) ou Ct (bleu). Pour chaque condition, le fold-change de la fixation de HSF1 a été quantifié en faisant le rapport de la valeur maximale de pic dans une région, sur la valeur maximale de pic dans la même région, dans l'input. Chaque point représente un pic spécifique de la condition HS (points rouges) ou Ct (points bleus).

Nous pouvons ainsi observer que dans la condition HS, 593 pics (uniques à cette condition) ont un fold-change supérieur à 20, alors qu'il n'y a que 231 pics avec un fold-change supérieur à 20 dans la condition Ct. De plus, dans la condition Ct, aucun pic n'a de fold-change supérieur ou égale à 40, contre plus de 45 dans la condition HS. Ces résultats montrent que les sites de fixations de HSF1 acquis après un HS sont plus fortement liés par le facteur de transcription HSF1, comparé aux sites de fixation spécifiques à la condition Ct. En somme, nous pouvons conclure que même s'il y a une conservation d'une partie des sites de fixation de HSF1, nous constatons un nombre important de promoteurs délaissés au bénéfice de nouveaux promoteurs lors d'un choc thermique. Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse d'un changement des gènes régulés par HSF1 entre la condition contrôle (Ct) et la condition choc thermique (HS). Au vu de ces résultats, nous avons procédé à l'analyse des séquences fixées par HSF1 dans les deux conditions par recherche de motifs. Ces sites acquis

après HS pourraient être plus proches de la séquence consensus HSE. Les sites fixés dans la condition Ct pourraient donc soit avoir une séquence très éloignée du motif HSE, soit tout simplement être des séquences différentes.

### *HSF1 se lie à des sites différents de sa séquence consensus (HSE)*

La comparaison des signaux de fixation montre que HSF1 se fixe plus fortement à l'ADN dans les sites spécifiques au HS, comparé aux sites spécifiques à la condition Ct. Une analyse de motif a donc été réalisée afin d'identifier les séquences d'ADN sur lesquelles HSF1 se fixerait. En l'occurrence, elle a été réalisée sur les pics totaux de chaque condition (Ct ou HS). L'outil utilisé pour l'analyse de motif est HOMER (Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment ([homer.ucsd.edu](http://homer.ucsd.edu))).

Comme attendu, les motifs les plus représentés dans les régions fixées par HSF1 dans la condition HS sont des variations du motif HSE (GAAnnTTC, avec n représentant un nucléotide quelconque) décrit dans la littérature, avec une p-value de  $1^{\text{e}}-2463$  dans la première version, et  $1^{\text{e}}-1915$  dans une variation différente du motif HSE consensus (Figure 36).

Après le motif HSE, les 8 séquences suivantes, avec des p-value nettement moins significatives (allant de  $1^{\text{e}}-801$  à  $1^{\text{e}}-648$ ), sont des séquences reconnues par les protéines des familles FOS, JUN et ATF (FOS, JUN, FRA-1, FRA-2, ATF3...) (Figure 37). Les protéines de ces familles forment le complexe de facteur de transcription AP-1 par homo ou hétérodimérisation. Il faut cependant noter que compte tenu de la forte ressemblance des motifs des familles JUN, FOS et ATF (tous proches du motif TGAnTCA), il est fort probable que ces motifs soient reconnus et partagés par les trois familles. De ce fait, nous parlerons désormais de motif AP-1. Il est également intéressant de noter que NRF2, facteur de transcription de la réponse au stress oxydatif abordé précédemment (dans la partie stress cellulaire de l'introduction générale), appartient à la famille des JUN related transcription factors. Même si son propre motif (motif ARE : TGAGTCA) (Figure 37) apparaît avec un niveau de significativité relativement faible (p-value =  $1^{\text{e}}-100$ ), sa ressemblance avec les

motifs des membres de la famille AP-1 laisse penser qu'il pourrait également fixer les motifs attribués à AP-1.

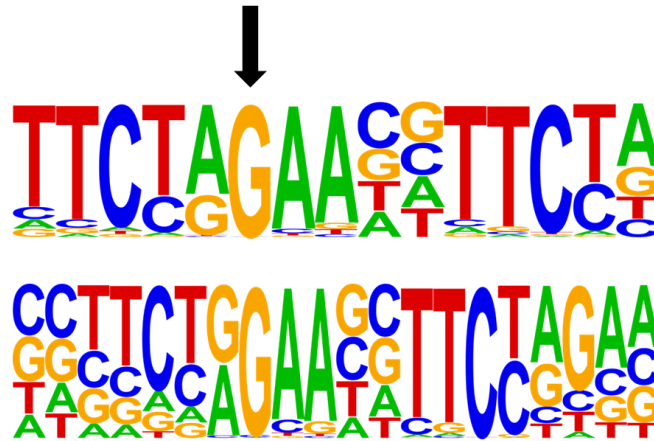


Figure 36 : Les motifs HSE identifiés dans les régions fixées par HSF1 dans la condition HS. L'analyse de motifs a été réalisée avec l'outil HOMER. La flèche pointe le premier nucléotide G de la séquence GAAnnTTCnnGAA caractéristique du motif HSE (« n » désignant un nucléotide quelconque). La taille des lettres illustre la probabilité de retrouver un nucléotide à une position donnée (taille importante = forte probabilité de retrouver le nucléotide à cette position).

Le motif HSE est le motif le plus retrouvé, et donc potentiellement le plus fixé dans la condition HS, mais ce n'est pas le cas pour les régions fixées par HSF1 dans la condition Ct. En effet, dans la condition contrôle, les 8 motifs les plus enrichis appartiennent aux familles JUN, FOS, ATF (donc AP-1), avec des p-value allant de  $10^{-1971}$  à  $10^{-1757}$ . Les neuvième et dixième motifs les plus significatifs sont les motifs Erg et ETV2, appartenant à la famille ETS (E26 transformation-specific) des facteurs de transcriptions (p-value de  $10^{-1316}$  et  $10^{-1063}$ ). Dans la condition de Ct, le motif HSE n'est que le 26ème motif le plus enrichi selon l'analyse HOMER, avec une p-value de  $10^{-434}$ .

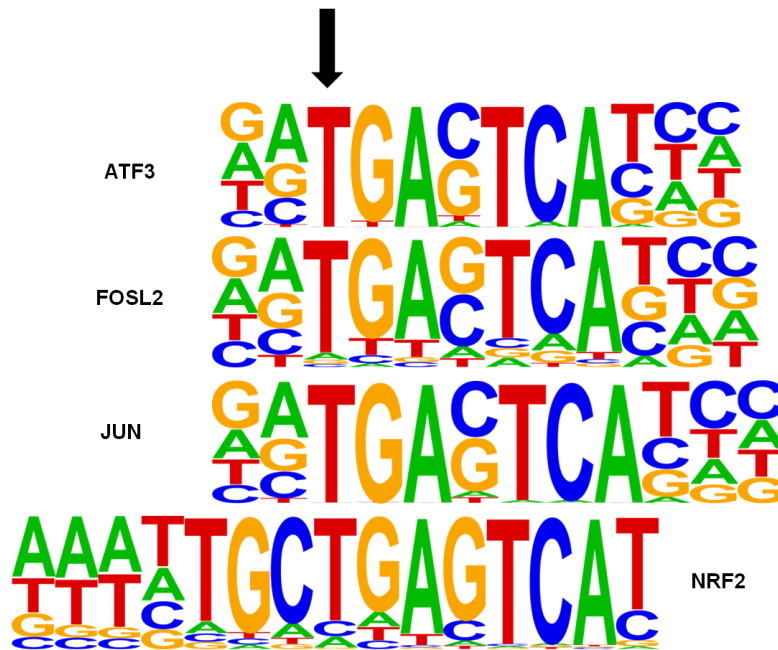


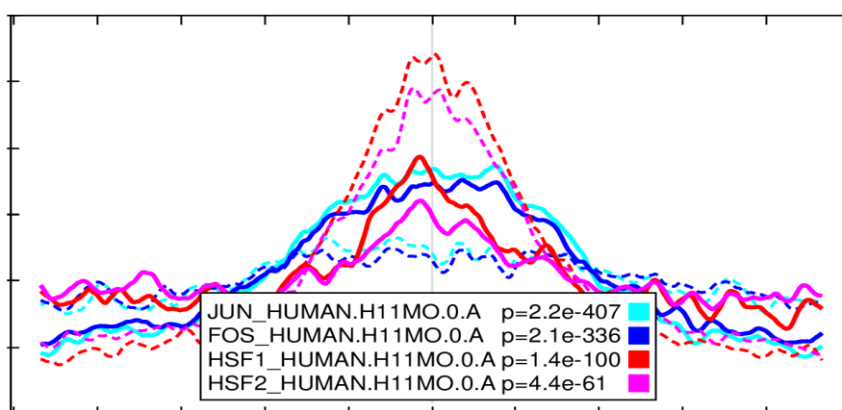
Figure 37: HSF1 se lie à l'ADN sur les motifs AP-1/ARE dans la condition Ct et dans la condition HS. Les motifs ADN reconnus par les facteurs de transcription des familles ATF, FOS et JUN (AP-1) et le motif ARE (NRF2) identifiés par l'outil HOMER dans le ChIP-seq HSF1 (condition HS). La flèche pointe le début du motif TGAnTCA (n désigne un nucléotide quelconque).

Les résultats de l'analyse de motifs ont été confirmés par une autre approche de découverte de motifs *de-novo* (*i.e.* sans fournir de base de données de motifs), avec l'outil rGADEM (Droit et al., 2019). Dans le Tableau VII sont présentés les motifs les plus souvent retrouvés dans les sites de fixation de HSF1 dans les conditions Ct ou HS. Dans la condition Ct, le motif AP-1 a été retenu comme étant dans les motifs les plus importants en nombre, dans les sites de fixation de HSF1 (5744 occurrences), ainsi que le motif ETS (7705 occurrences). La séquence HSE consensus (GAAnnTTCnnGAA) n'est pas présente dans les 5 premiers motifs les plus retrouvés par rGADEM dans la condition Ct. Après un HS, le motif HSE montre un nombre d'occurrences élevé (9629 occurrences) parmi les séquences fixées par HSF1, tandis que le motif AP-1 baisse légèrement en nombre d'occurrences (4405 occurrences) comparé aux sites Ct.

Numéro	Séquences
<b>Condition contrôle</b>	
1	nTGA <sup>W</sup> CTCAn
2	rvAGGA <sup>s</sup> Ar <sup>n</sup>
<b>Condition heat-shock</b>	
1	nTTC <sup>y</sup> rGA <sup>W</sup> AnnTTC <sup>n</sup> Cyn
2	nTGrCTCAn

Tableau VII : Résultat de l'analyse de motif par rGADEM. Les motifs sont classés en fonction de leur priorité. W = A ou T « weak » ; s = C ou G « strong » ; y = « pyrimidine » ; r = A ou G « purine » ; m = A ou C « amino » ; n = « any ».

Ces résultats corréleront donc avec ceux de l'analyse HOMER, et indiquent que HSF1 lie préférentiellement le motif AP-1 en absence de HS. Une analyse comparative d'enrichissement en motifs connus a été également effectuée en utilisant Centrimo de MEME-suites (<http://meme-suite.org>). La figure 38 montre une augmentation de l'enrichissement en motif HSE dans les sites de fixation de HSF1 en condition HS relativement à la condition contrôle (3648 régions vs 2152 régions pour le motif HSF1 GAAnnTTCnnGAA, respectivement en Ct et en HS). On observe en parallèle une baisse de l'enrichissement en motifs des protéines de la famille AP-1 (5936 vs 3545 régions pour JUN, 5409 vs 2885 pour FOSL2 respectivement en Ct et en HS).



Centrimo 5.0.5

Figure 38 : Enrichissement comparatif en motifs connus des sites de fixation de HSF1 dans les conditions Ct (lignes pleines) et HS (lignes en pointillées).

Pris dans leur globalité, ces résultats indiquent que dans les cellules contrôles, en absence de HS, HSF1 se fixerait majoritairement sur des sites enrichis en motifs des protéines AP-1/NRF2. Dans cette condition, les sites HSE sont moins importants en nombre. Après un HS, HSF1 se lie à des régions génomiques avec un enrichissement supérieur pour le motif HSE comparé aux motifs AP-1/NRF2. Suite aux conclusions effectuées dans la partie précédente sur la comparaison des signaux de fixation de HSF1, nous pouvons conclure que HSF1 se fixe à des régions génomiques peu enrichies en motif HSE et avec une moindre affinité dans les cellules HOS-MNNG sans choc thermique. Le choc thermique cause un changement des sites de fixation de HSF1 vers des régions génomiques plus enrichies en motif HSE. L'enrichissement en motif AP-1 plus élevé dans la condition contrôle comparé au motif HSE est cependant surprenant.

### *HSF1 régule un programme transcriptionnel dans l'OS, différent de la réponse au stress*

Les résultats *in vitro* et *in vivo* indiquent que HSF1 est capable de réguler plusieurs processus cellulaires dont le cycle, la prolifération, la migration ou la mort cellulaire. Ces effets pléiotropiques sont certainement liés à un réseau transcriptionnel vaste. Afin donc d'identifier les gènes et les fonctions régulées par HSF1 dans l'OS, un RNA-sequencing a été effectué. Quatre conditions en triplicats ont été réalisées dans cette expérience : Des cellules HOS-MNNG non transduites (NI), transduites avec un shARN contrôle (shCt) ou transduites avec le shHSF1. À cela s'ajoute une condition HOS-MNNG heat-shock (1h à 43°C puis 1h à 37°C). Une fois que les nombres de reads s'alignant à chaque gène a été obtenu grâce à l'outil feature counts, comme détaillé dans la partie matériels et méthodes, le package R DESEQ2 a été utilisé pour normaliser ces comptages. Cette normalisation permet notamment de prendre en compte les différences en matériel biologique de départ (nombre de cellules, ARNm etc.). Les valeurs obtenues correspondent aux quantités d'ARNm et donc au niveau de l'activité transcriptionnelle de chaque gène dans les différents réplicats et conditions. L'effet des transductions sur le niveau d'expression en ARNm de HSF1 a d'abord été évalué. La Figure 39 représente les niveaux d'expression de HSF1 dans les 4 conditions. L'expression

de HSF1 est diminuée de 60% dans la condition shHSF1 comparée à la condition shCt et le HS ne modifie pas l'expression de HSF1.

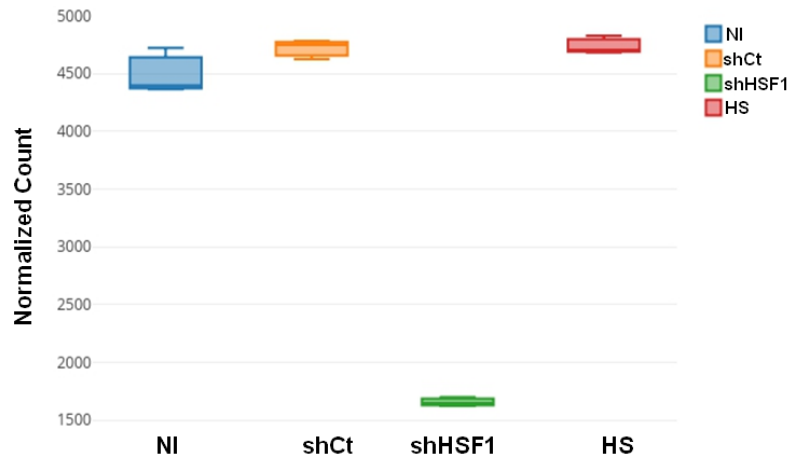


Figure 39 : Expression transcriptionnelle de HSF1 dans les conditions NI, shCt, shHSF1 et HS obtenue par RNA-sequencing, et exprimée en nombre de reads normalisé dans les cellules HOS-MNNG.

Le package DESEQ2 a été ensuite utilisé pour déterminer les gènes différentiellement exprimés entre les conditions. Les gènes considérés comme étant différentiellement exprimés ont un fold-change au dessus de 1,6 et un FDR (false discovery rate) inférieur à 5 %. Une première comparaison des gènes différentiellement exprimés a été faite entre les conditions NI et shCt afin d'estimer l'effet de la transduction sur le transcriptome. Aucun gène n'est différentiellement exprimé entre les conditions NI et shCt. La même comparaison entre les conditions HS et NI donne 1667 gènes diminués et 1680 augmentés dans leur quantité d'ARNm lors d'un choc thermique. Entre les conditions shHSF1 et shCt, 551 gènes sont significativement diminués et 1182 gènes sont significativement augmentés lors de la transduction par shHSF1. La figure 40 représente une heatmap des gènes différentiellement exprimés entre les conditions shHSF1 et shCt.



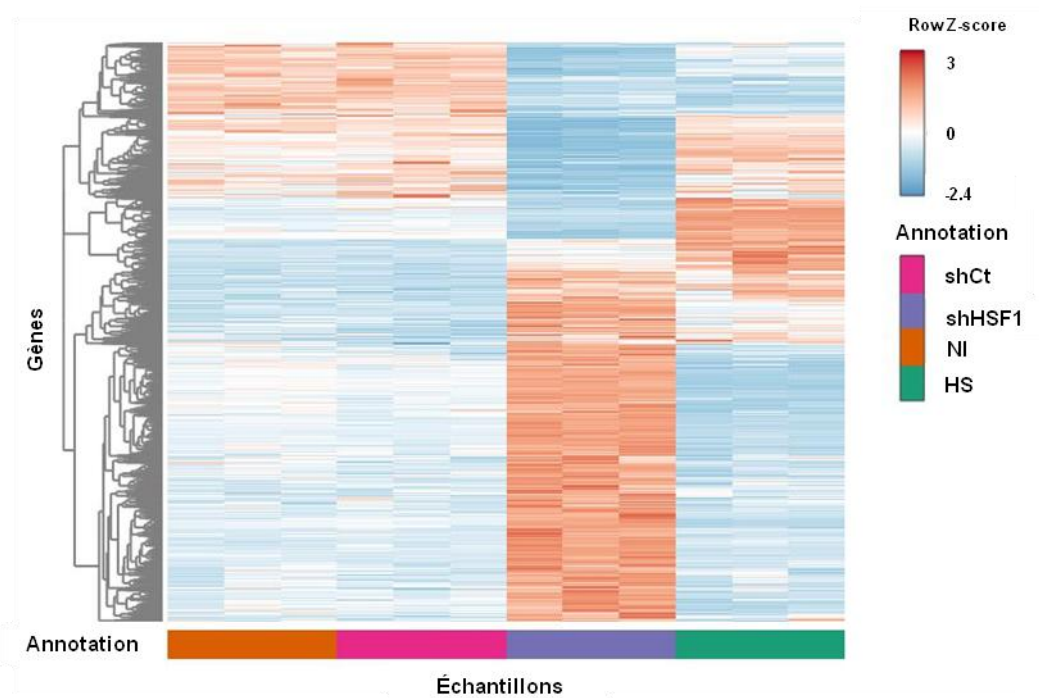


Figure 40: Heatmap des gènes différentiellement exprimés entre les conditions shHSF1 et shCt du RNA-sequencing (p-value ajustée inférieure ou égale à 0,05 ; fold-change > 1,6).

Afin de définir les fonctions négativement impactées par l'inhibition de HSF1, un test de sur-représentation a été effectué sur les gènes significativement diminués par le shHSF1. Ce test consiste à déterminer si des fonctions (obtenues de la base de données Reactome Pathway Database) sont statistiquement sur-représentées dans une liste de gènes donnés. La liste étudiée ici contient donc les gènes sous-exprimés dans la condition shHSF1 comparé à la condition shCt du RNA-sequencing, avec un fold-change en log2 de -0,7 minimum, et une p-value ajustée inférieure ou égale à 0,05. Le test de sur-représentation nous indique donc quelles sont les fonctions les plus inhibées (en termes de nombre de gènes) par le shHSF1 comparativement à la condition shCt, et donc les fonctions que HSF1 régule positivement dans les cellules HOS-MNNG. Toutes les fonctions représentées figure 41 ont une p-value ajustée inférieure ou égale à 0,05. La fonction la plus impactée par le shHSF1 (en termes de nombre de gènes) est la réponse au stress cellulaire. Cette fonction étant la fonction classique de HSF1, sa présence n'est pas surprenante et indique que même en absence de choc thermique, les gènes de la réponse au stress sont accessibles et régulés par HSF1 dans l'OS. La deuxième fonction la plus représentée dans la liste des gènes inhibés par le shHSF1

est la voie de signalisation des MAPK. Cette voie est mutée dans environ 30% des cancers (Fernández-Medarde and Santos, 2011; Naidu and Dinkova-Kostova, 2017). Elle est notamment impliquée dans la prolifération des cellules tumorales, l'apoptose, la différenciation... Après la réponse au stress et la voies des MAPK, les six fonctions cellulaires les plus représentées sont des fonctions liées au cycle cellulaire, sa régulation, et la transition entre différentes phases du cycle (exemples de fonctions : Mitotic prometaphase, mitotic G1-G1/S phases, Mitotic G2-G2M phases, G2/M transition, S phase...). HSF1 régule également des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN (DNA replication Pre initiation, Activation of the pre-replicative complex).

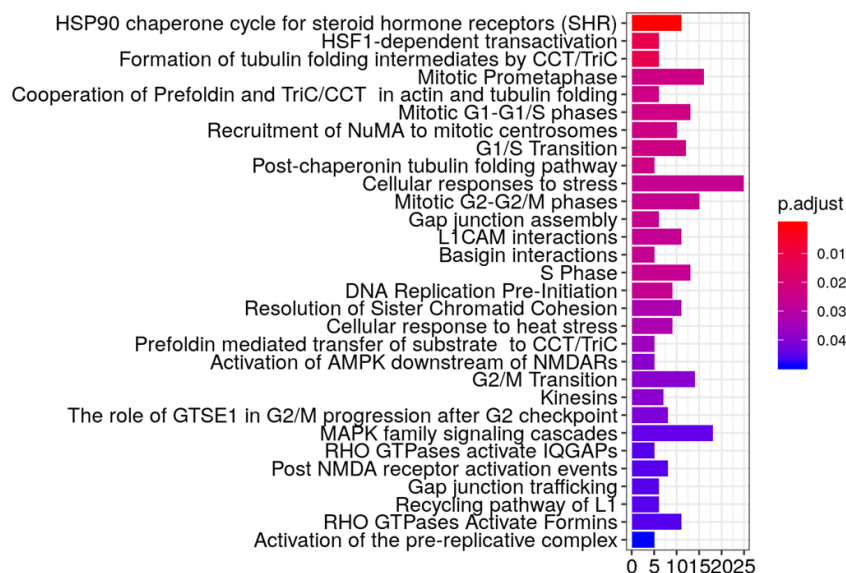
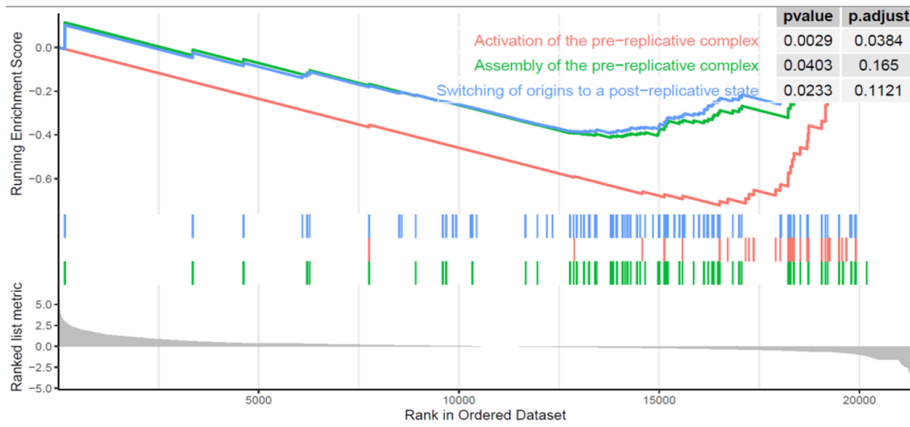
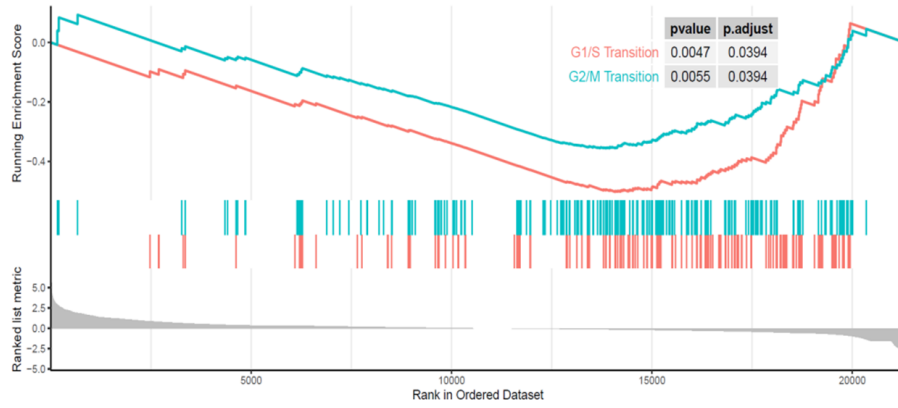
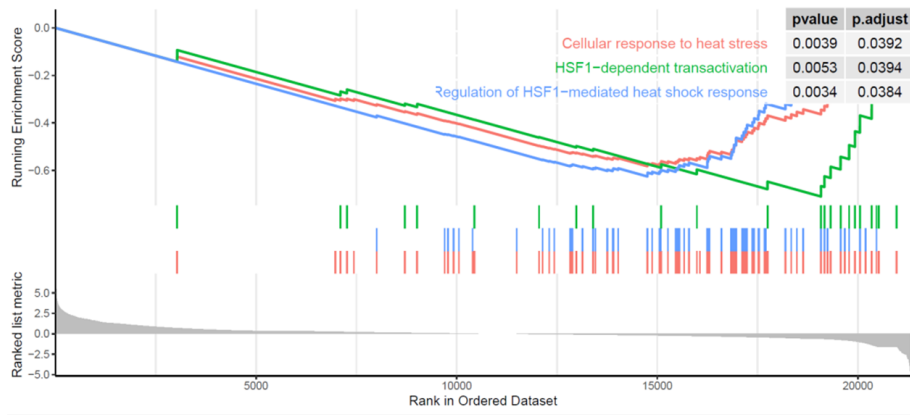


Figure 41: HSF1 régule de nombreuses fonctions cellulaires pouvant supporter la malignité. La liste des gènes inhibés par le shHSF1 ( $\log_2$  de fold-change  $\leq -0,7$ ) a été analysée afin de définir les fonctions sur-représentées après inhibition de HSF1.

Afin de confirmer les résultats du test de sur-représentation, une autre méthode d'analyse a été réalisée. Le GSEA (Gene-set enrichment analysis) (Subramanian et al., 2005) classe des gènes dans des gene-sets, des fonctions ou des groupes de gènes définis à partir des données de la littérature. À chaque gene-set est ensuite attribué un score appelé NES (normalized enrichment score) qui illustre dans notre expérience l'impact de l'inhibition de HSF1 sur le gene-set et prend en compte le fold-change des gènes individuels le composant. Ainsi, un gene-set avec un score NES négatif indique que les gènes composants ce gene-set ont majoritairement une expression diminuée dans la condition shHSF1 comparé à la

condition shCt. Plus le NES est élevé en valeur absolue, plus l'impact du shHSF1 est important. Une liste non exhaustive des gene-sets inhibés par le shHSF1 est disponible en annexe (Tableau XII), mais quelques exemples sont visibles ci-après (Figure 42).



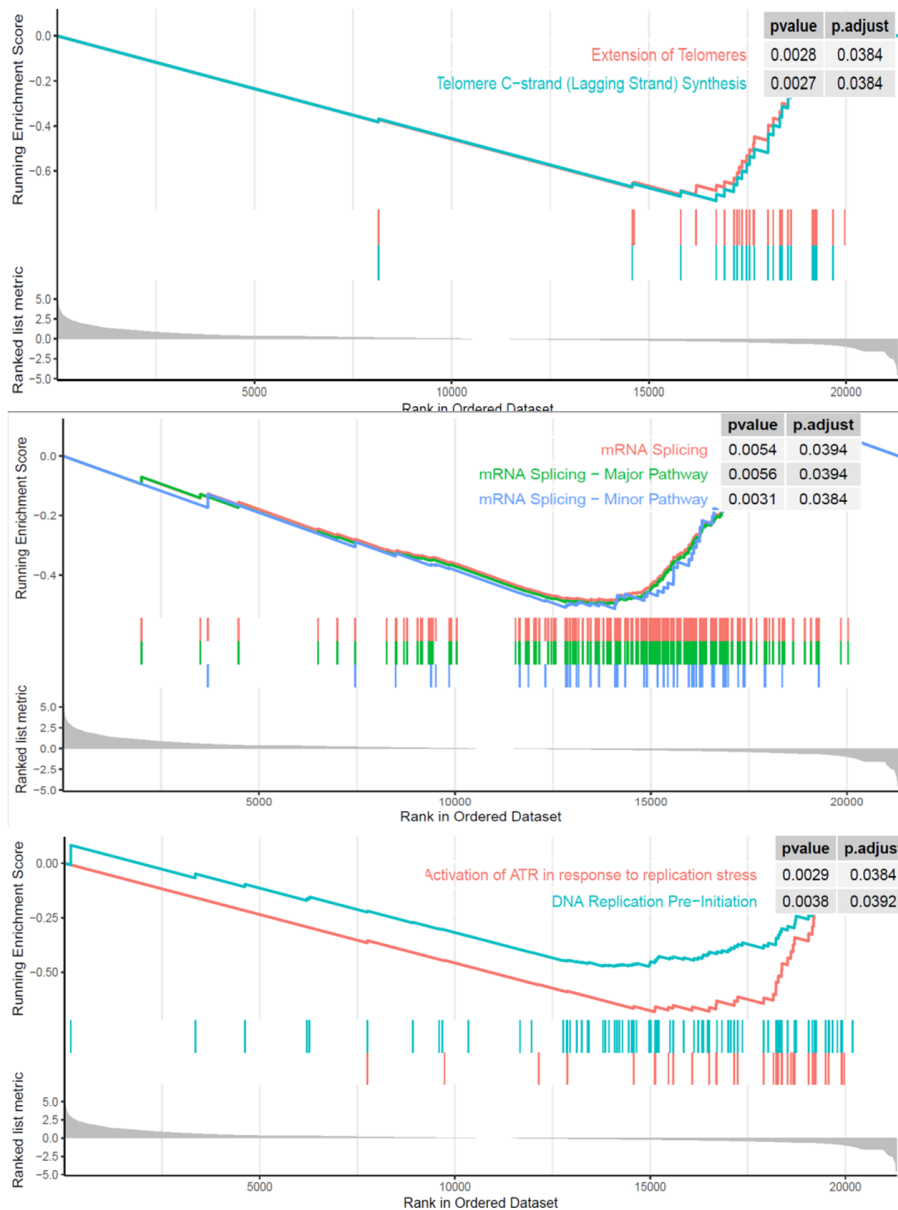


Figure 42 : Analyse GSEA sur les fold-changes de l'expression des gènes entre les conditions shHSF1 et shCt. Les gene-sets présentés ont un NES (Normalized enrichment score) négatif, et sont donc inhibés dans la condition shHSF1 comparé à la condition shCt. Le seuil de significativité statistique est fixé à une pvalue ajustée de 0,05.

Nous retrouvons des gene-sets associés au stress cellulaire tel que le gene-set Regulation of HSF1-mediated heat-shock response (NES= -2,19 ; p-value ajustée = 0,03). Mais le gene-set avec le score le plus petit (NES = -2,31 ; p-value ajustée 0,03) est DNA strand elongation gene-set composé de gènes impliqués dans la réplication. Il est suivi en troisième position du gene-set Activation of the pre-replicative complex (NES = -2,16 ; p-value ajustée = 0,03). Le gene-set lagging strand synthesis (NES = -2,04 ; p-value ajustée 0,03) est également en lien

avec la réplication et est constitué de gènes impliqués dans la synthèse du brin tardif (lagging strand) de l'ADN, lors de la réplication. Il y a également les gene-sets DNA replication (NES = -1,96 ; p-value ajustée = 0,03) et sumoylation of DNA replication proteins (NES = -1,95 ; p-value ajustée = 0,03).

La régulation de la progression du cycle cellulaire est également une fonction qui ressort du GSEA. Il s'agit donc de nouveau d'une confirmation des résultats de l'analyse de sur-représentation. Il s'agit par exemple des gene-sets G1/S transition (-1,97 ; 0,03), mitotic G1-G1/S phases (-1,95 ; 0,03), S phase (-1,81 ; 0,04), G2/M transition (-1,46 ; 0,04), cell cycle checkpoints (-1,32 ; 0,04), Mitotic Spindle Checkpoint (-1,98 ; 0,03)...

De manière intéressante, les gene-sets extension of telomeres (-2,11 ; p-value ajustée 0,03) et Telomere C-strand (Lagging Strand) Synthesis (-2,06 ; p-value ajusté 0,03) sont inhibés par le shHSF1. HSF1 régulerait donc positivement l'élongation des télomères, un processus associé à l'immortalisation des cellules et aux cancers (Ennour-Idrissi et al., 2017; Heaphy et al., 2011; Ma et al., 2017; Smogorzewska and de Lange, 2004).

D'autres fonctions inhibées avec le shHSF1 (donc activées par HSF1) incluent le transport et la maturation des ARNm ou la traduction. En réduisant la stringence de l'analyse (en incluant les gene-sets avec une p-value ajustée inférieure ou égale à 0,1), d'autres gene-sets moins significatifs viennent confirmer que HSF1 régule positivement le cycle cellulaire, la traduction, la réparation de l'ADN, mais également la glycolyse (-1,43 ; 0,09). Une liste non exhaustive des gene-sets régulés par HSF1 (organisés par fonctions) est disponible dans le Tableau XII.

Ainsi les résultats du GSEA et du test de sur-représentation corrélient et montrent que dans l'OS, HSF1 régule de nombreuses fonctions cellulaires pouvant soutenir la malignité.

### *Identification des partenaires protéiques de HSF1*

Comme abordé dans l'introduction de la partie I, les partenaires protéiques de HSF1 seraient en partie responsables de la régulation de son activité biologique. Ils pourraient expliquer les fonctions pléiotropiques du facteur de transcription. Et comme proposé plus haut, il est

possible que l'interaction de HSF1 avec un partenaire protéique quelconque soit à l'origine des résultats de CHIP-sequencing et de l'apparente capacité de HSF1 à fixer des motifs très différents du motif HSE. Si les cofacteurs régulent la fixation de HSF1 sur l'ADN, ils pourraient changer en fonction des situations (stress ou malignité). Afin donc d'identifier ces cofacteurs dans l'OS, un RIME (rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous protein) a été effectué. Le RIME est une technique qui combine l'immunoprécipitation avec la spectrométrie de masse pour identifier les partenaires d'une protéine spécifique, HSF1 en l'occurrence (Figure 43). L'isolement du nucléoplasme implique que les interactions identifiées sont uniquement nucléaires, et donc théoriquement les protéines sont liées à l'ADN.

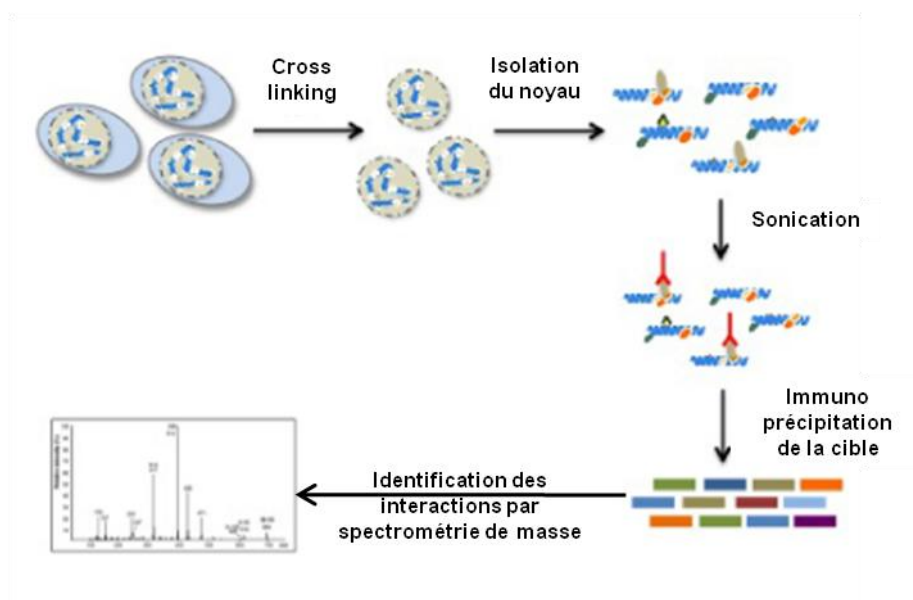


Figure 43 : Principe du RIME (Rapid Immunoprecipitation Mass Spectrometry of Endogenous proteins). Un cross-linking est réalisé afin de fixer les interactions moléculaires, puis le noyau est isolé. Une sonication de l'ADN est ensuite effectuée, suivie de l'immunoprécipitation des complexes associés à la protéine d'intérêt (HSF1). Enfin, les protéines sont identifiées par spectrométrie de masse. Activemotif.com.

Le RIME a été réalisé dans des cellules HOS-MNNG normales, non modifiées. 903 protéines ont été dénombrées en tant que partenaires potentiels de HSF1 (direct ou indirect via des multicomplexes). Un tri a été effectué afin d'éliminer les faux positifs : les protéines immunoprécipitées avec une immunoglobuline contrôle, ou les faux positifs d'études précédentes, référencées sur les bases de données (CRAPome pour contaminant repository for affinity purification) (Mellacheruvu et al., 2013). Après le tri, 333 partenaires potentiels de HSF1 ont été identifiés. Sept ont été choisies en fonction de leurs rôles dans les pathologies osseuses ou tumorales. Il s'agit de :

- SMC1A (structural maintenance of chromosomes 1A, sub-unit of the cohesin multiprotein complex), sous-unité du cohesin multiprotein complex qui joue un rôle important dans la régulation de la transcription, la condensation de l'ADN durant la réplication et la séparation des chromatides sœurs (Losada and Hirano, 2005). La surexpression de SMC1A est liée au développement du glioblastome, du cancer du colon, du poumon et de la prostate. Cette surexpression est facteur de mauvais pronostic dans le cancer (Jin Li et al., 2016; Pan et al., 2016; P. Zhou et al., 2017).
- ZMYND8 : zinc finger MYND-type containing 8 est une sous-unité du complexe transcriptionnel Z3. Ce complexe serait un « reader » des modifications d'histones. ZMYND8 possède une région PHD (plant homeodomain) et un bromodomaine. Les deux sont impliqués dans la reconnaissance du marqueur H3K4me1-H3K14ac lié à la repression de l'expression des gènes connus comme inducteurs des métastases (Basu et al., 2017; Na Li et al., 2016).
- ZNF687 : zinc finger protein 687 fait partie des facteurs de transcription à doigt de zinc. ZNF687 est également une sous-unité du complexe transcriptionnel Z3 (avec ZMYND8). Il promeut la prolifération tumorale dans le carcinome hépatocellulaire. ZNF687 semble également être impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules osseuses et dans leur différenciation. Il est surexprimé durant l'ostéoblastogénèse et muté dans la maladie de Paget (Divisato et al., 2018, 2016; Zhang et al., 2017).



- MSH2 : MutS protein homolog 2, impliquée dans la réparation de l'ADN et plus précisément les mismatch repair (MMR). MSH2 est un gène suppresseur de tumeur muté dans plusieurs cancers dont le cancer de la prostate ou le cancer colorectal cancer (Arshita et al., 2018; Guedes et al., 2017; Humbert et al., 2003, p. 2; Joost et al., 2015).
- HDAC 2 : Histone deacetylase 2, fait partie de la classe I des histones déacetylases. Il est surexprimé et facteur de mauvais pronostic dans le cancer du rein et est impliqué dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses rénales (Kobayashi et al., 2017; Q. D. Mao et al., 2017; Stojanovic et al., 2017; Zhao et al., 2016, p. 2).
- NACA : nascent polypeptide associated complex subunit alpha, est une sous-unité de du complexe nascent polypeptide associated. Comme son nom l'indique, ce complexe lie et protège les peptides naissants à la sortie du ribosome. En plus de ce rôle, NACA est également décrit comme cofacteur transcriptionnel de l'oncogène AP-1 notamment dans les ostéoblastes (Lopez et al., 2005; Moreau et al., 1998; Yotov et al., 1998).
- TRIM33 : Il est Décrit comme étant une ubiquitine ligase E3 de la famille des "TRi partite Motif". Même s'il est souvent cité comme suppresseur de tumeur (tel que dans la leucémie myélomonocytaire chronique), TRIM33 interagit avec smad1 et 5 dans la voie des BMP, et est essentiel à la prolifération et la différenciation ostéoblastique (Guo et al., 2017, p. 33; Shi et al., 2016, p. 33).

L'expression transcriptionnelle de ces partenaires a tout d'abord été évaluée par qPCR, dans 5 lignées d'OS, et comparée à celle de cellules souches mésenchymateuses (Figure 44). Comme HSF1, les 7 partenaires testés sont également surexprimés dans les lignées d'OS testées, comparativement au contrôle hMSC. De plus, il existe des similitudes entre l'expression de HSF1 et celle de ses partenaires potentiels. En effet ces résultats, montrent une forte expression des partenaires dans les lignées SJSA-1, U2OS et KHOS, et une expression faible dans la lignée MG63. Ces similitudes d'expressions pourraient laisser penser que les mécanismes responsables de la surexpression de HSF1 dans l'OS sont également responsables de la surexpression de ses partenaires potentiels identifiés par RIME.

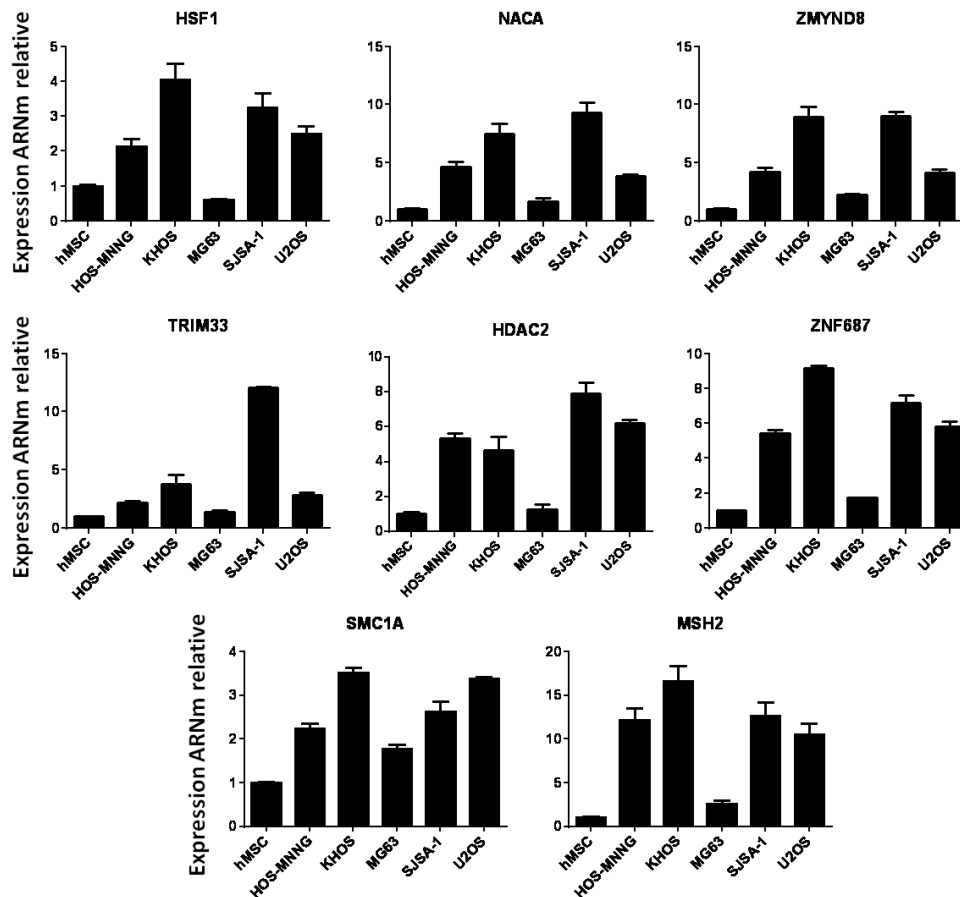


Figure 44 : Les partenaires potentiels de HSF1 identifiés par RIME (NACA, ZMYND8, TRIM33, HDAC2, ZNF687, SMC1A et MSH2) sont surexprimés dans des lignées cellulaires d'OS. L'expression transcriptionnelle de HSF1 et de ses partenaires a été évaluée par qPCR dans les lignées HOS-MNNG, KHOS, MG63, SJS-A-1, U2OS et comparée à une population de cellules souches mésenchymateuses (hMSC).

Afin d'identifier la localisation sub-cellulaire des partenaires potentiels de HSF1, une immunofluorescence a été réalisée dans la lignée HOS-MNNG (Figure 45). Tous partenaires potentiels possèdent une localisation majoritairement nucléaire, à l'exception de ZNF687 qui semble être majoritairement cytoplasmique.

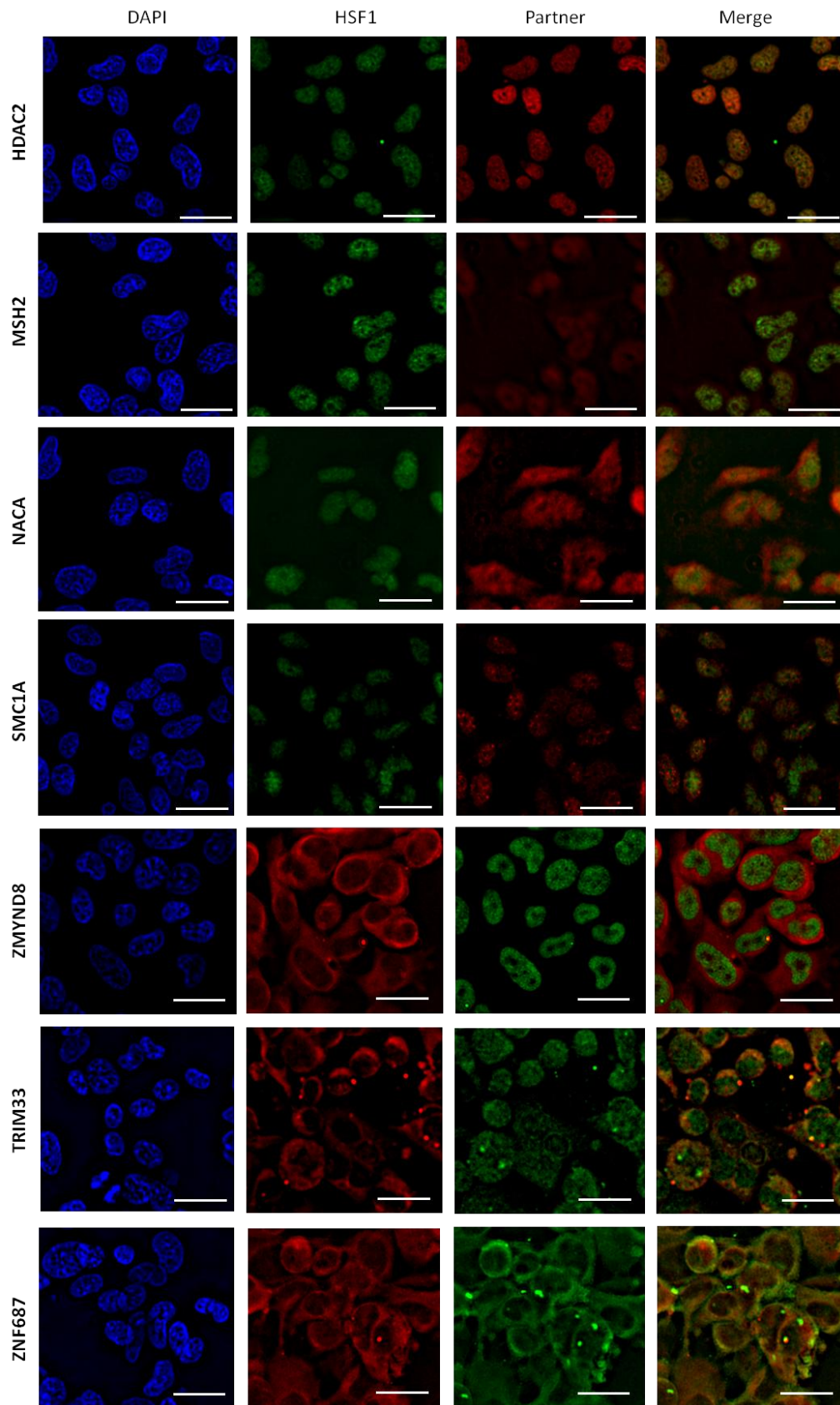


Figure 45 : Marquage de HSF1 et de ses partenaires potentiels par immunofluorescence. Les cellules HOS-MNNG ont été fixées au méthanol et marquées par immunofluorescence (voir la liste des anticorps utilisés dans le matériels et méthodes). La barre d'échelle représente 25µm.

Cependant, une même localisation subcellulaire ne constitue pas une preuve d'interaction. C'est pourquoi, afin de confirmer le RIME, des expériences de proximity ligation assay et de co-immunoprécipitation endogène ont été réalisées. Les résultats obtenus pour le moment ne concernent que HSF1 et TRIM33. L'intérêt de TRIM33 porte notamment sur son implication démontrée dans la différenciation ostéoblastique.

La proximity ligation assay est une technique d'immunofluorescence permettant de démontrer comme son nom l'indique, la proximité entre deux protéines. Pour cela, deux protéines sont marquées par des anticorps primaires et secondaires. Quand ces derniers sont situés à moins de 40nm l'une de l'autre ils produisent une ponctuation lumineuse, rouge, visible avec un microscope à fluorescence. Les résultats (Figure 46) montrent plus de ponctuations lumineuses dans la condition expérimentale (anticorps HSF1 et TRIM33 associés aux anticorps secondaires) comparé à la condition contrôle (anticorps secondaires seuls). Ces ponctuations sont visibles dans le noyau et dans le cytoplasme, et indiquent donc une forte proximité de HSF1 et TRIM33 dans la cellule.

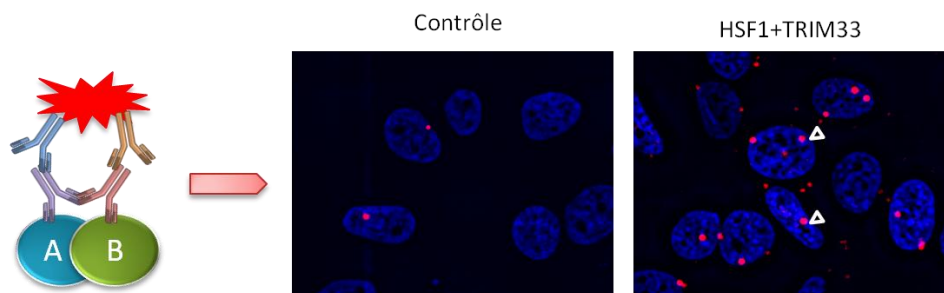


Figure 46 : HSF1 et TRIM33 sont proches dans les cellules HOS-MNNG. La PLA (Proximity ligation assay) a été réalisée dans des cellules HOS-MNNG marquées avec les anticorps secondaires seuls (la condition « control ») ou avec les anticorps primaires spécifiques de HSF1 ou TRIM33, associés à des anticorps secondaires. Les flèches indiquent les ponctuations. Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu). La barre d'échelle correspond à 10µm.

Afin de confirmer ces résultats, une expérimentation de co-immunoprécipitation a été réalisée dans des conditions endogènes (sans surexpression des partenaires). HSF1 a été immunoprécipité avec un anticorps reconnaissant sa forme totale ou sa forme phosphorylée sur la sérine 326 (pHSF1 S326) (Figure 49). La bande correspondant à TRIM33 apparaît dans

l'input et après immunoprécipitation avec les anticorps HSF1 ou pHSF1, mais pas avec l'anticorps contrôle igG.

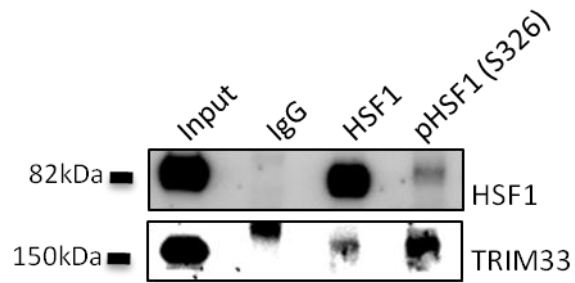


Figure 47 : HSF1 intègre avec TRIM33 *in vitro*. L'immunoprécipitation a été réalisée avec un anticorps reconnaissant la forme totale de HSF1 ou sa forme phosphorylée sur la sérine 326 (pHSF1 S326). La révélation a été effectuée par western blot avec les anticorps HSF1 ou TRIM33. La condition input correspond au lysat protéique total et la condition IgG correspond à une immunoprécipitation avec un anticorps contrôle isotypique.

## DISCUSSION PARTIE I

Le facteur de transcription HSF1 été décrit comme étant impliqué dans plusieurs processus potentiellement tumoraux tels que la prolifération, le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'apoptose, en plus de son implication dans la réponse au stress (Dai et al., 2007; Dai and Sampson, 2016; Kijima et al., 2019, 2018; Mendillo et al., 2012b). Le rôle de pro-oncogénique de HSF1 dans les cancers est dû à une surexpression du facteur de transcription dans la cellule tumorale et un détournement de sa fonction physiologique.

Il a été montré que HSF1 est surexprimé dans plusieurs cancers (cancers du sein, du poumon, de l'estomac, du foie, du pancréas...) (Fang et al., 2012; Kim et al., 2018; Liang et al., 2017; Mendillo et al., 2012a, 2012b; Scherz-Shouval et al., 2014), nos résultats indiquent que HSF1 est également surexprimé dans l'OS, dans les lignées cellulaires tumorales et dans des biopsies provenant de patients. Ces résultats corrélerent avec notre analyse de l'expression transcriptionnelle de HSF1 à partir des données du RNA-sequencing réalisé par Ho et al., montrant que l'expression de HSF1 est en moyenne plus élevée dans les tumeurs d'OS que dans les tissus sains environnants d'un même patient (Ho et al., 2017). Comme c'est le cas dans le cancer du sein ou du pancréas par exemple (Kim et al., 2018; Santagata et al., 2011), la surexpression de HSF1 dans l'OS est facteur de mauvais pronostic comme le montrent notre analyse à partir des données de Kuijjer et al. disponibles sur la base de données R2 genomics analysis (Kuijjer et al., 2012).

Nos analyses d'immunohistochimie montrent également que HSF1 est majoritairement nucléaire et phosphorylé sur la sérine 326 dans des biopsies de patients atteints d'OS, ainsi que dans un modèle murin de la maladie. Zhou et al. ont également démontré un marquage nucléaire de HSF1 dans leur modèle murin d'OS obtenu par injection de cellules HOS-MNNG en sous-cutanée. HSF1 est majoritairement nucléaire dans d'autres types de cancers, tels que les cancers du sein, du colon, du pancréas, du poumon, de la prostate, de l'utérus... (Dai et al., 2012; Liang et al., 2017; Mendillo et al., 2012b; Santagata et al., 2013, 2011). La localisation nucléaire de HSF1 dans ces cancers, aussi bien dans des modèles précliniques que dans des biopsies humaines, indique que ces cellules sont soumises à un stress

permanent, et semble mettre en évidence un rôle important de HSF1 dans ces cellules tumorales.

En corrélation avec cette hypothèse, et en utilisant des outils d'ARN interférence (siARN et shARN), nous avons montré que l'inhibition de HSF1 réduit la prolifération cellulaire *in vitro*, confirmant les données de la littérature. En effet, Zhou et al. ont démontré que l'inhibition de HSF1 par siARN réduit la prolifération des cellules HOS-MNNG et U2OS, mais également que la surexpression de HSF1 dans ces cellules augmente la prolifération cellulaire (Z. Zhou et al., 2017). Il a également été décrit que l'inhibition de HSF1 par ARN interférence réduit la prolifération des cellules du cancer du sein, du colon, du foie ou du mélanome... (Dai et al., 2012; Liang et al., 2017; Nakamura et al., 2014, 2010; Santagata et al., 2013, 2011). Nous trouvons une explication à ces résultats dans nos données RNA-sequencing. En effet, les analyses de sur-représentation et GSEA ont déterminé que, HSF1 régule plusieurs processus cellulaires liés à la prolifération. L'analyse de sur-représentation montre par exemple que HSF1 régule positivement la voie des MAPK, une voie notamment impliquée dans la prolifération cellulaire (X. Li et al., 2017; Liu and Chen, 2015). L'analyse d'enrichissement des gene-sets montre que HSF1 régule la traduction, la maturation ou le transport des ARNm, processus biologiques supportant la prolifération. En effet, dans les cellules la synthèse protéique corrèle avec la vitesse de prolifération. Ainsi l'augmentation de la traduction est caractéristique des pathologies qui comme les cancers, présentent une forte prolifération cellulaire (Morita et al., 2015; Ruggero, 2013; Silvera et al., 2010). L'inhibition de la synthèse des effecteurs protéiques via l'inhibition de HSF1 aurait donc un impact négatif sur la prolifération des cellules tumorales. Nos résultats de RNA-sequencing corrélerent avec les résultats de la littérature. Mendillo et al. ont en effet montré par ChIP-sequencing et RNA-sequencing que dans le cancer du sein HSF1 régule positivement la traduction ainsi que la maturation des ARNm (Mendillo et al., 2012b). Une expérience de RNA-sequencing menée par Page et al. confirme que HSF1 régule la transcription et la maturation des ARNm dans des cellules HeLa (cancer du col de l'utérus) (Page et al., 2006). Ce phénomène semble donc être commun à plusieurs types de cancers. De plus, nos résultats de RNA-sequencing révèlent également une implication de HSF1 dans la réplication de l'ADN et dans l'élongation des télomères. En activant la réplication et le rallongement des télomères, HSF1 pourrait

permettre une prolifération accélérée et éternelle de cellules tumorales (Ennour-Idrissi et al., 2017; Heaphy et al., 2011; Ma et al., 2017).

Nous avons montré que l'inhibition de HSF1 par shARN bloque les cellules HOS-MNNG en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Il est décrit dans la littérature que l'inhibition de HSF1 par ARN interférence bloque les cellules en phase G0/G1 dans le mélanome ou dans le cancer du pancréas (Liang et al., 2017; Nakamura et al., 2010). Ces résultats s'expliquent de nouveau par les gènes régulés par HSF1 et identifiés par RNA-sequencing. Nous savons en effet que HSF1 régule un groupe de gènes participant à la progression du cycle, tels que CDC6, et CKS1B (Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1), et notamment la transition de la phase G1 vers la phase S, ce qui expliquerait le blocage en G0/G1. Dans les études de Mendillo et al. et Page et al., HSF1 est décrit comme un activateur des gènes de la mitose, notamment CDC6 ou CKS1B, gènes également retrouvés dans nos analyses (Mendillo et al., 2012b; Page et al., 2006). De plus, nos résultats indiquent que HSF1 régule la réplication (par exemple : TICRR (TOPBP1 interacting checkpoint and replication regulator), ou POLA2 (DNA polymerase alpha 2, accessory subunit)). Le blocage en phase G0/G1 après inhibition de HSF1 pourrait partiellement s'expliquer par une inhibition de la réplication de l'ADN en phase S.

Nous avons également observé que HSF1 régule positivement des gene-sets associés aux checkpoints du cycle cellulaire, dont le checkpoint empêchant l'aneuploïdie (point de contrôle du fuseau mitotique). Ce résultat indiquerait que HSF1 pourrait inhiber la progression du cycle cellulaire en cas d'erreur, notamment en cas de mauvaise ségrégation des chromosomes. Il a été montré que des cellules déficientes en HSF1 échouaient à stopper leur cycle cellulaire suite à une irradiation ou un traitement par le cisplatine (Chang et al., 2012; Li and Martinez, 2011). Or, cet arrêt du cycle cellulaire est nécessaire à la réparation de l'ADN, un processus également régulé par HSF1 comme le montrent notre expérience RNA-sequencing, ainsi que les études de Mendillo et al. et de Page et al. (Mendillo et al., 2012b; Page et al., 2006). L'arrêt du cycle cellulaire par HSF1 pourrait, dans certains cas, être bénéfique pour la cellule tumorale. En effet, les mutations de l'ADN peuvent être à l'origine de tumeurs, mais un nombre important de mutations pourrait au contraire submerger les voies de réparation de l'ADN. C'est le principe des traitements mutagènes tels que la radiothérapie, le cisplatine, l'ifosfamide, les inhibiteurs de PARP (exemple du olaparib utilisé



dans le traitement des cancers de l'ovaire et du sein)... (O'Connor, 2015). L'arrêt du cycle cellulaire permet donc d'initier la réparation de l'ADN et d'éviter la mort de la cellule tumorale.

Les résultats de la littérature indiquent que HSF1 inhibe la mort cellulaire par apoptose (Mendillo et al., 2012b; Page et al., 2006). Nous avons effectivement observé que l'inhibition de HSF1 induit la mort cellulaire dans l'OS, en accord avec la littérature dans d'autres cancers (Liang et al., 2017; Nakamura et al., 2010). Notre analyse GSEA ne détecte cependant pas de gene-sets en rapport direct avec l'apoptose. Une analyse des gènes individuellement est nécessaire afin d'identifier les gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose observée *in vitro*. Toutefois, notre analyse GSEA révèle que HSF1 inhibe la sénescence dans les cellules d'OS (gene-set Cellular Senescence, DNA Damage/Telomere Stress Induced Senescence ou Oxidative Stress Induced Senescence).

En accord avec nos résultats *in vitro*, l'inhibition de HSF1 réduit significativement la croissance tumorale *in vivo* dans notre modèle préclinique d'OS. D'autres études ont décrit une réduction de la croissance tumorale après inhibition de HSF1 dans différents cancers (Liang et al., 2017; Nakamura et al., 2014). Nos résultats sont confortés par l'étude de Zhou et al., montrant que la surexpression de HSF1 accélère la croissance tumorale dans un modèle murin d'OS. Il faut noter que dans des résultats non publiés du laboratoire, nous avons également constaté que la surexpression de HSF1 dans des cellules A673 de sarcome d'Ewing augmente la croissance tumorale dans un modèle murin (Figure 48).

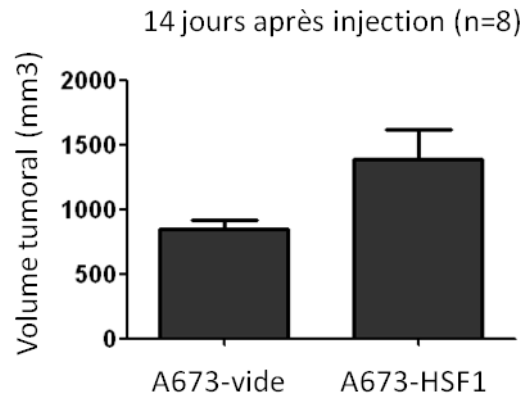


Figure 48 : La surexpression de HSF1 augmente la croissance tumorale dans un modèle murin de sarcome d'Ewing. Des cellules de la lignée A673 de sarcome d'Ewing ont été transfectées avec une séquence codant pour HSF1 ou un transgène contrôle. Ces cellules ont ensuite été injectées à des souris réparties en deux groupes (N=8). Le volume de la tumeur a été évalué à 14 jours. Résultats non publiés.

Il est décrit que la surexpression de HSF1 dans le cancer du sein induit le phénotype CSC (cancer stem cell). L'inhibition de HSF1 réduit en effet l'expression de certains marqueurs de ce phénotype (CD166, CD326, CD133 et Nanog) et diminue la formation de sphéroïdes, alors que la surexpression de HSF1 augmente la formation de sphéroïdes et confère une résistance à l'agent anticancéreux taxol (Karsten and Goletz, 2013; Kim and Ryu, 2017; B. Wang et al., 2015). Zhou et al. n'ont cependant pas observé d'augmentation de la formation de sphéroïdes après surexpression de HSF1 dans des cellules HOS-MNNG. Il semblerait donc que HSF1 ne soit pas lié à la formation de CSC dans l'OS. Il serait cependant intéressant de confirmer ces résultats dans notre étude, notamment en utilisant d'autres lignées d'OS.

De manière intéressante, l'inhibition de HSF1 par siARN ou shARN réduit la migration cellulaire dans notre étude, dans les lignées HOS-MNNG et U2OS. Des analyses sont en cours, afin de déterminer si l'inhibition de HSF1 *in vivo* réduit le nombre de métastases pulmonaires. Zhou et al. ont décrit que l'inhibition de HSF1 réduit la migration cellulaire et sa surexpression induit une augmentation de l'invasion et de la migration (Z. Zhou et al., 2017). De même, dans les cancers du pancréas, du foie et le mélanome, l'inhibition de HSF1 réduit la migration cellulaire (Fang et al., 2012; Kim et al., 2018; Nakamura et al., 2014; Toma-Jonik et al., 2015). Notre analyse GSEA montre que HSF1 régule négativement des gene-sets liés à la dégradation de la matrice (gene-set Collagen degradation, degradation of the extracellular

matrix, exemple du gène MMP2), mais également des gènes liés à la formation de la matrice extracellulaire (Collagen chain trimerization, Collagen biosynthesis and modifying enzymes, collagen formation). Des analyses plus poussées devront être menées afin de comprendre quels sont les gènes responsables des effets pro-migratoires de HSF1 identifiés *in vitro*.

Les résultats de notre étude indiquent que la fixation de HSF1 dans les cellules HOS-MNNG normales est différente de sa fixation dans des cellules HOS-MNNG soumises à un stress thermique. En effet, environ 40% des pics de fixation sont conservés entre les deux conditions. Cela implique que HSF1 régule des gènes et des fonctions biologiques différentes dans les conditions Ct et HS. Mendillo et al. ont montré dans le cancer du sein que plusieurs centaines de gènes fixés par HSF1 ne l'étaient que dans des conditions tumorales (Mendillo et al., 2012b). Il est cependant difficile dans notre modèle de savoir si la fixation de ces gènes est née de la malignité, compte tenu de l'absence de véritable contrôle cellule saine dans l'OS. Nous avons également montré que durant un stress thermique, HSF1 se fixe avec une intensité élevée à des motifs proches de sa séquence consensus (HSE). Mais en absence de stress thermique, HSF1 est fixé avec une affinité plus réduite sur des motifs appartenant aux membres des familles AP-1 ou ETS. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Mendillo et al. dans plusieurs lignées cancéreuses dont le cancer du sein, du poumon ou du colon. Leur analyse de motif place en effet la séquence HSE en tête des motifs les plus fixés par HSF1 dans les cellules tumorales soumises ou non à un choc thermique. Les auteurs observent bien un enrichissement du motif AP-1/NRF2, mais uniquement dans les gènes liés au stress thermique, et décrivent un fort enrichissement du motif YY1 (facteur de transcription Yin-Yang 1) dans les gènes de la malignité (Mendillo et al., 2012b). Dans notre étude, le motif YY1 est 153<sup>ème</sup> et 164<sup>ème</sup> dans les conditions Ct et stress thermique respectivement, d'après l'analyse HOMER. Il est probable que les différences observées dans les deux études soient dues à l'origine tissulaire des cellules tumorales utilisées, mais probablement également à des cofacteurs protéiques différents. Mendillo et al. suggèrent également un rôle des cofacteurs protéiques dans la reconnaissance par HSF1 de différents sites de fixation. De ce point de vue, la présence du motif AP-1/NRF2 dans la liste des motifs liés par HSF1 dans les deux études est particulièrement intéressante. En effet, ATF4, ATF6 (qui font partie de la famille des facteurs de transcription ATF) et NRF2 sont toutes les trois des protéines impliquées dans la réponse à différents stress. ATF4 et ATF6 participent ainsi à

l'UPR, tandis que NRF2 est le facteur de transcription régulant la réponse au stress oxydatif (Chan, 2014; Hybertson et al., 2011; Itoh et al., 2003; Xiong et al., 2015). Il est possible qu'il existe un cofacteur protéique impliqué dans le stress cellulaire interagissant avec les facteurs de transcription ATF (4 et 6), NRF2, mais aussi HSF1. Ce partenaire pourrait être responsable de la fixation de HSF1 sur des sites proches des sites ATF4, ATF6 et NRF2. Une comparaison des partenaires protéiques de ces facteurs de transcription permettrait de répondre à cette question.

Les résultats de notre expérience de CHIP-sequencing indiquent que certains pics de fixation de HSF1 sont spécifiques à la condition Ct, et d'autres à la condition stress thermique (environ 40% des pics seulement sont communs). Le stress thermique entraîne donc un déplacement de HSF1. La fixation *de novo* de HSF1 sur les pics spécifiques de la condition stress thermique est certainement due à la présence de motifs HSE, et à une plus forte affinité pour ces sites, comme le montre l'analyse de motifs. Pourquoi ces sites spécifiques de la condition stress thermique ne sont-ils pas fixés en absence de stress ? L'hypothèse la plus probable est que la fixation de HSF1 est inhibée par l'état de la chromatine, possiblement ouverte au niveau de ces nouvelles régions, uniquement après un stress thermique. Un CHIP-sequencing H3K27ac (histone 3 lysine 27 acétylée, marque d'ouverture de la chromatine) a été réalisé, et les résultats (en cours d'analyse) pourrait permettre de répondre à cette question.

Il est décrit que les partenaires protéiques de HSF1 régulent son activité. Ils pourraient expliquer sa fixation sur différents motifs avant ou après un HS. Dans notre étude, un RIME a été réalisé afin d'identifier les partenaires protéiques de HSF1 dans l'OS. Nous montrons que HSF1 est capable d'interagir avec plus de 300 protéines dont TRIM33. Dans la littérature, TRIM33/Tif1 $\gamma$  est majoritairement présenté comme une ubiquitine ligase agissant en tant que suppresseur de tumeur (Jingushi et al., 2015; Pommier et al., 2015; Shi et al., 2016, p. 33; Vincent et al., 2012, 2009; Xue et al., 2015). Il a notamment été montré que les cellules non tumorales déficientes en TRIM33 perdaient le point de contrôle du fuseau mitotique, ce qui induisait à court terme un arrêt de la prolifération mais à long terme une prolifération normale et une ploïdie anormale (Pommier et al., 2015). TRIM33 est cependant également décrit comme protéine pro-tumorale. En effet, son inhibition par shARN induit l'apoptose des cellules tumorales dans la leucémie aigue lymphoblastique (E. Wang et al., 2015).

Ainsi, le rôle de TRIM33 dans les cancers est variable. Sa fonction générale est également très différente d'une étude à l'autre. Il a été montré que TRIM33 peut réprimer la transcription médiée par le facteur de transcription PU.1 en interagissant avec ce dernier (Kusy et al., 2011). Cependant, TRIM33 interagit et active smad1/5, induisant la différenciation et la prolifération ostéoblastique (Guo et al., 2017). De plus, l'inhibition de TRIM33 induit un blocage des ostéoblastes en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Guo et al., 2017). Nous devons déterminer le rôle de l'interaction HSF1-TRIM33 dans l'OS. Cette interaction est-elle pro-tumorale ? Inhibe-t-elle la transcription médiée par HSF1 ? TRIM33 serait-il l'un des co-facteurs de HSF1 facilitant la fixation à l'ADN, y compris sur des sites autres que les HSE ?

De nombreuses zones d'ombre persistent mais nous avons montré l'implication de HSF1 dans des processus pro-tumoraux. Par des analyses bioinformatiques, nous avons également initié une cartographie du réseau transcriptionnel régulé par HSF1, que nous devons confirmer *in vitro*. Nous possédons quelques uns des outils qui permettraient de mieux comprendre le rôle de HSF1 dans l'OS. Toutefois, l'ensemble de nos données indique que l'inhibition de HSF1 pourrait être une stratégie thérapeutique potentielle dans le traitement l'OS. Les travaux présentés dans cette partie vont faire l'objet d'un article, avec l'auteur du présent manuscrit en premier auteur.

# INTRODUCTION PARTIE II : Ciblage de MTH1

## dans l'Ostéosarcome

### Rôle de MTH1 dans les cellules

Afin de se prémunir contre les effets des ROS sur l'ADN, les cellules peuvent avoir recours au mécanisme de BER (Base excision repair) permettant la réparation de l'ADN (Figure 49). Les glycolases sont les premières enzymes dans la BER, reconnaissant et excisant les nucléotides oxydés par catalyse d'une liaison glycosidique (Robertson et al., 2009). La glycolase OGG1 reconnaît et excise les 8-oxo-dG appariés à des cytosines dans la double hélice d'ADN. La glycosylase MutYhomolog (MUTYH) excise les adénines appariées à des 8-oxo-dG (Oka and Nakabeppu, 2011). Ces enzymes laissent donc un site abasique au niveau duquel le brin d'ADN sera cassé par une ADN endonucléase ou une ADN lyase. L'ADN polymérase reconnaît les substrats 3'-hydroxyl et a 5'-phosphate et comble le site de cassure avec le bon nucléotide, par appariement des bases. Ainsi, dans le cas d'une excision par OGG1, l'ADN polymérase apparie une guanine en face de la cytosine. Dans le cas d'une excision par MUTYH, l'ADN polymérase apparie soit une adénine en face du 8-oxo-dG, entraînant une nouvelle reconnaissance par MUTYH, soit une cytosine, entraînant une reconnaissance par OGG1. À la fin du processus de BER, une ligase comble la cassure du brin d'ADN (Nakabeppu, 2014; Robertson et al., 2009). La cassure de l'ADN est donc une étape indispensable de la réparation de l'ADN, suite à l'intégration de nucléotides oxydés. Les cellules peuvent cependant prévenir l'intégration des oxonucléotides dans l'ADN et éviter ainsi un mécanisme de réparation potentiellement dommageable. C'est notamment le rôle de la protéine MTH1 (pour MutTHomolog 1).

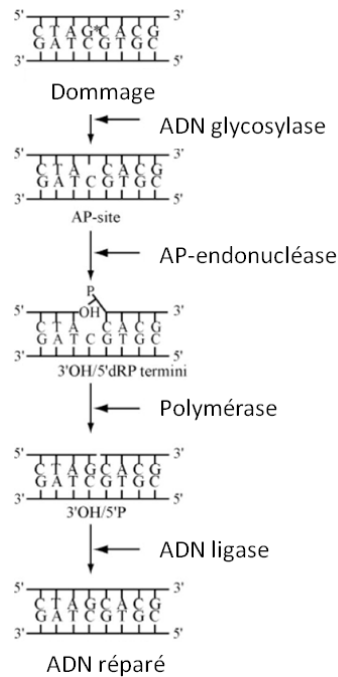


Figure 49 : Mécanisme de la Base excision repair (BER). Les glycosylases reconnaissent et excisent la base concernée par la mutation ou le dommage, laissant ainsi un site abasique. Ce dernier est reconnu par une endonucléase (ou une lyase) qui casse le brin d'ADN au niveau du site abasique. La polymérase comble la cassure par appariement des bases, puis une ligase relie les extrémités cassées du brin réparé. Modifié de (Mitra et al., 2001).

## MTH1 et la défense contre les ROS

MTH1 est une enzyme de la famille des Nudix. Cette famille d'hydrolases compte 24 membres (chez l'humain). Ces protéines contiennent une séquence consensus appelée Nudix box conservée et constituée de 23 acides aminés, correspondant au site enzymatique. Parmi ces hydrolases, NUDT (nucleoside diphosphate linked moiety X-type motif)1 (MTH1), NUDT15 (MTH2), NUDT18 (MTH3) et NUDT5 sont capables d'hydrolyser les oxonucléotides et empêcher les effets mutagènes dus à leur intégration dans l'ADN. MTH1 est l'enzyme Nudix la plus efficace pour l'hydrolyse du 8-oxo-dG, le plus abondant des oxonucléotides (Fleming and Burrows, 2017; Kennedy et al., 2004). Elle est de ce fait la plus étudiée.

Le gène MTH1 est localisé au locus 7p22 et contient 2 exons. La protéine, de 18kDa, est localisée majoritairement dans le cytoplasme, mais aussi dans le noyau et les mitochondries. L'activité pyrophosphatase de MTH1 lui permet d'hydrolyser les deux oxonucléotides les plus abondants dans la cellule, le 8-oxo-dGTP et le 2-OH-dATP, en leurs formes

monophosphatées (8-oxo-dGMP et 2-OH-dAMP), ce qui les rend inutilisables pour l'ADN polymérase (Figure 50).

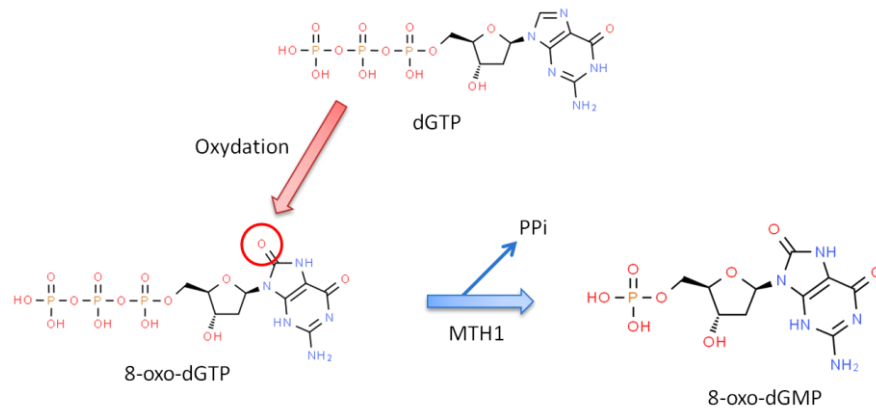


Figure 50 : Mécanisme d'action de MTH1. Les dGTP peuvent être oxydés sur leur carbone 8 par des radicaux libres ou le peroxyde d'hydrogène par exemple. Le nucléotide oxydé ainsi obtenu (le 8-oxo-dGTP) peut être intégré à l'ADN lors de la réplication par l'ADN polymérase. L'enzyme MTH1 peut hydrolyser le 8-oxo-dGTP en 8-oxo-dGMP, ce qui empêche l'utilisation du nucléotide oxydé par l'ADN polymérase. dGTP : Déoxyguanosine triphosphate, 8-oxo-dGTP : 8-oxodeoxyguanosine triphosphate. 8-oxo-dGMP : 8-oxodeoxyguanosine monophosphate. MTH1 : MutT homolog-1. Formules chimiques obtenues de chemspider.com.

MTH1 est un protecteur de l'intégrité génomique contre le stress oxydatif. Il est donc logique que sa perte dans des conditions normales n'induit aucun effet délétère (Sheng et al., 2012; Yamaguchi et al., 2006; Yoshimura et al., 2003) alors que son inhibition dans des conditions hautement oxydantes entraîne des cassures de l'ADN et la mort par un mécanisme p53 dépendant (Rai et al., 2009a). Il est également cohérent que son expression corrèle avec l'état oxydatif des tissus (Nakabeppu, 2001). Par exemple, il y a dans les neurones en dégénérescence une augmentation du stress oxydatif et l'accumulation de 8-oxo-dG. Une augmentation de l'expression de MTH1 est observée dans ces cellules, protégeant ainsi les neurones contre le stress oxydatif (Iida et al., 2001; Luca et al., 2008; Shimura-Miura et al., 1999; Yamaguchi et al., 2006).



## *MTH1 dans le cancer*

Comme indiqué précédemment, les cellules tumorales ont un métabolisme accéléré, aberrant, couplé à une division intense. À cela peuvent s'ajouter des défauts de la chaîne de transport des électrons, un niveau d'enzymes antioxydantes moins important que dans les cellules saines, ou des facteurs exogènes subis par les cellules tumorales, tels que l'hypoxie ou les inflammations. Tout ceci est synonyme de forte production de ROS comparativement aux cellules saines (Chen et al., 2015; Zou et al., 2017). Les cellules tumorales sont donc plus sensibles aux traitements induisant les ROS, et plus dépendantes des mécanismes de protection contre le stress oxydatif.

Ainsi, l'enzyme MTH1 est dispensable dans les cellules normales (Tsuzuki et al., 2001), alors qu'elle semble nécessaire dans les cancers. De nombreuses études ont en effet montré une surexpression de MTH1 dans les cancers (cancer du foie, colorectal, tumeurs cérébrales, pulmonaires...), y compris dans l'OS (Qing et al., 2018). Cette surexpression est corrélée à un mauvais pronostic vital (Coskun et al., 2015; Giribaldi et al., 2015; Iida et al., 2001; Kennedy et al., 1998; Koketsu et al., 2004; Obtulowicz et al., 2010; Zhou et al., 2019). De plus, plusieurs études indiquent que MTH1 est indispensable dans la transformation oncogénique et la prolifération induite par RAS, grâce à la prévention des cassures double brins (Giribaldi et al., 2015; Patel et al., 2014; Rai et al., 2010). Enfin, l'inhibition de MTH1 dans des cellules du cancer du poumon mutées KRAS réduit leur capacité proliférative et la croissance tumorale dans un modèle préclinique murin (Patel et al., 2014).

Le rôle de MTH1 dans le cancer serait ainsi protecteur: il permettrait aux cellules tumorales de résister aux conditions de stress oxydatif auxquelles elles sont soumises, et supporterait leur prolifération. De ce fait, il contribue à la résistance aux molécules telles que la doxorubicine ou la geldanamycine qui augmentent le stress oxydatif (Dharmaraja, 2017).

Ces observations sur la fonction pro-tumorale de MTH1 ont conduit au développement d'inhibiteurs de MTH1 (Gad et al., 2014; Huber et al., 2014; Kettle et al., 2016; Petrocchi et al., 2016).

## *Efficacité thérapeutique de l'inhibition de MTH1 dans les cancers*

Il a été montré que l'inhibition de MTH1 par shARN dans le cancer du poumon réduit la prolifération cellulaire et la croissance tumorale dans un modèle préclinique murin (Patel et al., 2014). Cette inhibition induit également des dommages à l'ADN de manière p53 dépendante (Patel et al., 2014). De même, dans le cancer gastrique, l'inhibition de MTH1 par siARN réduit la prolifération cellulaire et induit des dommages à l'ADN (Zhou et al., 2019). Enfin dans l'OS Qing et al. ont montré que des siARN ciblant MTH1 diminuent la prolifération des cellules des lignées HOS-MNNG, U2OS et MG63 (Qing et al., 2018).

Les premiers inhibiteurs chimiques de MTH1 développés étaient TH287 et TH588, décrites par Gad et collaborateurs en 2014. Ces molécules sont capables d'empêcher l'activité 8-oxo-dGTPase et 2-OH-dATPase de MTH1 en se liant à ses résidus Asn33, Asp116 et Asp120. Elles réduisent ainsi la prolifération des cellules tumorales et la croissance tumorale dans un modèle murin de cancer colorectal. De ce fait, elles augmentent la survie dans ce modèle *in vivo* (Gad et al., 2014; Warpman Berglund et al., 2016a). Ces effets semblent liés à des dommages à l'ADN induits suite à l'intégration des nucléotides oxydés dans l'ADN, et à la mort cellulaire médiée par p53. Ces résultats concordent avec ceux du (S)-crizotinib, énantiomère du (R)-crizotinib (inhibiteur de tyrosine kinases Met et ALK entre autres) ayant la capacité d'inhiber l'activité de MTH1. Le (S)-crizotinib induit une diminution de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale *in vivo* dans l'OS et le cancer colorectal, et induit des dommages à l'ADN (Huber et al., 2014; Qing et al., 2018). L'inhibiteur MI-743 de Zhou et al. diminue également la prolifération, augmente des dommages à l'ADN *in vitro*, et réduit la croissance tumorale dans un modèle murin de cancer gastrique.

D'autres inhibiteurs ont été testés par différentes équipes dans de nombreux cancers (Kawamura et al., 2016; Kettle et al., 2016; Qing et al., 2018; Zhou et al., 2019). Les résultats des études varient cependant de manière importante. Ainsi, Kettle et al. ont développé deux inhibiteurs chimiques de MTH1 et prouvé leur capacité à lier MTH1 grâce à une expérimentation de CETSA (Cellular Thermal Shift Assay), une technique mesurant l'interaction d'une protéine avec un ligand. Ces molécules ont cependant échoué à réduire la prolifération ou induire des dommages à l'ADN, dans une lignée SW480 de cancer colorectal (Kettle et al., 2016). De plus, un CRISPR-Cas9 ciblant MTH1 réalisé dans la lignée SW480 a

échoué à réduire la prolifération des cellules dans l'étude de Kettle, alors que Gad et al. ont montré que l'inhibition de MTH1 par shARN réduit la clonogénicité des cellules SW480 *in vitro*, réduit la croissance tumorale dans un modèle murin, et augmente la survie des souris (Gad et al., 2014; Kettle et al., 2016).

## Objectif de la partie II

L'inhibition de MTH1 dans le cancer semble produire des résultats très différents en fonction des études. Ces divergences font douter de l'intérêt du ciblage de MTH1 pour le traitement du cancer.

Le but de cette étude est d'investiguer la pertinence de MTH1 comme cible thérapeutique dans l'OS, en utilisant deux inhibiteurs de l'activité enzymatique de MTH1 : le TH588 précédemment décrit, et le TH1579 ou (Karonudib, actuellement en essai clinique de phase I), tous deux développés et fournis par l'équipe de Thomas Helleday au Karolinska Institutet. Ainsi, par différentes approches, nous évaluerons l'intérêt thérapeutique de l'inhibition de MTH1 dans divers processus cellulaires *in vitro* et *in vivo* tels que la prolifération, la croissance tumorale, ou la dissémination métastatique.

## RESULTATS PARTIE II

### *MTH1 est surexprimé dans l'ostéosarcome*

Nous avons premièrement évalué l'expression de MTH1 dans l'OS, en utilisant des lignées cellulaires d'OS et 13 biopsies provenant de patients atteints d'OS (Figure 51). Le niveau d'ARNm de MTH1 évalué par qPCR, est plus élevé dans les lignées d'OS et chez les patients, comparé à des ostéoblastes humains (hOB) et des cellules souches mésenchymateuse (hMSC) utilisées comme contrôles. De même, MTH1 est surexprimé au niveau protéique dans les lignées d'OS comparées à des hMSC.

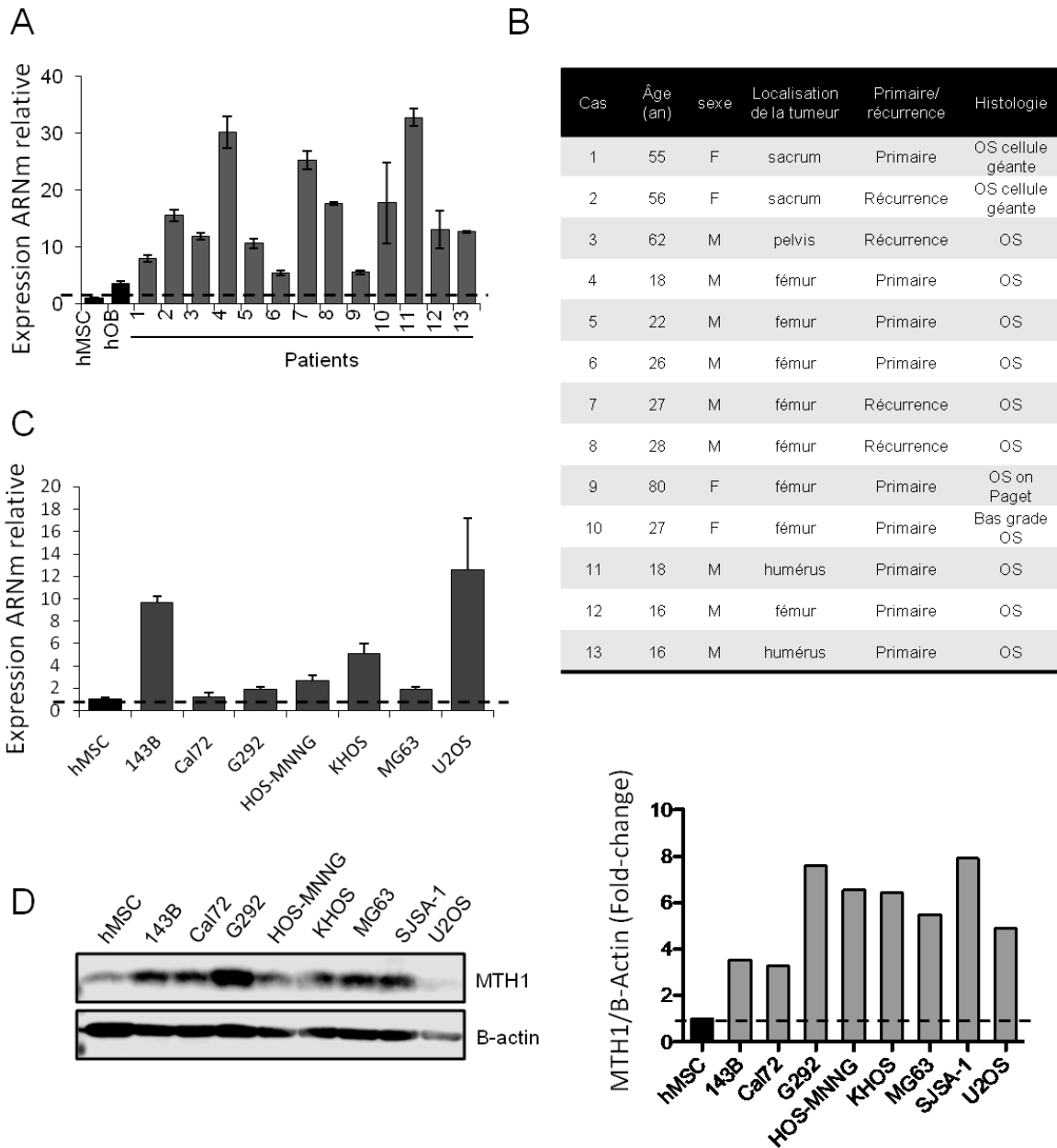


Figure 51 :MTH1 est surexprimé dans l'OS. (A) L'expression de MTH1 a été évaluée par qPCR dans des biopsies de patients atteints d'OS, et comparativement à des cellules souches mésenchymateuses ou des ostéoblastes humains (B). (C) Évaluation de l'expression de HSF1 par qPCR et par western blot (D) dans 8 lignées d'OS (143B, Cal72, G292, HOS-MNNG, KHOS, MG63, U2OS) comparativement à des hMSC.

## TH588 et TH1579, inhibiteurs de MTH1, réduisent la prolifération des cellules d'OS

La surexpression de MTH1 dans l'OS pourrait indiquer une importance dans la prolifération des cellules tumorales. Les effets des inhibiteurs TH588 et TH1579 sur la prolifération des cellules de 8 lignées d'OS ont donc été évalués par un test au crystal violet (Figure 52). Il s'agit des lignées 143B, Cal72, G292, HOS-MNNG, KHOS, MG63, SJS-A-1 et U2OS. La croissance cellulaire des lignées testées est diminuée de manière dose-dépendante par les deux inhibiteurs, comparativement aux cellules contrôles non traitées. Les concentrations inhibant la prolifération de 50% (IC50) sont comprises entre 4,48 $\mu$ M (SJS-A-1) et 17,37 $\mu$ M (G292) pour TH588, et 0,14 $\mu$ M (HOS-MNNG) et 16,26 $\mu$ M (G292) pour TH1579.

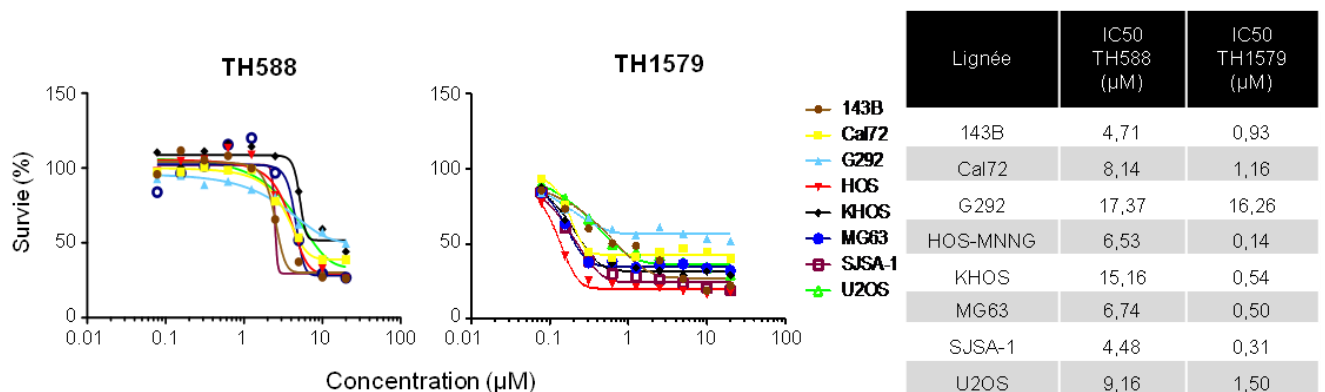
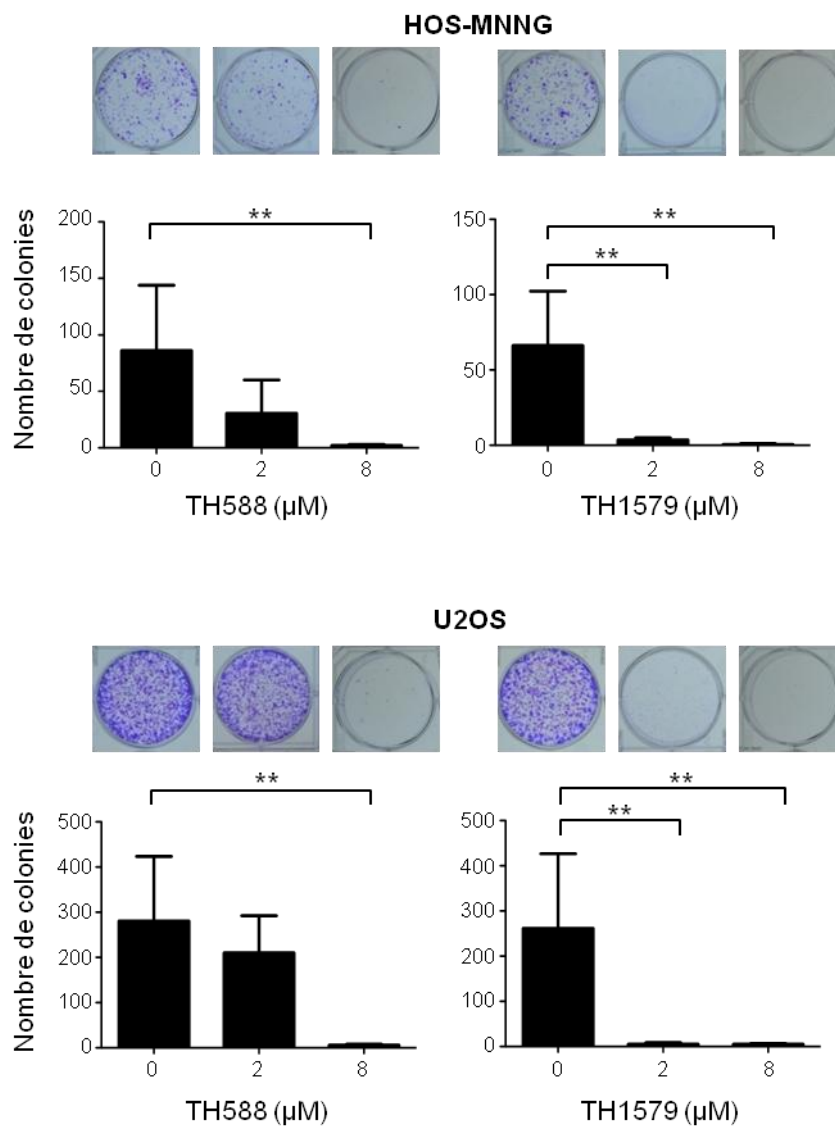


Figure 52 : TH588 et TH1579 diminuent la viabilité cellulaire des lignées d'OS (test de prolifération au crystal violet). Les cellules tumorales ont été traitées pendant 72h aux concentrations indiquées de TH588 et TH1579. Puis elles ont été fixées et colorées au crystal violet. La viabilité est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle. Le tableau contient les concentrations inhibant la prolifération de 50% (IC50) pour toutes les lignées d'OS.

Un test de clonogénicité, réalisé après 48h de traitement a également montré une diminution significative des capacités clonogéniques des 8 lignées d'OS. Par exemple, le nombre de colonies est diminué de 65% dans la lignée cellulaire HOS-MNNG traitées avec 2 $\mu$ M de TH588, et de 98% après traitement par 8 $\mu$ M de TH588 ( $p < 0,01$ ) (Figure 53). Concernant la lignée cellulaire U2OS, le nombre de colonies est diminué de 25% et 98% après traitement par 2 $\mu$ M et 8 $\mu$ M de TH588 respectivement ( $p < 0,01$ ). TH1579 s'est encore

une fois avéré être l'inhibiteur le plus efficace. En effet, le traitement par TH1579 dans les mêmes conditions que précédemment diminue significativement le nombre de colonies de plus de 95% dès 2 $\mu$ M, pour les deux lignées d'OS HOS-MNNG et U2OS ( $p < 0,01$ ). Des résultats similaires ont été obtenus pour les 6 autres lignées d'OS, i.e.143B, Cal72, G292, KHOS, MG63 and SJS-1.



**Figure 53 : TH588 et TH1579 réduisent la clonogénicité des cellules d'OS.** Des cellules HOS-MNNG ou U2OS ont été traitées pendant 48h avec 2 ou 8 $\mu$ M de TH588 et TH1579 puis décollées et ré-ensemencées en plaque 6 puits. Après une semaine, les colonies cellulaires ont été colorées au crystal violet et comptées. (N =3) (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ).

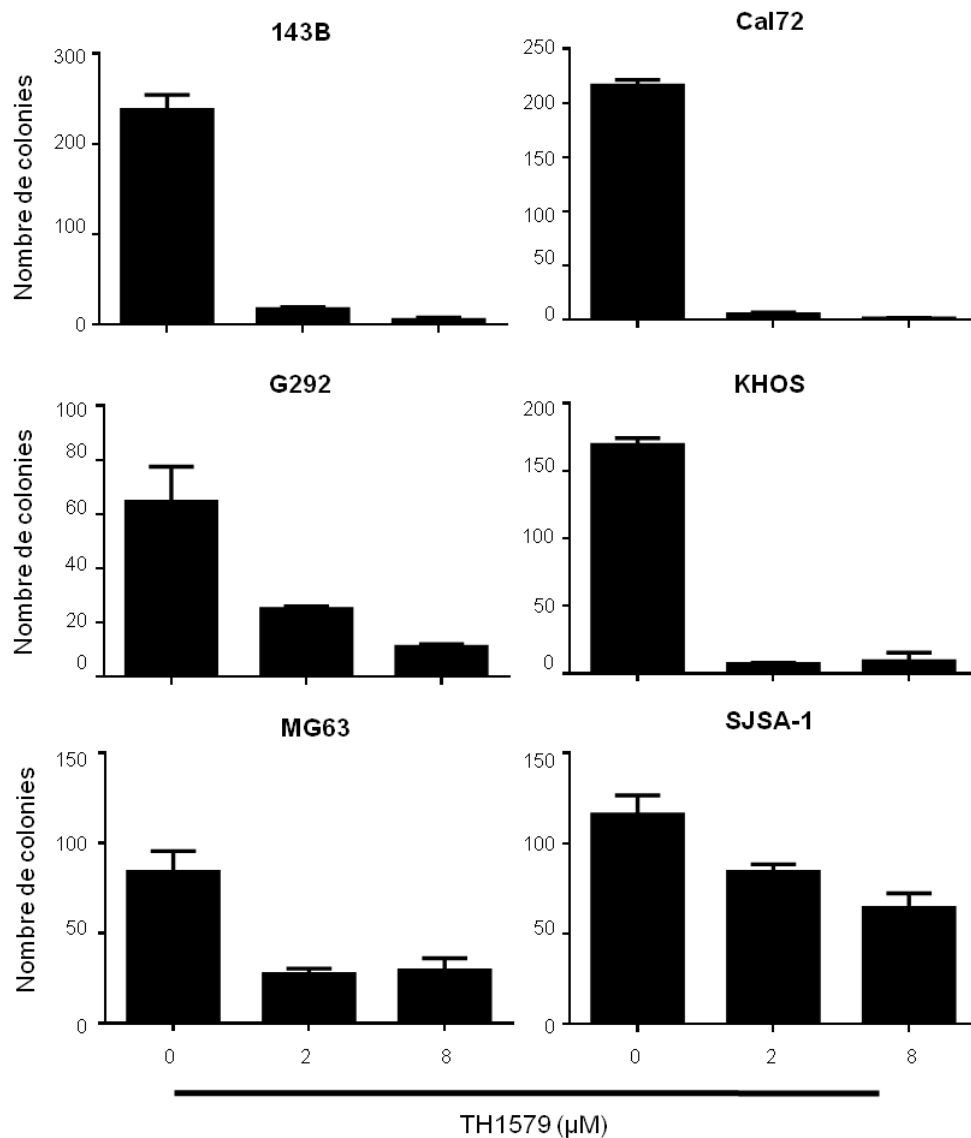


Figure 54 : TH588 et TH1579 réduisent la clonogénicité des cellules d'OS. Des cellules 143B, Cal72, G292, KHOS, MG63 ou SJSA-1 ont été traitées pendant 48h avec 2 ou 8μM de TH588 et TH1579 puis décollées et ré-ensemencées en plaque 6 puits. Après une semaine, les colonies cellulaires ont été colorées au crystal violet et comptées. (N =3) (\* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001 ; \*\*\*\*=p<0,0001).

Afin de vérifier que l'inhibition de MTH1 était bien à l'origine des effets observés sur la prolifération et non d'éventuels effets aspécifiques des molécules chimiques, des cellules HOS-MNNG ont été transfectées avec un pool de siARN ou transduites avec deux shARN différents ciblant spécifiquement MTH1. La capacité des siARN et shARN à réduire l'expression de MTH1 a été vérifiée par qPCR et western blot (Figure 55). Par exemple, l'expression transcriptionnelle de MTH1 après transfection par le siARN ou transduction par



les shARN est diminuée de plus de 90%. L'inhibition de MTH1 par siARN réduit significativement la prolifération des cellules HOS-MNNG de 16% comparé à un siRNA control (siCt) ( $p < 0,01$ ). Les shARN numéro 1 et 2 réduisent significativement la prolifération cellulaire de 66% ( $p < 0,001$ ) et 48% ( $p < 0,01$ ) respectivement.

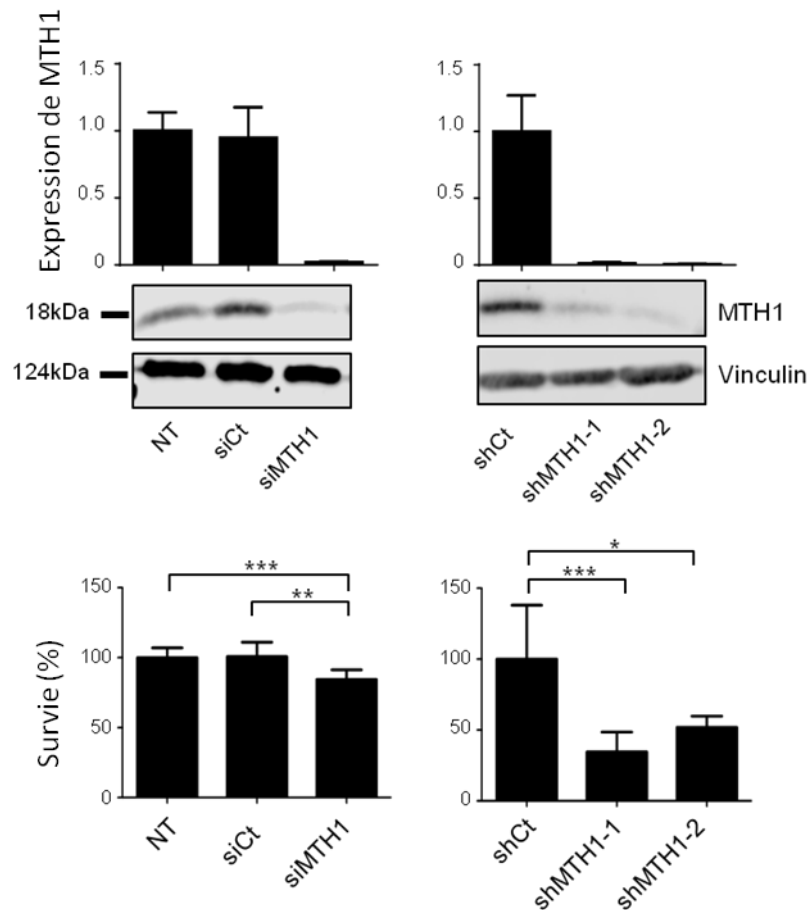
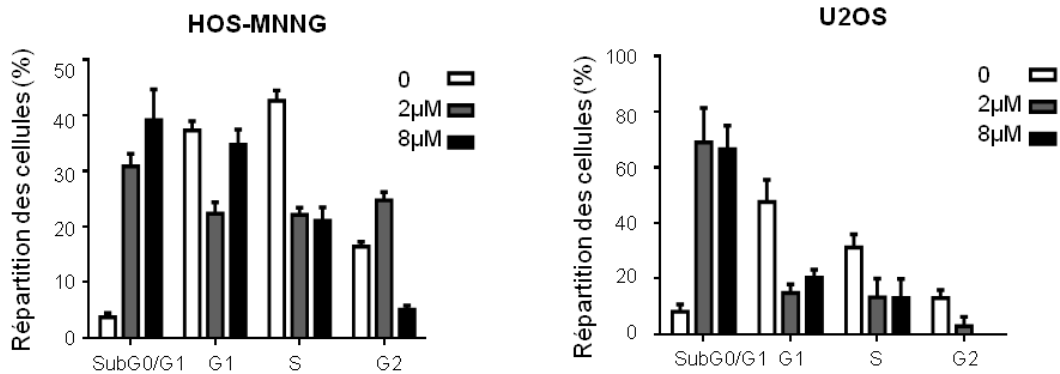


Figure 55 : Inhibition de MTH1 par siARN ou shARN diminue la viabilité cellulaire des cellules d'OS. Les cellules HOS-MNNG ont été transfectées pendant 48h ou transduites pendant 72h avec un siARN (30nM) ou deux shARN (MOI10) ciblant HSF1. NT = cellules non infectées ; siCt = cellules transfectées avec un siARN Contrôle, NI = cellules non transduites, shCt = cellules transduites avec un shARN contrôle. L'inhibition a été validée par qPCR et western blot, puis un test de prolifération a été réalisé (N=3) (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ).

## *TH1579 induit le blocage du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules d'OS par induction de dommages à l'ADN*

Afin d'identifier les raisons des effets anti-prolifératifs de l'inhibition de MTH1, une observation du cycle cellulaire a été réalisée. Les effets de TH1579 sur le cycle cellulaire des cellules HOS-MNNG ont été évalués après 48h de traitement et marquage au iodure de propidium par cytométrie en flux (Figure 56). Les résultats montrent une augmentation dose dépendante de la proportion de cellules en phase subG0/G1 (cellules mortes), après traitement TH1579. Ainsi, le traitement augmente la proportion des cellules HOS-MNNG se trouvant en phase subG0/G1, passant de 4% dans la condition contrôle à 31 et 39% dans les conditions 2 et 8 $\mu$ M de TH1579 respectivement. Concernant les cellules U2OS, les pourcentages de cellules en subG0/G1 sont respectivement de 8%, 69% et 67% pour les conditions contrôles, 2 $\mu$ M et 8 $\mu$ M de TH1579 respectivement. L'augmentation de proportion des cellules mortes a également été observée après traitement des cellules HOS-MNNG et U2OS avec TH588.

### TH1579



### TH588

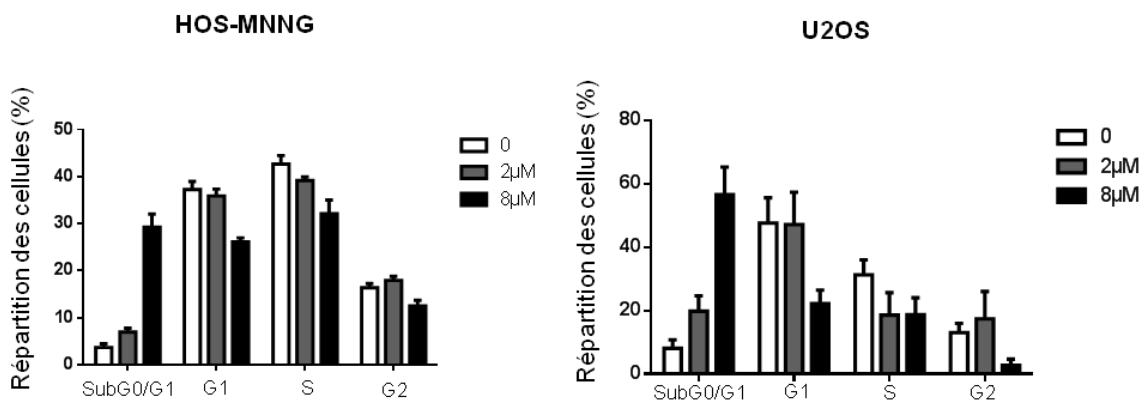


Figure 56 : L'inhibition de MTH1 altère le cycle cellulaire. Des cellules HOS-MNNG ou U2OS ont été traitées pendant 48h avec 2 ou 8μM de TH1579 ou TH588 puis marquées au iodure de propidium. Le cycle cellulaire a été observé par cytométrie en flux. L'analyse des résultats a été réalisée avec Flowlogic (Invai Technologies). N=3

Il a été décrit dans la littérature que de faibles concentrations de TH1579 peuvent induire un blocage du cycle cellulaire (Gad et al., 2019). Afin de vérifier ces résultats, des cellules HOS-MNNG et U2OS ont été traitées avec de faibles concentrations de TH1579 (100 et 500nM) pendant 48h (Figure 57). La concentration de 100nM n'altère pas le cycle cellulaire. Cependant, un traitement de 500nM augmente la proportion de cellules en phase G2/M du cycle cellulaire chez les cellules HOS-MNNG. Il y a ainsi 49% des cellules en G2/M après traitement contre 11% dans la condition non traitée (Ct). Dans les cellules U2OS, la

concentration de 500nM de TH1579 induit une augmentation de 14% de la proportion des cellules en phase G0/G1.

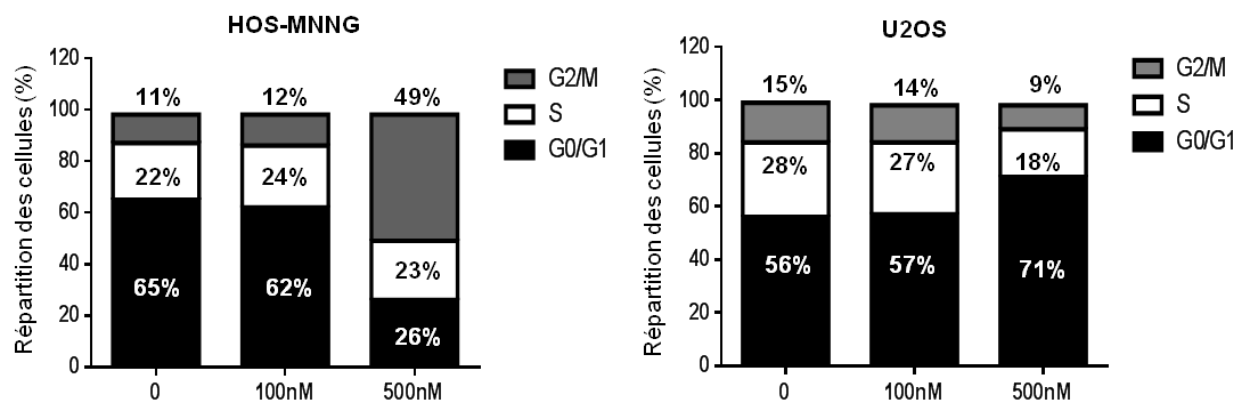


Figure 57 : L'inhibition de MTH1 par TH1579 à faible dose bloque le cycle cellulaire en phase G2/M. Des cellules HOS-MNNG ont été traitées pendant 48h avec 100 ou 500nM de TH1579 puis marquées au iodure de propidium. Le cycle cellulaire a été observé par cytométrie en flux. L'analyse des résultats a été réalisée avec Flowlogic (Inivai Technologies). N=3.

Les résultats de l'analyse du cycle cellulaire indiquent donc qu'à faible dose l'inhibition de MTH1 (par TH1579) induit un blocage du cycle cellulaire dans les cellules HOS-MNNG et U2OS, à des phases différentes, et avec des intensités différentes. Cependant, de fortes doses d'inhibiteur de MTH1 induisent une augmentation de la proportion de cellules en phase subG0/G1, donc une cytotoxicité.

Afin de définir la cytotoxicité induite par les inhibiteurs de MTH1, un test d'activité des caspase-3/7 a été réalisé. Ce test enzymatique a montré que TH1579 et TH588 augmentent significativement l'apoptose dépendante des caspases-3/7 (Figure 58). L'activité des caspases-3/7 est ainsi multipliée par 6 dans les cellules HOS-MNNG traitée 48h avec 8 $\mu$ M de TH1579 (8075 en unité arbitraire par ug de protéines), comparé à la condition contrôle non traitée (1210 en UA/ug de protéines) ( $p < 0,01$ ). Dans la lignée cellulaire U2OS, le traitement par TH1579 multiplie par 2 l'activité des caspases-3/7, passant de 2024 à 4434 UA/ug de protéines ( $p < 0,01$ ). La capacité de TH1579 et TH588 à induire l'apoptose a également été testé dans d'autres lignées d'OS (Figure 59) : les deux inhibiteurs augmentent l'activité des caspases-3/7, et donc l'apoptose dans toutes les lignées testées, exceptée la lignée G292 qui

présente un IC50 élevé pour les deux molécules (voir le test de prolifération, Figure 52). L'analyse du clivage de poly-ADP ribose polymérase (PARP) dans les lignées HOS-MNNG et U2OS par western blot confirme ces résultats. Elle montre une augmentation du clivage des PARP, et donc de l'activité des caspases-3/7 (Figure 60).

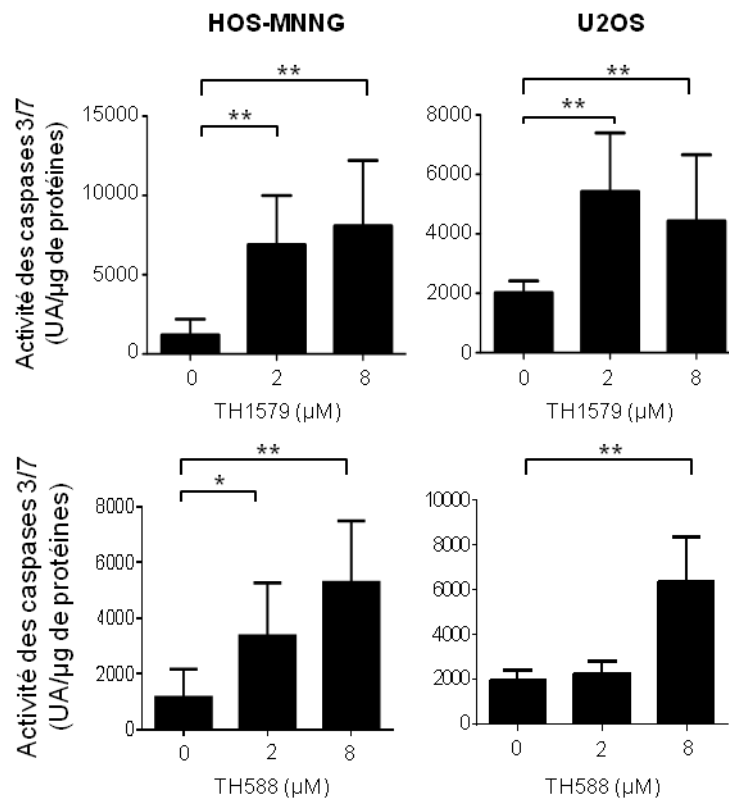


Figure 58: L'inhibition de MTH1 par TH588 ou TH1579 induit l'apoptose dans les cellules HOS-MNNG et U2OS. L'activité des caspases-3/7 a été évaluée dans les lignées HOS-MNNG et U2OS par un test enzymatique, après 48h de traitement avec TH588 ou TH1579 aux concentrations indiquées. (N = 3). L'activité des caspases-3/7 est rapportée à 1μg de protéines et exprimée en unité arbitraire par μg de protéines. (\* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001 ; \*\*\*\*=p<0,0001)

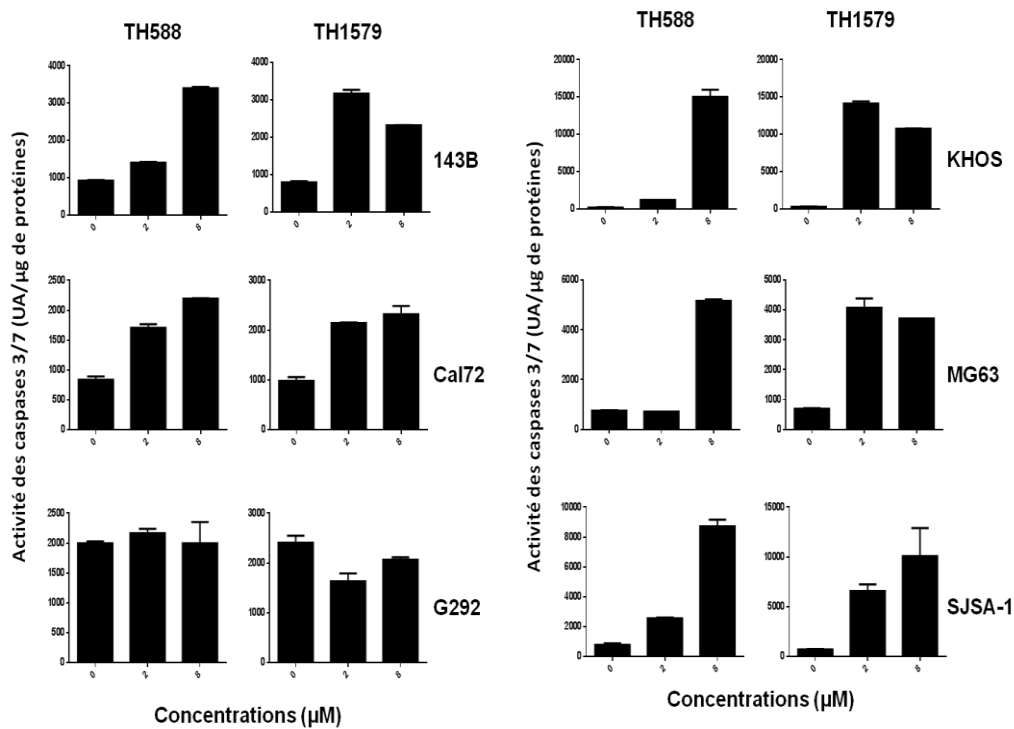


Figure 59 :L'inhibition de MTH1 par TH588 ou TH1579 induit l'apoptose dans les cellules d'OS. L'activité des caspases-3/7 a été évaluée dans les lignées d'OS (143B, Cal72, G292, KHOS, MG63, SJS-A-1) par un test enzymatique, après 48h de traitement avec TH588 ou TH1579 aux concentrations indiquées. (N = 3). L'activité des caspases-3/7 est rapportée à 1μg de protéines et exprimée en unité arbitraire par μg de protéines. (\* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001 ; \*\*\*\*=p<0,0001).

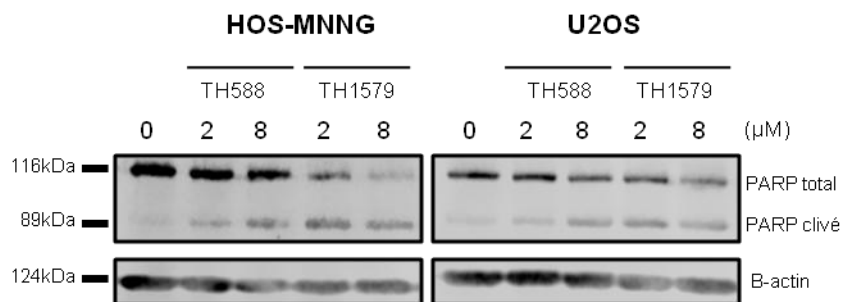


Figure 60 : L'inhibition de MTH1 induit le clivage des PARP. Les cellules ont été traitées avec les concentrations indiquées de TH588 ou TH1579. Le clivage des PARP a été observé par western blot après 48h de traitement. La B-actine est utilisée comme témoin de chargement.

Comme décrit en introduction de la partie II, le rôle de MTH1 est de prévenir l'intégration des oxonucléotides dans l'ADN. Nous avons donc mesuré l'intégration de 8-oxo-dG dans la double hélice après traitement par TH1579, en utilisant un test des comètes modifié. Ce test permet normalement de détecter les dommages à l'ADN. L'utilisation de la glycosylase

OGG1 permet d'induire les dommages à l'ADN à chaque site d'intégration de 8-oxo-dG. Ainsi, dans cette version modifiée du test des comètes, la quantité de dommages à l'ADN peut être liée à la quantité de 8-oxo-dG intégrée dans la double hélice. Quatre conditions ont été réalisées pour ce comet assay (n>100 pour chaque conditions) :

- Cellules non traitées (Ct)
- Cellules traitées uniquement avec la glycosylase OGG1 qui excise le 8-oxo-dG de l'ADN et permet ainsi de révéler l'intégration de l'oxonucléotide dans la double hélice
- Cellules traitées avec 8µM de TH1579 pendant 24h
- Cellules traitées avec le TH1579 pendant 24h et la glycosylase OGG1

La longueur de la queue des comètes (« tail moment », en unité arbitraire) a ensuite été mesurée par analyse d'image. Dans la lignée cellulaire U2OS (Figure 61), la combinaison de TH1579 et OGG1 augmente significativement le « tail moment » moyen (35,24UA, p<0,001) comparé aux conditions TH1579 (27,19UA, p<0,001) et OGG1 (9,08UA, p<0,001) seules, et à la condition contrôle (8,95UA, p<0,001). Cela indique que le traitement par TH1579 augmente l'intégration de nucléotides oxydés 8-oxo-dG dans l'ADN. Le test des comètes n'a cependant pas montré de différences significatives entre les quatre conditions, dans la lignée cellulaire HOS-MNNG (Figure 62).

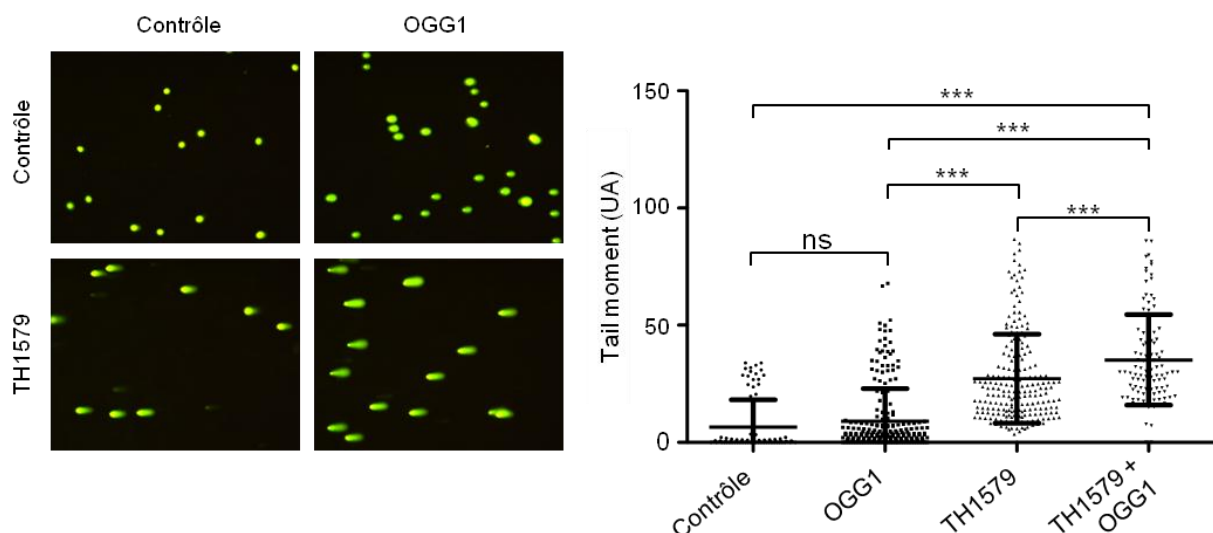


Figure 61 : TH1579 induit l'intégration de 8-oxo-dG dans la double hélice. Les cellules U2OS ont été traitées pendant 24h avec 8µM de TH1579, décollées et lysées, puis soumises ou non à un traitement enzymatique par la glycosylase OGG1.

Une électrophorèse est ensuite effectuée. Les cassures de l'ADN sont observées grâce à un intercalant de l'ADN et exprimées en tail moment.  $N \geq 100$ . (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

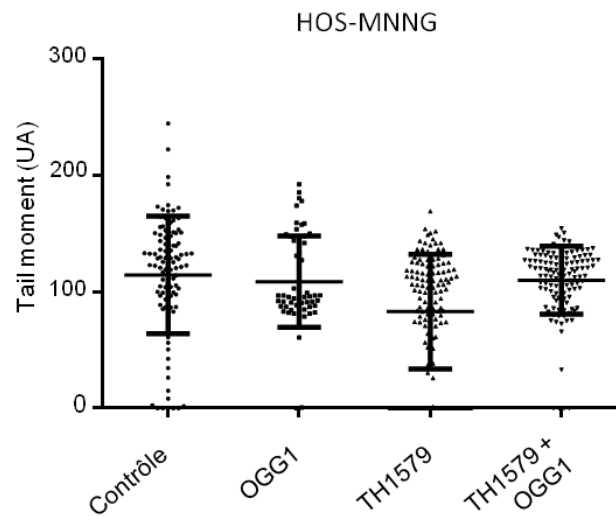


Figure 62 : Le comet assay ne montre pas d'intégration de 8-oxo-dG dans la double hélice des cellules HOS-MNNG après traitement par TH1579. Les cellules HOS-MNNG ont été traitées pendant 24h avec  $8\mu\text{M}$  de TH1579, décollées et lysées, puis soumises ou non à un traitement enzymatique par la glycosylase OGG1. Une électrophorèse est ensuite effectuée. Les cassures de l'ADN sont observées grâce à un intercalant de l'ADN et exprimées en tail moment.  $N \geq 100$ . (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

L'intégration des oxonucléotides dans l'ADN suite à l'inhibition de MTH1 peut être à l'origine d'une augmentation des dommages de l'ADN. La phosphorylation de l'histone H2AX, marqueur des dommages à l'ADN (Burma et al., 2001; Georgoulis et al., 2017), a donc été évaluée par western blot après 48h de traitement par TH1579 (Figure 63). Dans la lignée cellulaire U2OS, l'expression protéique de  $\gamma\text{H2AX}$  (H2AX phosphorylé sur la ser319) est bien augmentée suite au traitement par TH1579 ou TH588, tandis que l'expression protéique de H2AX total reste inchangée. Cependant, l'observation de  $\gamma\text{H2AX}$  par immunofluorescence ne montre pas de différence entre des cellules U2OS traitées avec le TH1579 et des cellules U2OS non traitées (Figure 64). Cela est notamment du au fait que le nombre de loci  $\gamma\text{H2AX}$  était très hétérogène entre les cellules d'une même condition expérimentale.



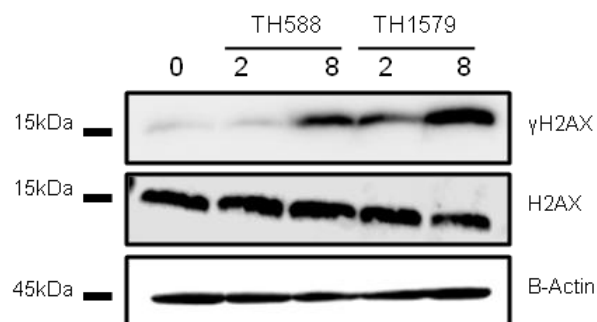


Figure 63 : Les inhibiteurs TH588 et TH1579 de MTH1 induisent la phosphorylation de l'histone H2AX. Les cellules U2OS ont été traitées pendant 48h avec 2 ou 8 $\mu$ M de TH588 ou TH1579. L'observation des protéines H2AX et  $\gamma$ H2AX a été faite par western blot. La B-actine est utilisée comme témoin de chargement.

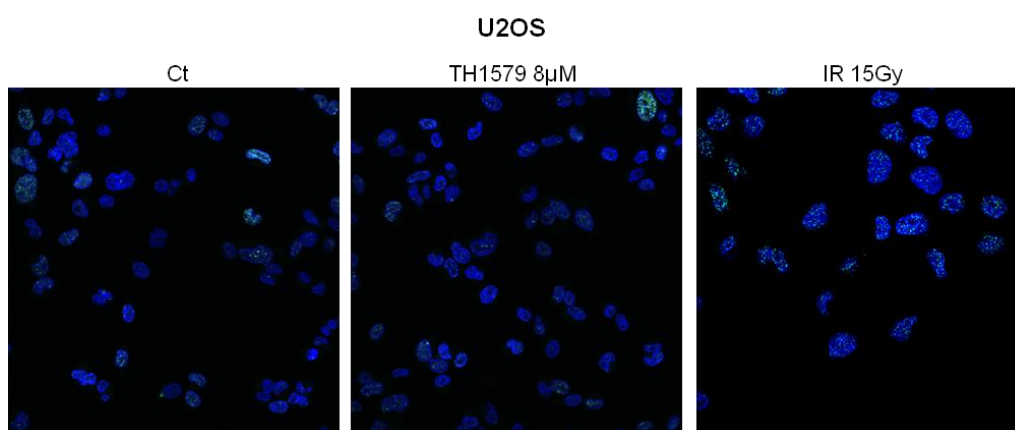


Figure 64 : TH1579 n'induit pas d'augmentation des loci  $\gamma$ H2AX observés immunofluorescence. L'immunofluorescence a été réalisée dans les cellules U2OS après 24h de traitement par 8 $\mu$ M de TH1579 ou après irradiation (15Gy).

### TH1579 ralentit la croissance tumorale et augmente les dommages à l'ADN dans un modèle murin d'OS

Au vu de ses résultats intéressants *in vitro*, le potentiel thérapeutique de TH1579 a été évalué *in vivo* dans un modèle de xéno greffe. Des souris nues ont été injectées avec des cellules HOS-MNNG, et réparties aléatoirement en 3 groupes de 8 souris :

- Un groupe contrôle traité avec le véhicule
- Un groupe traité avec 45mg/kg de TH1579
- Un groupe traité avec 90mg/kg de TH1579

Les souris ont été traitées 3 fois par semaine par voie orale (gavage) dès que la tumeur était palpable. La croissance tumorale a ensuite été mesurée pendant 48 jours (3 fois par semaine)(Figure 65). Les résultats montrent que le traitement TH1579 réduit de manière significative la croissance tumorale. Vingt neuf jours après l'implantation de la tumeur, le volume tumoral moyen est diminué de 40,6% dans le groupe 45 mg/kg (398 mm<sup>3</sup>) et de 73,2% dans le groupe 90 mg/kg (179,46 mm<sup>3</sup>), comparé au groupe contrôle (670,3 mm<sup>3</sup>). À 48 jours, les volumes tumoraux moyens étaient significativement réduits de 41,3% (p<0,05) et 80,6% (p<0,0001) dans les groupes 45mg/kg et 90mg/kg respectivement, comparés au groupe contrôle. De plus, le nombre de souris avec un volume tumoral supérieur ou égale à 1000 mm<sup>3</sup> à 48 jours était diminué dans les groupes 45 mg/kg (4/8) et 90 mg/kg (0/8) comparativement au groupe contrôle dans lequel toutes les souris avaient passé ce seuil.

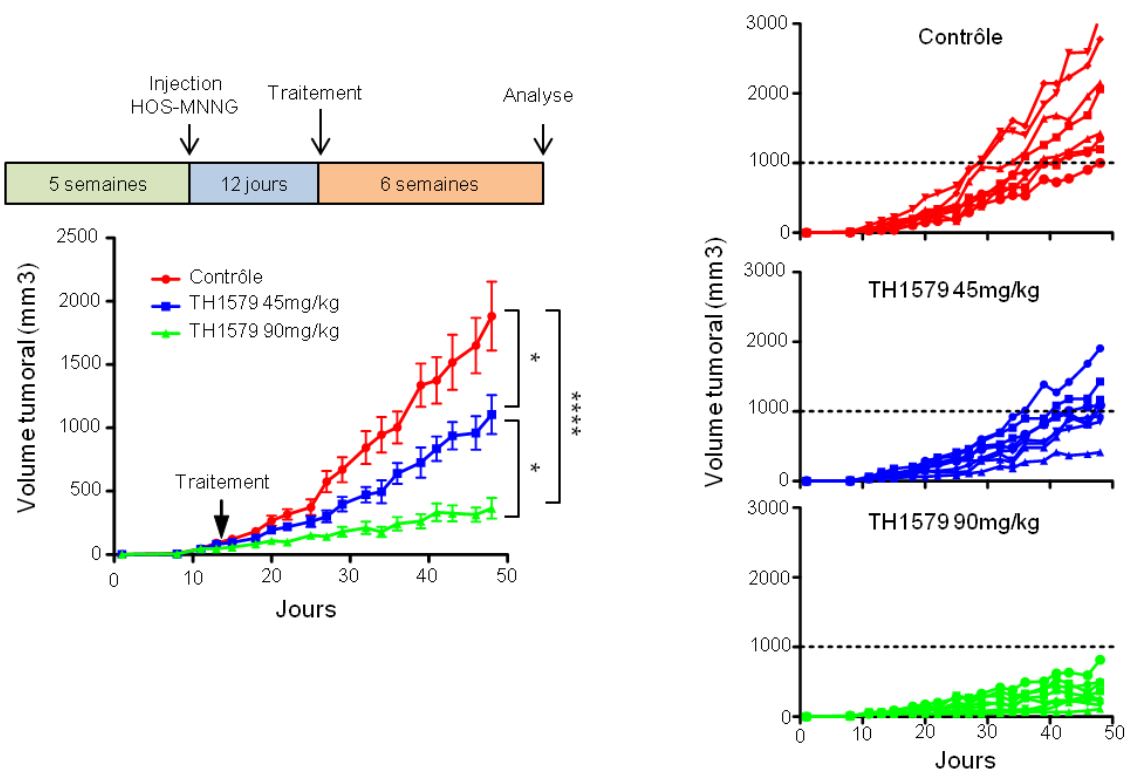


Figure 65 : TH1579 réduit la croissance tumorale dans un modèle murin d'OS. Le modèle animal utilisé est un modèle murin obtenu par injection de 1,5 millions cellules HOS-MNNG en paratibial à des souris nues. Trois groupes de 8 souris ont été constitués aléatoirement : non traité, traité avec 45mg/kg ou 90mg/kg de TH1579. La croissance tumorale a été mesurée 3 fois par semaine pendant 48 jours. (\* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001 ; \*\*\*\*=p<0,0001).

Afin de s'assurer que le TH1579 se lie à sa cible MTH1 *in vivo*, un CETSA (cellular thermal shift assay) a été réalisé dans notre modèle (Figure 66). Brièvement, le CETSA est une méthode basée sur le principe de stabilisation d'une protéine liée à un ligand (en l'occurrence le TH1579) (Jafari et al., 2014). La chaleur induit la dénaturation des protéines, qui s'agglomèrent et précipitent du fait de l'exposition de leurs régions hydrophobes. La mesure de la quantité de protéines solubles est donc indicative de la capacité de cette protéine à résister à la dénaturalisation à une température donnée. Une protéine liée à un ligand sera plus résistante à la dénaturation, du fait des forces de liaison entre les deux partenaires. Sa température de fusion, et donc sa quantité dans la fraction soluble, sera plus élevée que si elle était seule. Dans notre étude, trois températures ont été testées : les échantillons tumoraux des souris appartenant aux groupes contrôle, 45mg/kg et 90mg/kg ont été soumis à des températures de 56°, 58° ou 60°C pendant 1 heure. La quantité de MTH1 présente dans la fraction soluble a été mesurée. Le pourcentage de MTH1 non dénaturé est à chaque fois plus élevée dans les groupes traités, que dans le groupe contrôle. À 56°C par exemple, le pourcentage moyen de MTH1 soluble était de 14,7% dans le groupe contrôle, alors qu'ils étaient de 26,7% et 59,6% dans les groupes 45mg/kg et 90mg/kg respectivement. À 58°C les valeurs étaient respectivement de 7,9% ; 19,4% et 51,7% dans les groupes contrôle, 45mg/kg et 90mg/kg. Enfin, à 60°C les pourcentages de MTH1 solubles étaient de 4,2%, 13,2% et 42,3% respectivement les groupes contrôles, 45mg/kg et 90mg/kg.

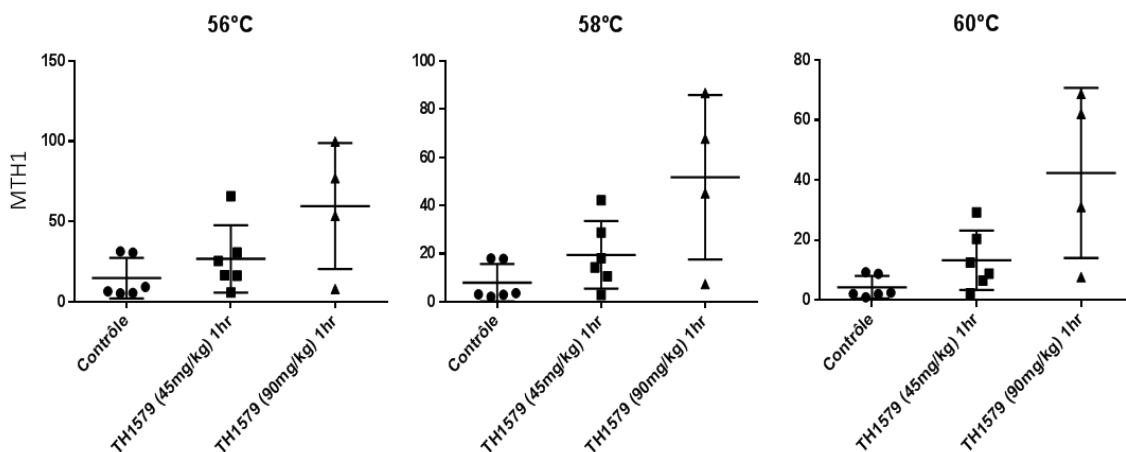


Figure 66 :TH1579 se lie à TH1579 après traitement, dans un modèle murin *in vivo*. L'engagement protéine (MTH1)-ligand (TH1579) a été mesuré par cellular thermal shift assay (CETSA) à 56, 58 et 60°C, dans les tumeurs des trois groupes de souris non traitées, 45mg/kg TH1579 et 90mg/kg TH1579.

Le marquage de la caspase-3 clivée a été réalisé par immunohistochimie sur les tumeurs murines, après le sacrifice des souris, afin de quantifier la mort des cellules tumorales. Les résultats, présentés en pourcentage d'aire marquée (Figure 67), montrent une augmentation de l'expression de la caspase-3 clivée de 6% et 8,5% dans les souris des groupe 45 mg/kg ( $p < 0,05$ ) et 90 mg/kg ( $p < 0,001$ ) respectivement, comparé au groupe contrôle. Indiquant une induction de l'apoptose par TH1579, *in vivo*. Le marquage du 8-oxo-dG et du  $\gamma$ H2AX dans les tumeurs murines, également par immunohistochimie (aire marquée en pourcentage), montre que le traitement TH1579 augmente significativement l'intégration des oxonucléotides dans l'ADN et les dommages subséquents *in vivo*. En effet, l'expression de 8-oxo-dG est multipliée par 2 dans le groupe 45mg/kg (3,16% ;  $p < 0,05$ ), et par 2,6 dans le groupe 90mg/kg (4% ;  $p < 0,01$ ) par rapport au contrôle (1,53%). L'expression de  $\gamma$ H2AX est multipliée par 1,4 dans le groupe 45mg/kg (16,97% ;  $p < 0,01$ ) et par 1,38 dans le groupe 90mg/kg (16,8% ;  $p < 0,05$ ) comparé au contrôle (12,18%).

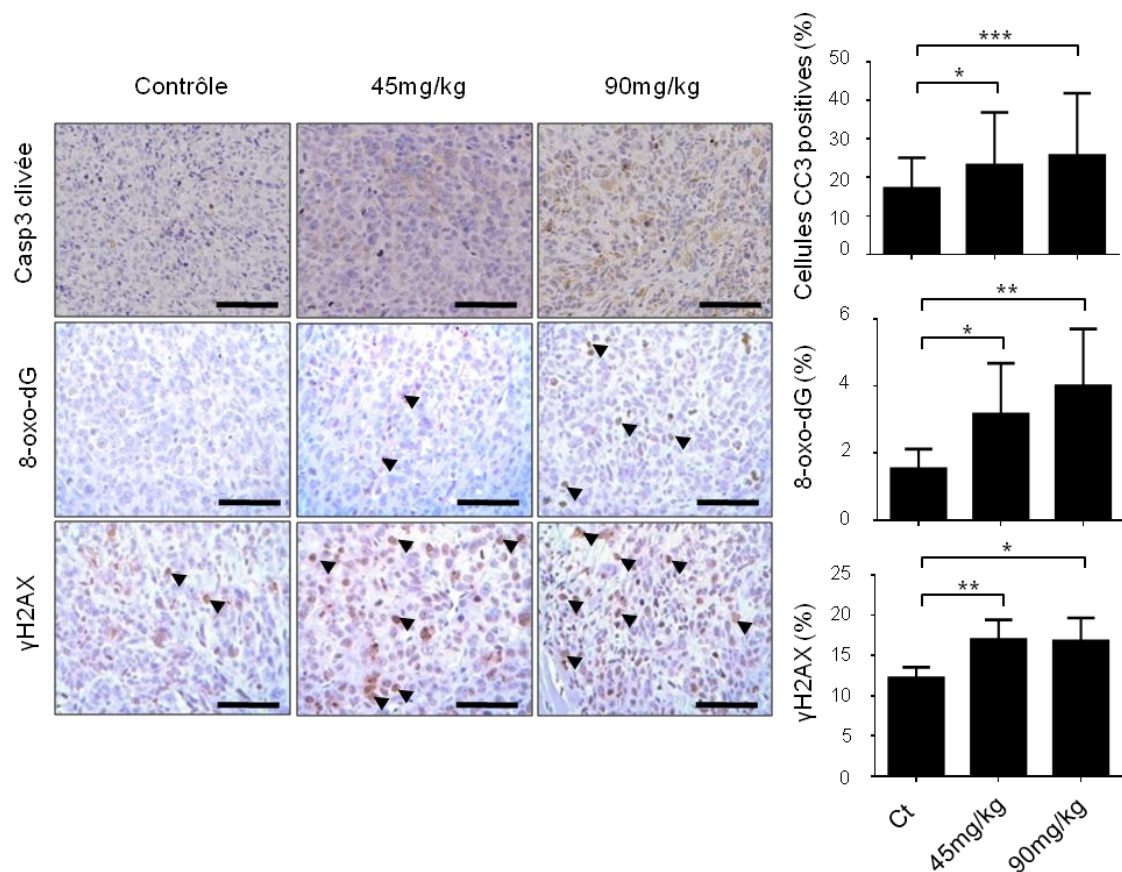


Figure 67 : TH1579 induit la mort cellulaire *in vivo* par augmentation des dommages à l'ADN. La mort cellulaire, l'intégration de nucléotides oxydés dans la double hélice et les dommages à l'ADN ont été quantifiés par marquage par immunohistochimie de la caspase-3 clivée, de 8-oxo-dG et de  $\gamma$ H2AX dans des biopsies de tumeurs murines. La barre d'échelle représente 100 $\mu$ m. La quantification a été faite par analyse d'image. (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ).

### TH1579 diminue la dissémination métastatique en inhibant la migration et l'angiogénèse des cellules d'OS

Les métastases pulmonaires sont un facteur de mauvais pronostic dans l'OS. De ce fait, les traitements inhibant la dissémination métastatique sont très intéressants. Nous avons donc évalué l'effet de l'inhibition de MTH1 dans la prévention des métastases. Ainsi, les métastases pulmonaires des souris ont été comptées après coloration à l'Hématoxiline-Eosine (Figure 68). Le nombre moyen de métastases était réduit de 45% dans le groupe 45

mg/kg (moyenne de 2,6 métastases, non significatif) et de 86,7% dans le groupe 90 mg/kg (0,5 métastase,  $p < 0,001$ ) comparé au groupe contrôle (3,75 métastases).

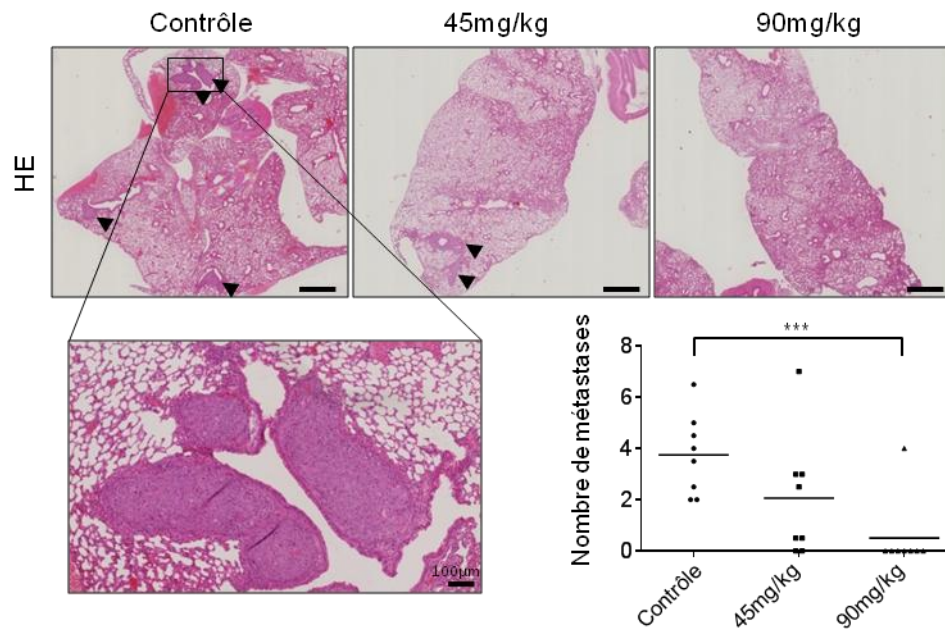


Figure 68 : TH1579 réduit l'apparition de métastases pulmonaires dans un modèle murin *in vivo* d'OS. Les poumons des souris appartenant aux groupes non traité, 45mg/kg et 90mg/kg ont été prélevés après le sacrifice et colorés à l'hématoxyline-éosine. Les métastases pulmonaires (indiquées par les flèches) ont été comptées. La barre d'échelle représente 100µm. (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ).

L'impact *in vivo* de l'inhibition de MTH1 sur l'angiogénèse, mécanisme facilitateur de la dissémination métastastatique, a été évalué par immunohistochimie dans les tumeurs HOS-MNNG (Figure 69). Le marqueur des cellules endothéliales CD146 (J. Chen et al., 2017) est significativement diminué ( $p < 0,01$ ) dans le groupe 90 mg/kg (1,58%) comparé au groupe contrôle (2,01% ; diminution de 21%), indiquant une diminution de l'angiogénèse pro-tumorale. La différence entre le contrôle et la condition 45mg/kg (1,94%) n'est cependant pas significative.

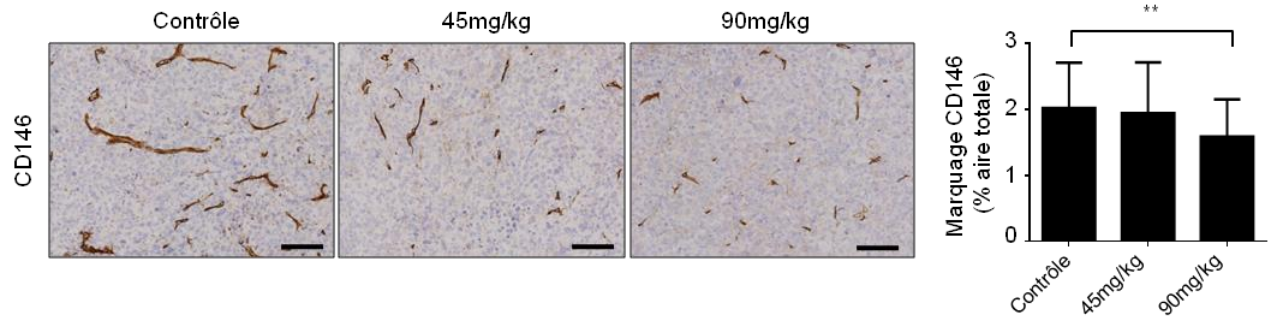


Figure 69:TH1579 réduit l'angiogénèse. Un anticorps ciblant CD146 a été utilisé afin de marquer les vaisseaux sanguins au sein de la tumeur. La quantification a été faite par analyse d'image. La barre échelle représente 100µm. (\* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001 ; \*\*\*\*=p<0,0001).

Afin de comprendre ces résultats, le nombre de CTC (Circulating tumor cells) ou DTC (Disseminated tumor cells) au niveau des poumons a été mesuré *in vivo*. Pour ce faire, des cellules HOS-MNNG-GFP ont été injectées en paratibial dans des souris. Cinq jours après l'injection, les souris ont été traitées avec 90 mg/kg de TH1579 ou le véhicule 3 fois par semaine pendant une semaine, puis sacrifiées. Les tumeurs ont été prélevées, ainsi que les poumons et le sang par ponction cardiaque. Les volumes tumoraux moyens étaient équivalents entre les deux groupes au moment du sacrifice : 89,6 mm<sup>3</sup> pour le groupe contrôle et 96,1 mm<sup>3</sup> pour le groupe traité TH1579. Ces volumes équivalents permettent d'exclure tout impact de la taille des tumeurs sur les paramètres observés (Figure 70).

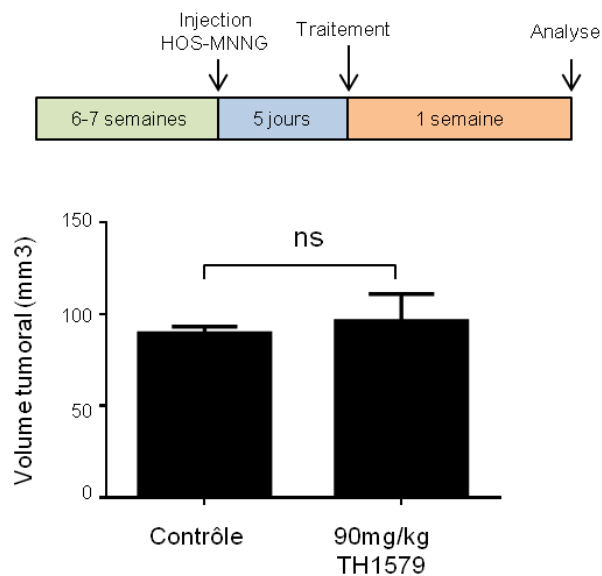


Figure 70 : TH1579 ne réduit pas la croissance tumorale après un traitement d'une semaine dans un modèle murin d'OS. Les souris ont été injectées en paratibial avec des cellules HOS-MNNG-GFP. Deux groupes de souris (N=3) ont été aléatoirement définis, et traités avec 90mg/kg de TH1579 ou le véhicule.

Les cellules tumorales GFP positives ont ensuite été isolées dans le sang (CTC) ou dans les poumons (après dilacération; DTC) grâce à la machine Parsotix (Angle), puis comptées grâce à un microscope à fluorescence (Figure 71). Dans le groupe contrôle 61 CTC/ml de sang ont été dénombrées contre 13 CTC/ml de sang dans le groupe traité, soit une diminution de 78,7%. TH1579 réduit le nombre de DTC dans les poumons de 63% passant de 68 cellules GFP positives dans le groupe contrôle à 25 cellules HOS-MNNG-GFP dans le groupe traité TH1579 90 mg/kg.

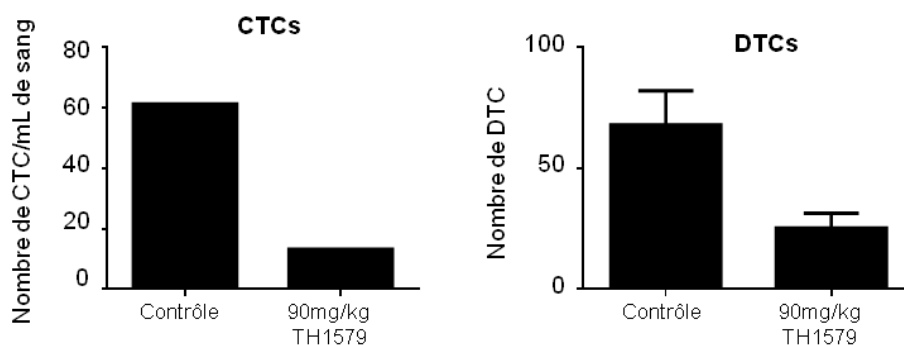
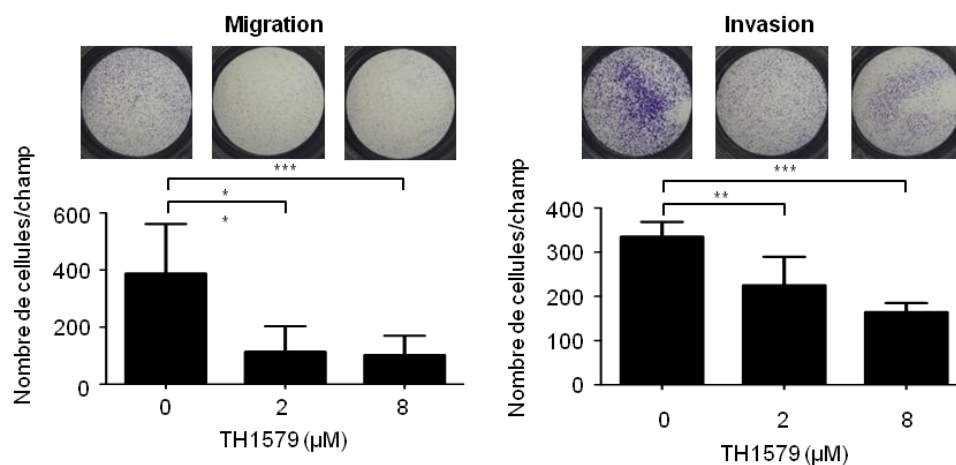


Figure 71 : TH1579 diminue le nombre de cellules tumorales circulantes ou disséminées, dans un modèle murin *in vivo* d'OS. Les cellules CTC (circulating tumor cells) et DTC (disseminated tumor cells) ont été comptées dans le sang et les poumons (respectivement) des animaux appartenant aux groupes traité 90mg/kg ou non traité.



Afin d'évaluer l'impact de MTH1 sur les mécanismes impliqués dans la dissémination métastatique, à savoir la migration et l'invasion des cellules HOS-MMNG, des expérimentations en chambres de boyden ont été effectuées *in vitro* (Figure 72). La migration est induite par un gradient de sérum et le traitement est ajouté dans le milieu, sans pré-traitement des cellules. Après comptage, les résultats montrent une réduction du nombre de cellules HOS-MMNG ayant migrées de 70% (113 cellules ;  $p < 0,01$ ) dans la condition TH1579 2 $\mu$ M et 73% (102 cellules par champ ;  $p < 0,001$ ) dans la condition TH1579 8 $\mu$ M respectivement comparées au contrôle (388 cellules). Les tests en chambres de boyden montrent également une réduction de l'invasion des cellules HOS-MNNG de 32,8% (225 cellules par champ ;  $p < 0,01$ ) après un traitement TH1579 2 $\mu$ M, et de 69,44% (164 cellules par champ ;  $p < 0,001$ ) pour une concentration de 8  $\mu$ M de TH1579, comparativement au contrôle (334 cellules).



**Figure 72 : TH1579 réduit la migration et l'invasion des cellules HOS-MNNG d'OS.** La migration et l'invasion cellulaire ont été mesurées *in vitro* dans les cellules HOS-MNNG grâce à un test en chambre de boyden (pores de 8 $\mu$ m). La migration cellulaire ou l'invasion est induite par un gradient de sérum de veau fœtal. Pour l'invasion, les inserts ont été coâtés avec du matrigel. La migration est réalisée sur 6h et l'invasion sur 23h. (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ).

Des expériences visant à évaluer l'impact de TH1579 sur la migration *in vivo* dans le zebrafish ont également été réalisées. Des cellules HOS-MNNG GFP positives ont été traitées pendant 4h avec 8 $\mu$ M de TH1579, ou avec du DMSO. Elles ont ensuite été injectées à des embryons de zebrafish, dans l'espace périvitellin, 24h après fertilisation. 24h après injection (48h post-fertilisation) le nombre de cellules ayant migré à la tête et à la queue de l'embryon a été

compté (Figure 73). Au niveau de la tête, le nombre de cellules tumorales entre les groupes contrôle (2,62) et traité (3) ne sont pas significativement différents. Au niveau de la queue, un test de Mann-Whitney montre une augmentation significative du nombre de cellules migrantes dans la condition traitée (8,63) comparé à la condition contrôle (5,12). L'expérience doit cependant être refaite et les résultats doivent être analysés avec précaution. En effet, 24h post-transfection, environ 40% des embryons du groupe contrôle n'avaient pas développé de tumeur au site d'injection. Ceci pourrait expliquer l'absence de cellules migrantes dans ce groupe.

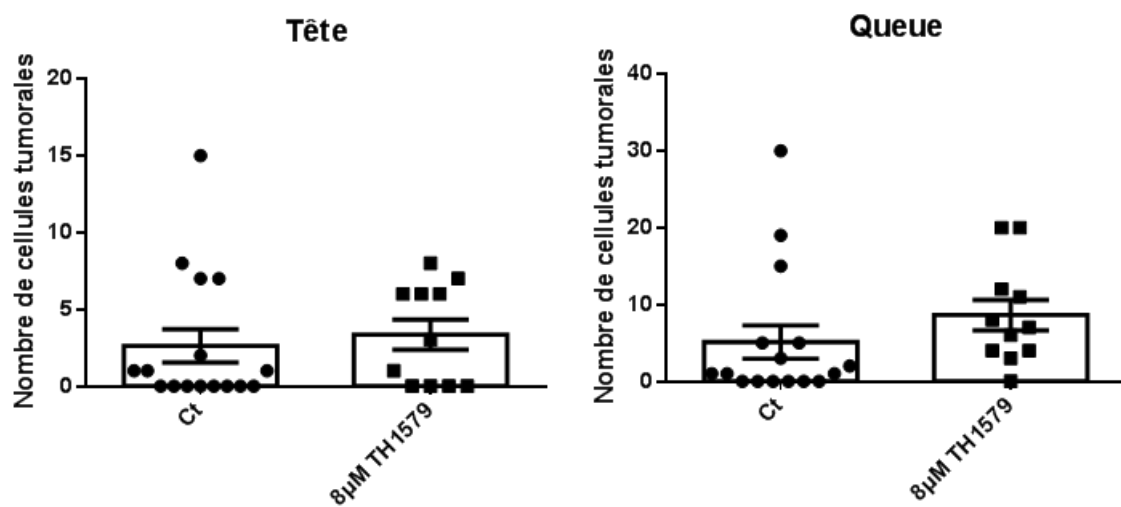


Figure 73 : TH1579 ne diminue pas la migration cellulaire *in vivo* dans un modèle de zebrafish. Le modèle utilisé est un modèle d'embryon de zebrafish injecté avec des cellules HOS-MNNG GFP prétraitées ou non avec 8µM de TH1579. Le nombre de cellules ayant migrées à la tête ou à la queue de l'animal a ensuite été compté. (\* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001 ; \*\*\*\*=p<0,0001).

### Effets de TH1579 sur l'ostéolyse tumorale

L'ostéolyse tumorale est l'un des symptômes de l'OS. De ce fait, les effets de TH1579 sur l'ostéolyse associée à la tumeur ont été évalués dans le modèle murin (groupes non traité, traités 45mg/kg ou 90 mg/kg) par micro-scanner. Le paramètre BV (Bone Volume) du tibia portant la tumeur n'est pas modifié entre les groupes traités TH1579 45mg/kg ou 90mg/kg, et le groupe contrôle. Le BV/TV (Bone Volume sur Total Volume représentant l'os trabéculaire) est augmenté de 17% dans le groupe TH1579 90 mg/kg comparé au groupe contrôle, mais

cette augmentation n'est pas significative pour un risque  $\alpha$  de 5% ( $p$  value = 0,0508) (Figure 74).

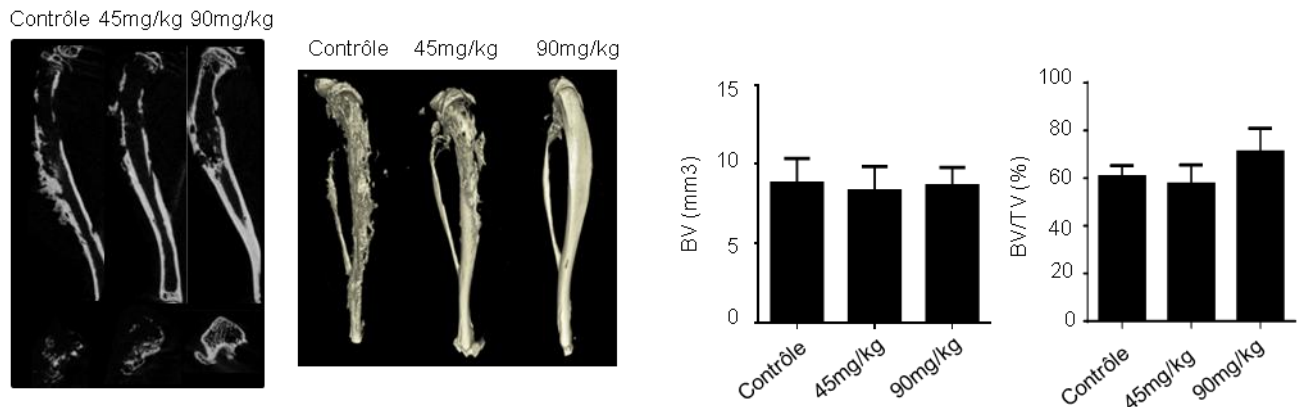


Figure 74 : TH1579 réduit l'ostéolyse tumorale dans un modèle murin *in vivo* d'OS. Les paramètres osseux ont été mesurés après microscanner, dans les groupes de souris Ct, 45mg/kg ou 90mg/kg. BV (Bone Volume), BV/TV (Bone Volume over Total Volume).

La quantité d'ostéoblastes, cellules productrices d'os, a été évaluée par marquage du facteur de transcription ostéix (OSX), impliqué dans la différenciation des ostéoblastes (Narayanan et al., 2019). Les résultats sont exprimés en OB number/BS (nombre d'ostéoblastes par surface osseuse) (Figure 75). Une augmentation du nombre d'ostéoblastes (rapporté à la surface osseuse) est observée dans les deux groupes traités TH1579 : 2,08 et 3,95 pour les groupe 45 mg/kg (différence non significative) et 90 mg/kg ( $p < 0,01$ ) respectivement, comparé au contrôle (1,25). Cependant, le nombre d'ostéoclastes, évalué par marquage TRAP et rapporté à la surface osseuse, est également plus important après traitement TH1579. Il est multipliée par 2,9 dans le groupe TH1579 45 mg/kg (0,063 ;  $p < 0,05$ ) et 3,9 dans le groupe TH1579 90 mg/kg (0,085 ;  $p < 0,01$ ), comparé au groupe contrôle (0,021).

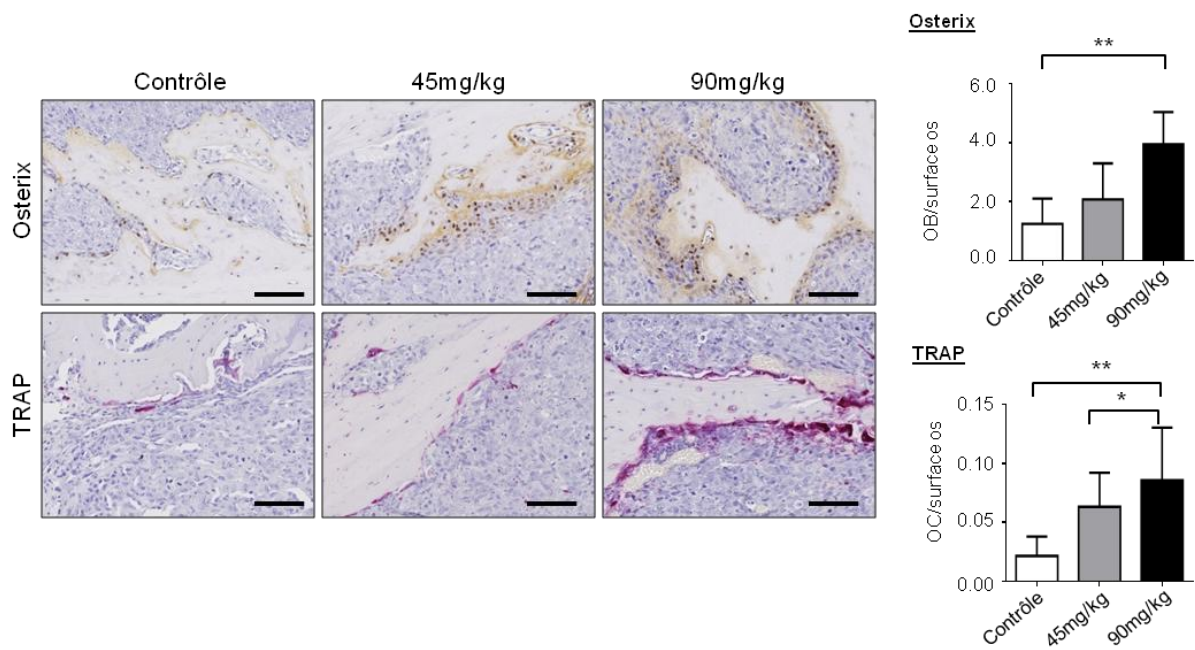


Figure 75 : TH1579 réduit le nombre d'ostéoblastes et d'ostéoclastes *in vivo*, dans un modèle murin d'OS. La quantification des ostéoblastes et des ostéoclastes a été évaluée par marquage Osterix ou TRAP respectivement dans les tumeurs des animaux des différents groupes. Les résultats de la quantification sont représentés en nombre d'ostéoclastes (OC) ou ostéoblastes (OB) par surface osseuse (Bone surface : BS). OcS = Ostéoclastes. OB = ostéoblastes, BS = bone surface. La barre échelle représente 100µm. (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ).

Les effets de TH1579 sur les cellules osseuses ont également été évalués *in vitro* sur des précurseurs ostéoclastiques CD14+ humain (Figure 76) et des cellules souches mésenchymateuses humaines (Figure 76). À basse concentration (de 0,125µM à 2µM), TH1579 réduit la différenciation des ostéoclastes comparativement à un contrôle DMSO, sans effet sur la viabilité des précurseurs ostéoclastiques. Cependant, dès 1,25µM, TH1579 réduit la viabilité de MSC à 7 jours, ainsi que la minéralisation, comparé à un contrôle DMSO (Figure 77).

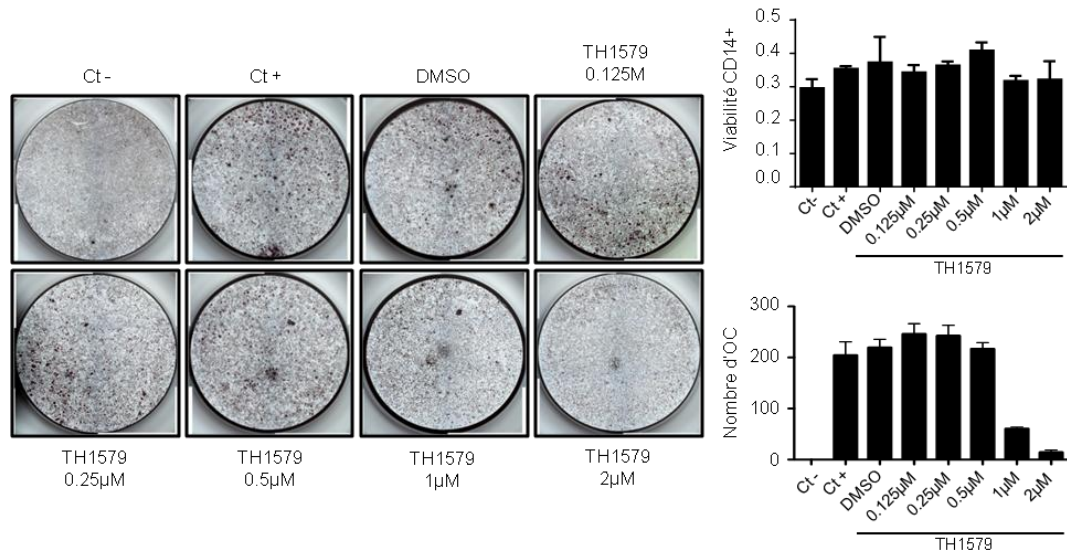
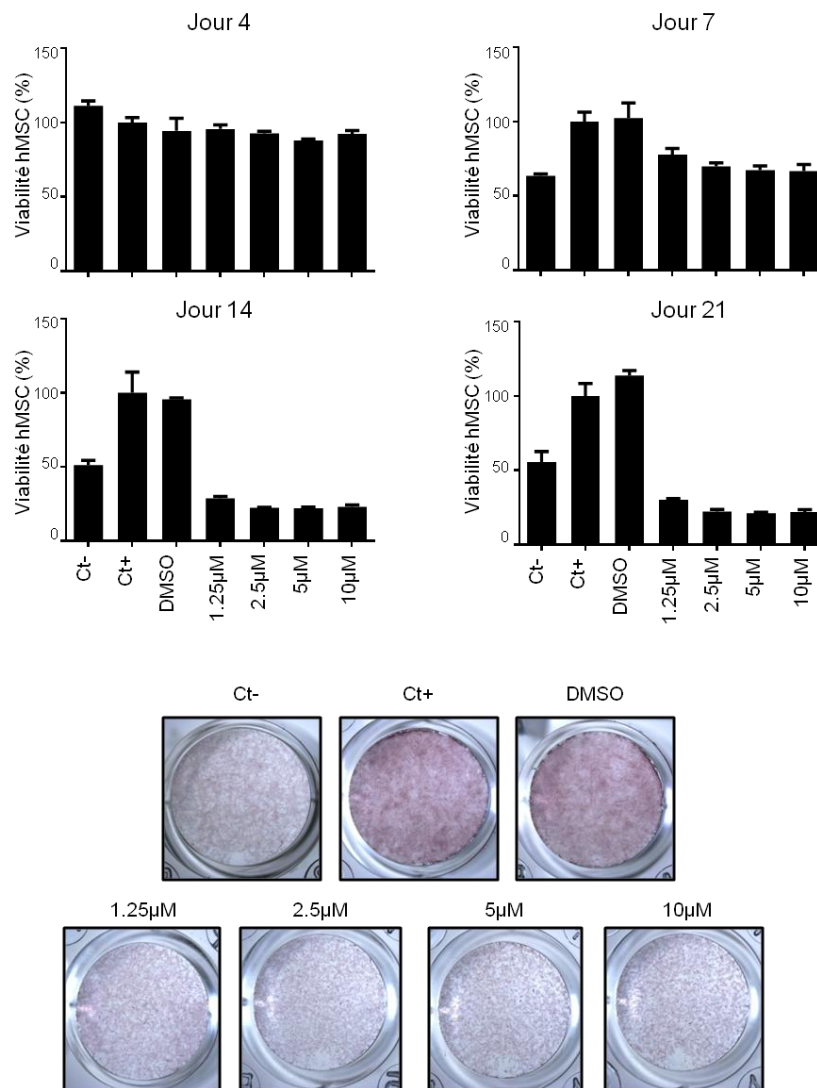


Figure 76 : TH1579 réduit la différenciation ostéoclastique *in vitro*. Les cellules CD14+ (précurseurs ostéoclastiques) ont été soumises à un test de viabilité (crystal violet) après 7 jours de traitement par TH1579 (sans RANKL) aux concentrations indiquées. La différenciation des CD14+ a été mesurée par comptage, après 7 jours de traitement par TH1579 (+/-RANKL) aux concentrations indiquées. Le contrôle négatif de différenciation (Ct-) correspond à des CD14+ sans RANKL dans leur milieu de culture.



**Figure 77 : TH1579 réduit la viabilité et la différenciation des MSC *in vitro*.** Les MSC ont été cultivées dans un milieu de prolifération (décrit dans les méthodes) pendant 4 jours, puis dans un milieu de différenciation (décrit dans les méthodes) contenant les concentrations indiquées de TH1579 pendant 17 jours. La condition Ct- correspond à des cellules cultivées sans milieu de différenciation. La minéralisation a été observée à 21 jours par une coloration rouge alizarine. Le test de viabilité a été réalisé en milieu de prolifération aux doses et jours indiqués.

Des MSC sont ensemencées en plaque 6 puits (48.000 cellules par puits) dans du milieu de prolifération ( $\alpha$ -MEM (Invitrogen Life Technologies), Lysat Plaquettaire humain 5%, Pénicilline/Streptomycine 1%). Après 4 jours le milieu de différenciation est ajouté, composé comme suit : milieu de prolifération, 10 mM de  $\beta$ -glycerophosphate, et 100 nM de dexaméthasone, plus TH1579 aux concentrations indiquées. À 7 jours, le milieu est changé et remplacé par un milieu de différenciation contenant 250  $\mu$ M d'acide ascorbique, de la vitamine B3, et la molécule. Le milieu est changé tous les 4 jours et la minéralisation est visualisée par coloration rouge alizarine à 21 jours. Le contrôle négatif est cultivé dans un

milieu de prolifération simple (sans  $\beta$ -glycerophosphate, vitamine D3, acide ascorbique ou dexaméthasone). Pour le test de prolifération, les cellules sont cultivées dans le milieu de prolifération, avec changement de milieu tel que décrit précédemment. Un crystal violet (voir précédemment) est réalisé à 4, 7, 14 et 21 jours.

## DISCUSSION PARTIE II

L'enzyme MTH1 dégrade les nucléotides oxydés issus du stress oxydatif, avant leur intégration dans l'ADN. Sa fonction lui permettrait de soutenir la transformation maligne et la prolifération tumorale. Le rôle supposé de MTH1 dans les cancers a permis le développement d'inhibiteurs de son activité enzymatique (TH588, TH1579, S-Crizotinib) (Gad et al., 2014; Helleday, 2014; Huber et al., 2014; Rai et al., 2010). Les cellules d'OS, comme toutes les cellules tumorales, présentent un haut niveau de stress, ce qui pourrait indiquer une addiction à MTH1. En concordance avec cette hypothèse, l'expression de MTH1 s'est avérée dans nos expériences être plus élevée dans plusieurs lignées tumorales et dans des biopsies de patients, comparativement à des cellules souches mésenchymateuses.

Le but de cette étude était d'évaluer les effets thérapeutiques des inhibiteurs TH588 et TH1579 de MTH1, dans un contexte de controverse sur l'intérêt du ciblage de la protéine dans les cancers (Kawamura et al., 2016; Kettle et al., 2016; Petrocchi et al., 2016). Ainsi nous avons observé des effets antitumoraux des inhibiteurs TH588 et TH1579 dans l'OS, avec une diminution significative de la viabilité et une augmentation de l'apoptose. Ces résultats concordent avec ceux décrits dans d'autres études (Gad et al., 2014; Pudelko et al., 2017; Warpman Berglund et al., 2016a; Zhou et al., 2019). Les effets anti-tumoraux des inhibiteurs de MTH1 sont liés à l'induction de lésions 8-oxo-dG dépendante, et peuvent être contrecarrés par l'ajout de l'homologue bactérien de MTH1 (Warpman Berglund et al., 2016b). TH1579, également connu sous le nom de Karonudib, est actuellement en essai clinique de phase I chez des individus atteints de tous types de cancers (NCT03036228).

L'inhibition de MTH1 par siARN ou shARN réduit la viabilité dans nos lignées testées. Celle-ci est cependant moins importante qu'avec les inhibiteurs chimiques TH588 et TH1579. Cela pourrait indiquer que MTH1 n'est peut-être pas la seule cible de ces molécules chimiques, et que ces dernières doivent faire l'objet d'études plus approfondies. Concernant TH1579, il a été montré par des expériences combinant CETSA et spectrométrie de masse, que cette molécule lie fortement MTH1, mais que son interaction avec d'autres protéines est possible, mais limitée (Warpman Berglund et al., 2016b).



Nos résultats d'ARN interférence confirment ceux de Qing et al. qui montrent également que l'inhibition de MTH1 par un siARN différent de celui utilisé dans notre étude réduit la croissance tumorale des cellules de la lignée HOS-MNNG, MG63 et U2OS (Qing et al., 2018). Gad et al. (équipe de T. Helleday) ont également montré une diminution de la viabilité en utilisant un troisième siARN ciblant MTH1. Cette baisse de viabilité était, dans leur expérience, contrecarrée par la surexpression de MTH1, mais pas par la surexpression d'un mutant de MTH1 enzymatiquement inactif (Gad et al., 2014). Cela montre que la perte de l'activité enzymatique de MTH1 est bien responsable de la diminution de viabilité.

Cependant, Kettle et al. n'ont pas obtenu de diminution de la viabilité avec leur propre siARN qu'ils ont appelé AZ siMTH1, dans la lignée U2OS (Kettle et al., 2016). Néanmoins, ils observent une diminution de viabilité des cellules tumorales en utilisant le siARN utilisé par Gad et al., dans des proportions assez similaires (entre 60 et 70% de diminution de la viabilité cellulaire dans les deux études). Ce dernier résultat indique que le protocole de transfection n'est pas en cause. Kettle et al. ont ainsi déduit que le siARN utilisé par Gad et al. présente des effets off-target. Ils justifient cette affirmation par le fait que des expériences de Crispr-Cas9 sur la lignée SW480 (cancer du colon) n'ont pas abouti à une baisse de viabilité. Bien que le Crispr-Cas9 n'ait pas été réalisé dans la lignée U2OS, il faut préciser que Huber et al. ont observé une diminution de la viabilité dans la lignée SW480 en utilisant un siARN ciblant MTH1 (Huber et al., 2014), et que Gad et al. avaient précédemment montré une diminution de viabilité dans cette même lignée, mais en utilisant un shARN ciblant MTH1 (Gad et al., 2014). En réponse aux résultats de Kettle, l'équipe de Helleday a testé le AZ siMTH1 de Kettle et al., et a mis en évidence un effet cytotoxique dans la lignée NTUB1/P de carcinome urothélial (Warpman Berglund et al., 2016b). Le même siARN semble donc avoir des effets opposés dans deux lignées différentes.

Plusieurs études ont également indiqué que l'inhibition chimique de MTH1 n'affecte ni la viabilité ni la mort cellulaire (Kawamura et al., 2016; Kettle et al., 2016; Petrocchi et al., 2016). Cependant, l'inhibiteur TH588 a montré des effets cytotoxiques dans plusieurs types de cancers (Helleday, 2014; Rai et al., 2010).

Nous avons montré par comet assay et observation de la phosphorylation de H2AX que TH588 et TH1579 induisent l'apoptose en augmentant les dommages à l'ADN. Ces résultats

corrèlent avec ceux précédemment décrits dans la littérature (Arczewska et al., 2018; Gad et al., 2014; Patel et al., 2014; Warpman Berglund et al., 2016b). De plus, comme décrit dans la littérature (Gad et al., 2019), TH1579 induit un blocage du cycle cellulaire à faible dose. Gad et al. ont montré que MTH1 promeut la polymérisation de la tubuline lors du cycle cellulaire. De ce fait, l'inhibition de MTH1 empêche la polymérisation du fuseau mitotique, stoppant ainsi le cycle cellulaire (Gad et al., 2019).

Notre étude a également montré que TH1579 diminue la croissance tumorale, et augmente les dommages à l'ADN *in vivo*. Plusieurs études ont également montré que l'inhibition de MTH1 réduit la croissance tumorale (Arczewska et al., 2018; Gad et al., 2014; Huber et al., 2014; Zhou et al., 2019). Il est important de signaler que notre modèle murin a été obtenu par injection de cellules HOS-MNNG possédant une mutation de p53 (Diller et al., 1990). La présence de dommages à l'ADN après inhibition de MTH1 tend à prouver que ceux-ci sont indépendants du statut p53 de la cellule comme déjà montré dans la littérature (Arczewska et al., 2018).

De plus, TH1579 réduit la vascularisation tumorale et l'apparition des métastases pulmonaires dans notre modèle. TH1579 réduit également les phénomènes de migration et d'invasion cellulaire *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats concordent avec ceux de la littérature (Arczewska et al., 2018; Qing et al., 2018). En effet, Arczewska et al. ont montré que l'inhibition de MTH1 par siARN réduit de manière significative la migration et l'invasion cellulaire dans le cancer de la thyroïde, en modulant l'activité et l'expression des MMPs (Matrix Metalloprotases) (Arczewska et al., 2018). L'inhibiteur (S)-crizotinib réduit également les capacités migratoires des cellules HOS-MNNG et U2OS *in vitro* (Qing et al., 2018). Nous avons montré que le traitement TH1579 réduit l'ostéolyse tumorale dans notre modèle d'OS murin. Toutefois cet effet est probablement dû au fait que le volume tumoral est moins important après traitement par TH1579. Nous avons observé que Th1579 inhibe la différenciation ostéoclastique *in vitro*, mais augmente le nombre d'ostéoclastes *in vivo*. Des expériences supplémentaires seront donc nécessaires avant de conclure sur les effets de TH1579 sur l'ostéoclastogénèse.

Bien que l'intérêt de l'inhibition thérapeutique de MTH1 dans les cancers soit encore sujet au doute, nous avons démontré les effets antitumoraux de l'inhibiteur TH1579, *in vitro* et *in*

*vivo*. Cette étude est la preuve de concept que l'inhibiteur TH1579 peut être envisagé comme une alternative thérapeutique dans l'OS avec développement métastatique. Les travaux présentés dans cette partie sont en cours de soumission, avec l'auteur du présent manuscrit en premier auteur.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La recherche de cibles thérapeutiques dans l'OS est une tâche complexe du fait de l'hétérogénéité de la maladie. En effet, l'hétérogénéité limite l'efficacité des traitements et favorise les récives tumorales et l'émergence de résistances. Dans cette problématique, l'inhibition des mécanismes de défense contre le stress cellulaire apparaît comme une alternative thérapeutique intéressante, puisque les cellules tumorales sont soumises à un stress constant. Les objectifs de ma thèse étaient d'évaluer l'intérêt thérapeutique du ciblage de deux protéines du stress surexprimées dans l'OS : le facteur de transcription majeur de la réponse au stress HSF1 et l'enzyme MTH1 qui hydrolyse de nucléotides oxydés.

Dans la partie I de cette thèse, nous avons montré que HSF1 régule la prolifération, le cycle cellulaire, la migration et la mort cellulaire. Nous nous sommes intéressés aux cibles de HSF1 et avons identifiés des groupes de gènes qui pourraient expliquer les fonctions pro-tumorales du facteur de transcription. Nous avons observé que HSF1 pouvait se fixer à des séquences ADN (AP-1 et ETS) différentes de sa séquence consensus connue et nous avons montré que HSF1 interagissait avec un grand nombre de protéines. Certaines de ces protéines sont impliquées dans des processus tumoraux et peuvent potentiellement moduler l'activité biologique de HSF1. La suite du projet doit tenter d'identifier précisément les gènes cibles de HSF1 qui lui permettent de contrôler les différents processus cellulaires et donc de valider *in vitro* les analyses bioinformatiques. Cette identification pourrait notamment se faire par la comparaison des gènes régulés par HSF1 avec les données de la littérature, puis par des expériences dites de add-back (la surexpression de gènes cibles après inhibition de HSF1, afin d'inverser un phénotype).

Le fait que HSF1 reconnaisse des motifs appartenant à d'autres facteurs de transcription est intrigant. Une investigation approfondie de ce phénomène est importante pour cerner les rôles de HSF1 dans l'OS. L'une des hypothèses possible est que la fixation de HSF1 aux motifs AP-1/ARE et ETS est facilitée par des cofacteurs protéiques. Par exemple, un CHIP sequencing réalisé dans les cellules de leucémie myéloïde aigüe, a permis de montrer que TRIM33 est retrouvé au niveau de sites de fixation des membres des familles AP-1 (FOSL1) et ETS (Erg et

Pu.1 (SPI1, spleen focus forming virus proviral integration oncogene)) (voir Figure 78) (E. Wang et al., 2015).

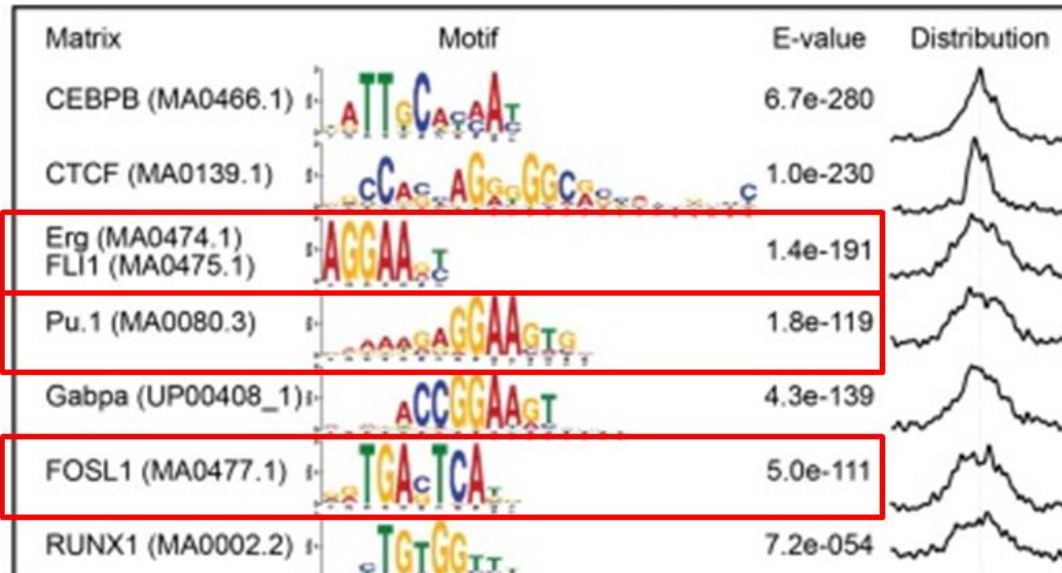


Figure 78 : TRIM33 est retrouvé au niveau des sites de fixation des facteurs de transcription des familles ETS et AP-1, encadrés dans la figure ci-dessus (résultats de (E. Wang et al., 2015)).

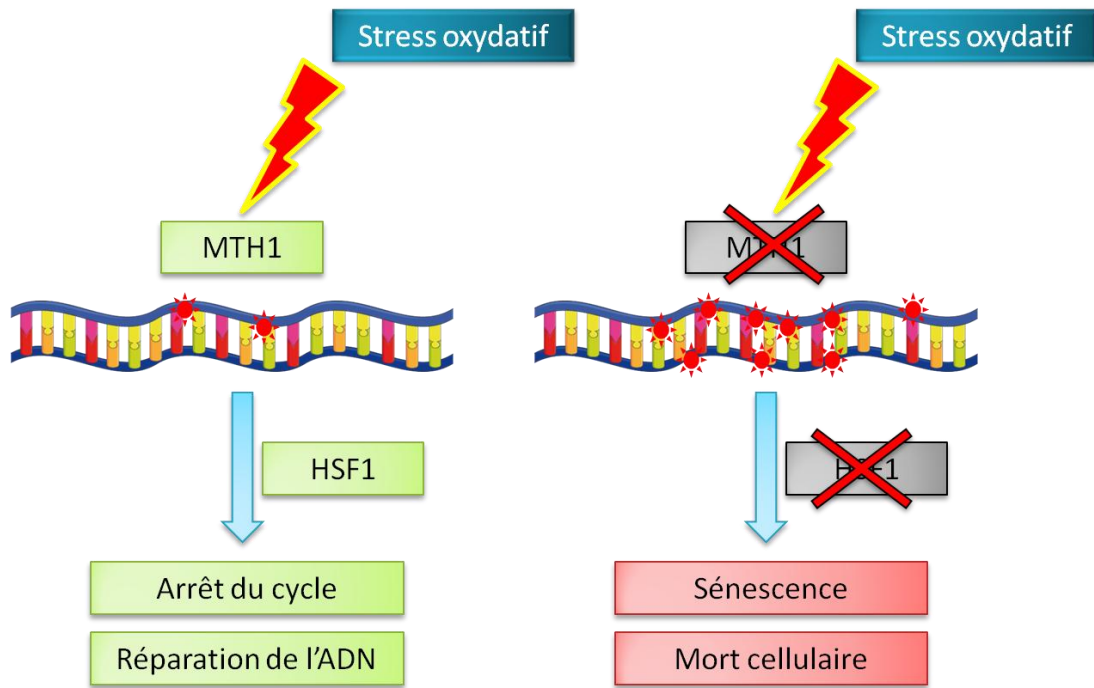
TRIM33 et HSF1 interagissent ensemble, et sont de plus tous les deux retrouvés au niveau de motifs AP-1 et ETS. S'il s'avère que la fixation de HSF1 sur des motifs autres que le motif HSE est bien due à un cofacteur protéique, alors TRIM33 pourrait être un bon candidat. Il serait donc intéressant de déterminer si HSF1 et TRIM33 se retrouvent au niveau des mêmes sites de fixation, et de dresser la liste des gènes régulés par ce complexe. Cette information faciliterait grandement la compréhension du rôle de TRIM33 dans la fixation de HSF1 à l'ADN.

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés aux effets de deux inhibiteurs chimiques de MTH1 dans l'OS. Ces inhibiteurs, TH588 et TH1579, ont démontré une activité anti-tumorale en diminuant la prolifération, la migration cellulaire et en induisant la mort par apoptose dans des cellules d'OS. *In vivo*, l'inhibition de MTH1 réduit la croissance tumorale et inhibe le développement de métastases pulmonaires dans un modèle murin d'OS. Les effets des inhibiteurs de MTH1 sont dus à l'intégration de

nucléotides oxydés dans la double hélice, et l'induction de dommages à l'ADN. Ce travail est terminé et en cours de soumission.

Nos travaux démontrent donc l'intérêt du ciblage thérapeutique des protéines du stress, et plus particulièrement de HSF1 et MTH1, dans l'OS. Cependant, il pourrait être intéressant d'investiguer les effets de l'inhibition combinée de multiples protéines clés du stress. En effet, comme décrit dans la partie introductive de cette thèse, les différentes voies de réponse au stress cellulaire interagissent. Par exemple, l'activation constitutive de HSF1 protège du stress du RE (Liu and Chang, 2008a). Il a également été décrit que la transcription de NRF2, le régulateur de la réponse au stress oxydatif, est activée en cas de stress du RE (Cullinan et al., 2003; Cullinan and Diehl, 2004). De plus, la transcription de HSF1 est activée par NRF2 en cas de stress oxydatif, et ces deux facteurs de transcription possèdent des cibles communes (HSP27 et HSP70 par exemple) (Jain et al., 2010; Paul et al., 2018a; Samarasinghe et al., 2014). Dans ce contexte, l'inhibition simultanée de plusieurs voies du stress cellulaire pourrait permettre de prévenir d'éventuels mécanismes de résistances dus à des voies alternatives.

Le ciblage de multiples protéines du stress pourrait également accroître l'efficacité de la stratégie thérapeutique. Par exemple, nous avons montré que l'inhibition de MTH1 induit des dommages à l'ADN. Nous avons également montré que HSF1 régule des checkpoints du cycle cellulaire ainsi que la sénescence induite par les dommages à l'ADN ou le stress cellulaire (voir Tableau XII). De plus, HSF1 régule la réparation de l'ADN de manière directe (voir Tableau XII), mais également de manière indirecte via les protéines chaperonnes (Dubrez et al., 2019). L'inhibition simultanée de HSF1 et de MTH1 pourrait donc augmenter la fréquence des dommages à l'ADN tout en empêchant sa réparation, et entraîner la sénescence des cellules tumorales (Figure 79).



☀ Dommages de l'ADN

Figure 79 : Effets de l'inhibition de MTH1 et HSF1 sur la cellule tumorale. L'inhibition de MTH1 induit une augmentation des dommages à l'ADN. L'inhibition de HSF1 induit, entre autres, la sénescence et la mort cellulaire.

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## Culture cellulaire

Les lignées cellulaires (143B, Cal72, G292, KHOS, HOS-MNNG, MG63, U2OS et SJS-1) utilisées proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC). Elles sont cultivées sans antibiotiques, dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Lonza), supplémenté à 10 % de Sérum de Veau Fœtal et 2 mmol/L L-glutamine, dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO<sup>2</sup>. Le décollage des cellules se fait avec la trypsine fournie par Lonza.

## Transfection et transduction

La transfection est réalisée sur des cellules à 80-90% de confluence, 24h après ensemencement. Les cellules sont ensuite décollées 24h après transfection pour les tests de migration et invasion, et 48h après, pour les tests de prolifération, du cycle cellulaire et d'apoptose. Le siHSF1 (sc-35611) et le siRNA control (sc-37007) proviennent de Santa Cruz Biotechnology et sont utilisés à des concentrations de 30nM.

Les transductions sont réalisées grâce à des lentivirus produits à partir de plasmides provenant de Merck : shHSF1 (NM\_005526) « mission » shRNA référence TRCN0000007483. Le shARN contrôle est le « mission » shARN contrôle SHC002 (Merck). La transduction est réalisée en laboratoire L3, sur 72h afin de s'assurer de l'élimination complète des virus, puis les cellules sont lavées et décollées avant leur utilisation dans les diverses expériences. La MOI (multiplicity of infection) utilisée est de 20 pour le shHSF1 et de 10 pour les shMTH1.

Le siARN MTH1 provient de Santa Cruz Biotechnology (référence sc-62647). Les shARN utilisés dans le projet MTH1 sont un don de Bob Weinberg (Addgene plasmides # 21297 et # 21298) (Rai et al., 2009b).



## Molécules chimiques

Les inhibiteurs de MTH1, TH588 and TH1579 sont fournis par le Karolinska Institutet. Les drogues sont diluées dans du dimethyl sulfoxide (DMSO) à 10mM et stockées à -20°C pour les tests *in vitro*. Pour les analyses *in vivo*, le TH1579 est dilué dans du tampon acetate plus cyclodextrine.

## Test de viabilité et test clonogénique

Dans le projet I (HSF1), les cellules sont transfectées pendant 48h ou transduites pendant 72h, puis décollées et réensemencées à 2000 cellules par puits en plaque 96 puits (prolifération). Les plaques de prolifération sont arrêtées 24, 48, 72 et 96h après l'ensemencement, et celles de clonogénicité sont arrêtées une semaine après l'ensemencement.

Dans le projet MTH1 Entre 2000 et 6000 cellules tumorales sont ensemencées en plaques 96 puits, en fonction de la vitesse de prolifération de la lignée. Après adhésion les cellules sont traitées avec des concentrations croissantes d'inhibiteur MTH1 allant de 0,0078 à 20µM, en triplica, pendant 72h.

À la fin de l'expérience, les cellules sont fixées 5 minutes sous agitation avec 11µL d'une solution de glutaraldéhyde 10% (glutaraldéhyde dilué dans de l'eau distillée), rincées à l'eau distillée puis colorées pendant 5 minutes sous agitation avec 100µL de crystal violet (0,1% de crystal violet et 20% d'éthanol dans de l'eau). Après une deuxième étape de lavage à l'eau et une étape de séchage de 24h, un volume de 50µL de solution de Sorensen (citrate trisodique, HCl 0,1N et éthanol) est utilisé pour dissoudre les cristaux de colorant qui s'introduisent dans les cellules vivantes lors de la coloration. Une lecture de l'absorbance à 570nm par un spectrophotomètre (Perkin Elmer Wallac 1420 Victor<sup>2</sup>) permet ensuite de quantifier la viabilité cellulaire. Après soustraction du blanc, la DO d'un puits contenant uniquement de la solution de Sorensen, les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité, comparativement à la condition contrôle:

$$\% \text{ viabilité cellulaire} = (\text{DO condition} / \text{DO contrôle}) \times 100$$

Le test de clonogénicité est réalisé en plaque 6 puits, à raison de 1000 cellules par puits, soit après une transfection (48h)/transduction (72h), ou après un traitement de 48h au TH588 ou au TH1579. Une semaine après ensemencement, quand les colonies ont atteint une taille suffisante, les cellules sont fixées 5 minutes sous agitation avec 200µL d'une solution de glutaraldéhyde 10% ajoutée directement dans le milieu de culture. Elles sont ensuite colorées avec 500µL de la solution de crystal violet préparée telle que décrit précédemment, pendant 5 minutes sous agitation.

### *Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux*

Les cellules du projet HSF1 sont transfectées avec les siARN (30nM) pendant 48h ou transduites avec les shARN (MOI 20) pendant 72h. Les cellules du projet MTH1 sont traitées durant 48h avec TH588 ou TH1579 aux concentrations indiquées.

Les cellules sont ensuite décollées à la trypsine (Lonza) en conservant le milieu de culture contenant les cellules mortes. Après une centrifugation de 5 minutes à 1600rpm, le culot cellulaire est lavé au PBS, fixé à l'éthanol 70% 4°C pendant 30min sous agitation. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4°C 2500rpm pendant 5 minutes. Le culot est lavé avec du PBS puis repris dans 200µL d'un tampon phosphate citrate, contenant 192mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M et 8mL d'acide citrique 0.1 M. Les cellules sont agitées à 4°C pendant 10 minutes pour la lyse cellulaire. Après une deuxième étape de lavage suivie d'une centrifugation de 5 minutes à 4°C 2500rpm, le culot est traité avec 200µL d'une solution à 500µg/mL de RNA-ase à 37°C et pendant 30 minutes. Après une dernière centrifugation, le culot est incubé à l'obscurité à température ambiante avec 1mL d'une solution d'iodure de propidium (50µg/mL), pendant 30 minutes. La cytométrie en flux est réalisée sur un cytomètre BD LSRFortessa™ X-20 (BD biosciences) et les résultats sont analysés avec le logiciel Flowlogic (Inivai Technologies).

## *Extraction protéique, dosage protéique et test caspase*

Après traitement, le culot cellulaire lavé au PBS est resuspendu dans du de tampon de lyse, le tampon RIPA (RadioImmuno Precipitation Assay NaCl 150mM, Tris-HCL 50mM, Nonidet P-40, 1%, Acide désoxycholique 0,5%, SDS 0,1% et eau). Le tampon RIPA est additionné d'inhibiteurs de proteases, dont le fluorure de phenylmethylsulfonyl (dilution au 1/100eme d'une solution de 50mM) et l'orthovanadate de sodium (dilution au 1/200eme d'une solution de 200mM). Le dosage protéique est réalisé grâce à une solution de sulfate de cuivre et d'acide bicinchoninique (Merck), en utilisant une gamme de BSA (sérum albumine bovine) : 50, 100, 200, 300, 400, 500µg/mL.

L'activité des caspases-3/7 est mesurée dans l'extrait protéique grâce au kit Apo-ONE caspase 3/7 de promega. Le test est réalisé dans des plaques 96 puits noires opaques. Chaque puits contient 25µL du réactif Apo-ONE® Caspase-3/7 dilué au 1/100eme dans le tampon fourni, 15µL de tampon RIPA et 10µL d'extraits protéiques (volume final 50µL). Après homogénéisation sur un agitateur, la plaque est incubée à température ambiante pendant une nuit, recouverte de parafilm. La fluorescence émise est ensuite mesurée sur un spectrophotomètreTristar LB 941 (Berthold Technologies) à 521 nm et la DO obtenue est rapportée à 1µg de protéines.

## *Co-immunoprécipitation et Western Blot*

Après extraction protéique et dosage des protéines, 500µg de protéines sont mélangées dans un tube avec 40µL de billes d'agarose (sc-2003, Santa cruz biotechnology) et l'anticorps dilué selon les recommandations du fournisseur. L'agitation se fait à 4°C sur la nuit. Les billes d'agarose sont ensuite précipitées par centrifugation à 3000rpm et 4°C, et lavée 3 fois (centrifuger à 3000rpm et 4°C) au tampon Pierce IP Lysis Buffer (Thermo fisher scientific). Après le dernier lavage les billes d'agarose sont reprise dans du tampon laemmli (2,5mL de tris pH 6,8 1M ; 4mL de SDS 10%, 4mL de glycérol 100%, 0,02% de bleu de bromophénol, 1mL de B-mercaptoethanol et eau quantité suffisante pour 20mL).

La migration des échantillons de western blot (repris à 30µg dans du tampon laemmli) est réalisée à 70V dans des systèmes Mini Gel Tank (thermofisher scientific). Les échantillons protéiques sont ensuite transférés sur des membranes de Poly Vinylidene Fluoride Immobilon-FL (Merck) grâce au système Mini Gel Tank (30V sur la nuit) puis saturées 1h à température ambiante avec du tampon Odyssey Blocking Buffer (LI-COR). L'incubation avec l'anticorps primaire se fait au 1/1000<sup>ème</sup>, à 4°C et sur la nuit. Après un lavage 3 fois 5 minutes avec un tampon PBS tween 0,05 %, la membrane est de nouveau saturée tel que décrit précédemment et incubée 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire au 1/5000<sup>ème</sup>. Le Tableau VIII regroupe les anticorps utilisés dans ce travail. Les anticorps secondaires utilisés sont ceux de la gamme IRDye de Li-Cor, dilués au 1/5000<sup>ème</sup>. La fluorescence est lue grâce au système d'imagerie Odyssey Fc de LI-COR. La taille des bandes est estimée grâce au marqueur de taille ProSieve Quad color protein marker (Lonza).

Anticorps	Fournisseurs	Références
<b>C-Fos</b>	Cell signaling technology	2250
<b>GAPDH</b>	Cell signaling technology	2118
<b>gH2AX</b>	Cell signaling technology	9718
<b>H2AX</b>	Cell signaling technology	2577
<b>HDAC2</b>	Cell signaling technology	5113
<b>pHSF1</b>	Genetex	GTX61682
<b>HSF1</b>	Cell signaling technology	4356
<b>HSF1</b>	Sigma/Merck	SAB1402812
<b>HSP27</b>	Cell signaling technology	2402
<b>HSP70</b>	Santa cruz Biotechnology	Sc-24
<b>HSP90</b>	Santa cruz Biotechnology	Sc-1055
<b>MSH2</b>	Cell signaling technology	2850
<b>MTH1</b>	Novus Biologicals	NB 100-109
<b>NACA</b>	Novus Biologicals	H00004666-B01P
<b>PARP</b>	Cell signaling technology	9542
<b>RUNX2</b>	Cell signaling technology	8486
<b>SMC1A</b>	Cell signaling technology	6892

<b>TRIM33</b>	Cell signaling technology	13387
<b>Vinculine</b>	Cell signaling technology	E1E9V
<b>ZMYND8</b>	Santa cruz Biotechnology	sc-100824
<b>ZMYND8</b>	abcam	ab201452
<b>ZNF687</b>	Novus biologicals	NBP2-41175

Tableau VIII : Anticorps utilisés dans les parties I et II.

### Extraction d'ARN, Reverse transcription et QPCR

L'ARN est extrait grâce au kit Nucleo Spin plus (Macherey-Nagel). 2µg d'ARN sont rétro-transcrit grâce au kit maxima H minus first strand cDNA synthesis (Thermo scientific), puis dilués afin d'obtenir une concentration d'ADN de 10ng/µL. La QPCR est réalisées avec le kit SYBR Select Master Mix (Applied Biosystem) contenant une ADN polymérase et un agent fluorescent, le Sybr Green, sur le thermocycleur CFX96 real time system (Biorad). Les résultats obtenus sont normalisés par rapport à deux gènes de référence (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), Beta-2-microglobuline (B2M)). Les séquences des amorces utilisées sont répertoriées dans le Tableau XI. Les tableaux Tableau IX et Tableau X représentent le volume réactionnel de la QPCR et les paramètres du thermocycleur. Les détails de l'extraction d'ARN, la reverse transcription et la QPCR sont présentés en annexe (Moukengue et al., 2019).

Réactifs	Volume (µL)
<b>SYBR green Master Mix (2X)</b>	5
<b>Amorce sens (2.5µM)</b>	0.60
<b>Amorce antisens (2.5µM)</b>	0.60
<b>Eau</b>	1.80
<b>ADNc (10ng/µL)</b>	2
<b>Total</b>	10

Tableau IX : Volume réactionnel de qPCR.

Étape	Température (°C)	Durée
Uracil-DNA glycosylase activation	50	2 m
Activation AmpliTaq® DNA Polymerase	95	3 m
Dénaturation	95	15 s
Hybridation/Élongation	60	50 s
Melt curve	65 to 95 (incrément de 0.5°C)	5 s

} 40 fois

Tableau X : Protocole du thermocycleur.

Amorces	Sequences
ATF3 sens	CGGAGCCTGGAGCAAAATGAT
ATF3 antisens	TGGCAGAAGCACTCACTTCC
C-FOS sens	ACTACCACTCACCCGAGAC
C-FOS antisens	CCAGGTCCGTGCAGAAGT
C-JUN sens	ACAGCTTCATGCCTTTGTAA
C-JUN antisens	CTCAGAGTGCTCCAAATCTC
HDAC2 sens	CTGCTACTACTACGACGGTGATA
HDAC2 antisens	GTCATGCGGATTCTATGAGGC
HSF1 sens	CTCCTGGCCATGAAGCAT
HSF1 antisens	GCTTGTTGACGACTTTCTGTTG
HSP27 sens	TCCCTGGATGTCAACCACTT
HSP27 antisens	GATGTAGCCATGCTCGTCCT

<b>HSP70 sens</b>	ACCCTAATGTCCGCACTCGGTG
<b>HSP70 antisens</b>	AATTATAGGCGTGAGCCACCGTGC
<b>HSP90 sens</b>	GATGATGAGCAGTACGCTTGG
<b>HSP90 antisens</b>	CTTTTGTTCCACGACCCATAG
<b>MSH2 sens</b>	TTTCGACCGGGGCGACTT
<b>MSH2 antisens</b>	TGCAGATTCTTTGCTCCTGCC
<b>MTH1 sens</b>	GTGCAGAACCCAGGGACCAT
<b>MTH1 antisens</b>	GCCCACGAACTCAAACACGA
<b>NACA sens</b>	CTTCCTTCTGCAACAGGCGT
<b>NACA antisens</b>	CGGGCATTTCGTGCAGGGAA
<b>RUNX2 sens</b>	GCCTAGGCGCATTTCAGA
<b>RUNX2 antisens</b>	GCTCTTCTACTGAGAGTGGAAGG
<b>SMC1A sens</b>	CCCAATGGCTCTGGTAAGTCA
<b>SMC1A antisens</b>	TCTTTACCCGCAGGTTGCTG
<b>TRIM33 sens</b>	ACTCAGGTGCAGAATAGGATAAAAAG
<b>TRIM33 antisens</b>	TTCATTGATAAGGGTGAAAATGGC
<b>ZMYND8 sens</b>	TCCACAGAGCTTGGCTGAAG
<b>ZMYND8 antisens</b>	TTTCTGGGCTGTTCTCTCTGC
<b>ZNF687 sens</b>	TGGTGTTTGGGGGTGTGAAC
<b>ZNF687 antisens</b>	CACTTGTGGAAAACCTCGCAG
<b>Gènes de reference</b>	
<b>GAPDH sens</b>	TGGGTGTGAACCATGAGAAGTATG
<b>GAPDH antisens</b>	GGTGCAGGAGGCATTGCT

<b>B2M sens</b>	TTCTGGCCTGGAGGCTATC
<b>B2M antisens</b>	TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC
<b>HPRT sens</b>	TGACCTTGATTTATTTGCATACC
<b>HPRT antisens</b>	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT

Tableau XI : Amorces de qPCR.

### *Immunofluorescence et Proximity ligation assay (PLA)*

Pour l'immunofluorescence, 50.000 cellules sont ensemencées en plaque  $\mu$ -Slide 8 Well 80826 (ibidi), puis fixées au méthanol + 3% d'acétone pendant 10 minutes sous agitation. Elles sont ensuite, perméabilisées avec 0,2% de triton dilué dans du PBS pendant 10 minutes sous agitation et lavées avec du PBS sous agitation. La saturation se fait avec du normal goat serum (Jackson immunoresearch). Les anticorps primaires, dilués au 1/200<sup>eme</sup>, sont répertoriés dans le Tableau VIII. Les anticorps secondaires utilisés sont les références A11034 et A11032 de Thermofisher scientific. Ils sont dilués au 1/200<sup>eme</sup>. L'observation est faite sur un microscope à fluorescence. L'irradiation des cellules pour l'observation des loci  $\gamma$ H2AX s'est faite à 15Gy avec un débit de dose de 1,67 Gy/min.

Les expériences de PLA sont réalisées avec le kit Duolink (Merck), selon les recommandations du fournisseur.

### *Migration et invasion*

Pour la partie I, la migration est réalisée en temps réel grâce au système xCELLigence® RTCA d'ACEA biosciences. Ce système mesure la résistance au courant (impédance) induite par l'adhérence des cellules sur la surface poreuse (8 $\mu$ m) qui sépare un milieu pauvre en SVF (0,1%) et un milieu riche. 30.000 cellules sont ensemencées dans la chambre haute des plaques CIM-Plate 16 (ACEA), dans du milieu pauvre en SVF. Dans la chambre inférieure est



ajouté un milieu riche en SVF qui sert de chemoattractant. Les cellules traversant et adhérant à la membrane séparant les milieux sont quantifiées par mesure d'impédance. L'expérience est réalisée sur 13h.

Les expériences de migration et invasion de la partie II ont été réalisées en chambres de boyden, (taille des pores inserts : 8 µm; Falcon). Pour l'invasion, les inserts sont coatés avec 100µL de matrigel (3 µg/ml; Becton Dickinson) pendant 90 minutes à overnight à 37°C.  $1,5 \times 10^5$  cellules/mL sont resuspendues dans du DMEM contenant 0,1% de serum de veau foetal 300µL de cette solution sont répartis dans la partie haute des chambres de boyden, et 750µL de DMEM 10% dans la partie basse (gradient de serum). Le traitement est ajouté dans la chambre supérieure, pour un volume final de 1050µL. Les plaques sont incubées 6 heures (permettant de s'affranchir de la prolifération cellulaire) à 37°C pour la migration et 23h à 37°C pour l'invasion. Les inserts sont ensuite récupérés et les cellules n'ayant pas migré sont retirées avec un coton tige. Les cellules migrantes sont ensuite fixées avec 5 minutes avec du glutaraldéhyde 1% (voir préparation dans partie méthodes du test de prolifération), lavées à l'eau, et colorées 5 minutes avec du crystal violet (voir préparation dans partie méthodes du test de prolifération).

### *Test de comète (Comet assay)*

Les cellules tumorales sont traitées pendant 24h aux conditions indiquées puis décollées et mélangées à de l'agarose low melting à 37°C. Elles sont ensuite déposées sur des lames superfrost plus (Thermofisher scientific) coatées avec une couche d'agarose. Les cellules sont ensuite lysées sur la nuit, à 4°C et à l'obscurité, dans un tampon de lyse (composition en annexe). Après l'étape de lyse, les cellules sont lavées dans le tampon de digestion enzymatique (composition en annexe) pendant 3x20 minutes sous agitation. Les lames sont ensuite soumises à traitement enzymatique par 2µg d'OGG1 (dilution dans le tompon de digestion) pendant 45 minutes à 37°C, puis les cellules sont dénaturées (compostion du tampon en annexe) pendant 30 minutes à l'obscurité. L'électrophorèse (300mA pendant 30 minutes) est réalisée dans le tampon de dénaturation. Les lames sont ensuite plongées dans dans un tampon de neutralisation (45 minutes sous agitation, composition en annexe). Les cassures de l'ADN sont observées grâce à 60µL de l'intercalant SybrGold dye (Thermofisher

scientific) dilué au 1/1000ème dans du PBS. L'observation est faite grâce au microscope à fluorescence leica *DMRXA*. La quantification est réalisée grâce à FIJI et le plugin Open Comet.

### *Différenciation des ostéoclastes*

Les ostéoclastes sont générés à partir de CD14+ humains provenant de différents donneurs. 45.000 CD14+ sont cultivées en puits de plaque 96 puits  $\alpha$ -MEM (Invitrogen Life Technologies) supplémenté à 10% de SVF, 1% de pénicilline-streptomycine et 25ng/mL de hM-CSF (human macrophage colony stimulating factor; R&D Systems). Après 3 jours, 100ng/mL de hRANKL+/- TH1579 sont ajoutés au milieu de culture le contrôle négatif ne contient pas de hRANKL). Les milieux sont changés (avec ajout de TH1579) à 7 jours, puis l'expérience est arrêtée à 10 jours. Les cellules multinuclées (plus de 3 noyaux) sont comptées en utilisant après une coloration TRAP (Sigma, France). Pour le test de prolifération, les cellules sont cultivées sans hRANKL et un crystal violet (voir précédemment) est réalisé à 10 jours.

### *Différenciation des ostéoblastes*

Des MSC sontensemencées en plaque 6 puits (48.000 cellules par puits) dans du milieu de prolifération ( $\alpha$ -MEM (Invitrogen Life Technologies), Lysat Plaquettaire humain 5%, Pénicilline/Streptomycine 1%). Après 4 jours le milieu de différenciation est ajouté, composé comme suit : milieu de prolifération, 10 mM de  $\beta$ -glycerophosphate, et 100 nM de dexaméthasone, plus TH1579 aux concentrations indiquées. À 7 jours, le milieu est changé et remplacé par un milieu de différenciation contenant 250  $\mu$ M d'acide ascorbique, de la vitamine B3, et la molécule. Le milieu est changé tous les 4 jours et la minéralisation est visualisée par coloration rouge alizarine à 21 jours. Le contrôle négatif est cultivé dans un milieu de prolifération simple (sans  $\beta$ -glycerophosphate, acide ascorbique ou dexaméthasone). Pour le test de prolifération, les cellules sont cultivées dans le milieu de prolifération, avec changement de milieu tel que décrit précédemment. Un crystal violet (voir précédemment) est réalisé à 4, 7, 14 et 21 jours.

## Modèles in vivo

Dans le projet HSF1, des souris « nues » âgées d'environ 5 semaines sont injectées avec deux millions de cellules HOS-MNNG shCt ou shHSF1. Les cellules ayant intégré le shARN ont au préalable été triées par traitement avec de 2µg/mL de puromycine dans le milieu de culture. L'injection est réalisée en intramusculaire au contact du tibia. Les souris sont divisées de manière aléatoire entre les deux groupes. L'évolution du volume tumoral est suivie au cours du temps. Les souris ont été sacrifiées dès que le volume tumoral a atteint la valeur seuil (tumeur correspondant à 10% du poids de la souris), selon les recommandations (Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, numéro de saisine Apafis 8405). Le volume tumoral est calculé selon la formule  $V = L \times l \times p \times 0.5432$ .

Dans le projet MTH1, les souris « nues » âgées d'environ 5 semaines sont injectées avec 1,5 millions de cellules HOS-MNNG en intramusculaire au contact du tibia. Les souris sont divisées de manière aléatoire entre 3 groupes de 8 souris : souris traitées avec 45mg/kg de TH1579, 90mg/Kg de TH1579, ou le véhicule. Les souris ont été traitées par voie orale, 3 fois par semaine, pendant 48 jours. L'évolution du volume tumoral est suivie au cours du temps et mesuré 3 fois par semaine. Les souris ont été sacrifiées dès que le volume tumoral a atteint la valeur seuil (tumeur correspondant à 10% du poids de la souris), selon les recommandations (Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, numéro de saisine Apafis 8405). Après le sacrifice, les pattes et les poumons des souris sont prélevés.

## Modèle in vivo pour la quantification des CTC et DTC

Les effets à court terme de TH1579 sur les DTC (disseminated tumour cells) et CTC (circulating tumour cells) ont été évalués par injection de  $2,5 \times 10^5$  cellules HOS-MNNG-GFP en paratibial à des souris nude de 6-7 semaines. Après 5 jours, les souris ont été traitées avec 90mg/kg de TH1579 ou le véhicule, *per os*, 3 fois par semaine. Les souris ont été sacrifiées 24h (groupe TH1579) ou 48h (groupe contrôle après le dernier traitement). Les

pattes, les poumons et le sang des souris (obtenu en intracardiaque) sont prélevés. La tumeur a été mesurée et les DTC et CTC ont été quantifiés par comptage.

### *Quantification des DTC et CTC (Parsotix)*

Le sang des animaux est collecté par ponction cardiaque, dans des vacuaitners EDTA (BD). Pour chaque groupe, le sang est poolé. Les poumons sont collectés, lavés en PBS et hachés en utilisant un scalpel, avant ajout d'une solution de dissociation de tumeur (Tumour Dissociation Kit, Myltenyi) pendant 3 minutes à 37°C. La suspension cellulaire est ensuite filtrée et resuspendue dans du PBS et passée dans le système Parsotix (Angle). Le programme utilisé est le PX2\_S50F separation program et des cassettes de separation de 6,5µm. Le système Parsotix est un système microfluidique qui permet l'enrichissement, la purification et la quantification d'un faible nombre de cellules tumorales en fonction de la taille des cellules et de leur déformabilité.

Les cassettes contenant les cellules ont ensuite été visualisées par un microscope à fluorescence, et les cellules GFP positives ont été comptées. La procédure est similaire pour les CTC dans le sang, en utilisant toutefois le programme PX2\_S99F separation disponible sur la machine.

### *Test de migration chez le zebrafish*

Des cellules HOS-MNNG GFP positives ont été traitées pendant 4h avec 8µM de TH1579, ou avec du DMSO. Elles ont ensuite été injectées à des embryons de zebrafish, dans l'espace périvitellin, 24h après fertilisation. 24h après injection (48h post-fertilisation) le nombre de cellules ayant migré à la tête et à la queue de l'embryon a été compté grâce à un microscope à fluorescence.

## Analyse par microCt

La microtomographie haute résolution (Skyscan 1076) à 50kV et 200mA est utilisée pour scanner les tibias, en utilisant un filtre en aluminium de 0.5mm et seuil de détection de 9mm. Les images sont prises chaque 0.8° à 180° de rotation et analysées via le logiciel Skyscan. La reconstruction 3D est réalisée avec le logiciel NRecon de Skyscan. Les paramètres osseux (BV, BV/TV) sont calculés en utilisant CT Analyzer (CTAn).

## Immunohistochimie

Les immunohistochimies sont réalisées après fixation au formaldéhyde 4% pendant 24h et inclusion en paraffine de section de 3µm de tumeurs (Leica Microsystems). Un déparaffinage des lames est réalisé en automate HMS 740 (Celab) selon le protocole : 3x5minutes OTTIX PLUS (diapath), 3x5minutes Ethanol 100°, 1x5minutes, éthanol 95°, 1x5minutes, ethanol 80°, 3x5minutes et lavage eau distillée. Le démasquage antigénique est réalisé en tampon citrate pH=6,00 (TP Module Leica). Les lames sont ensuite rincées avec une solution TBS 1X pH=7,6 Tween 0,05% (3x5 minutes), soumises à traitement de 15 minutes avec du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour le blocage des peroxydases endogènes. Après un nouveau lavage (TBS 1X pH=7,6 Tween 0,05% 3x5 minutes), la saturation des lames est réalisée avec du Goat Serum 2% BSA. 1% dilué en TBS 1X pH=7,6 Tween 0,05% pendant 25 minutes. L'incubation avec l'anticorps primaires se fait pendant 2h à température ambiante en utilisant les anticorps suivants : caspase-3 clivée (1/400; Cell Signaling Technology), CD146 (1/200; Abcam), gH2AX (1/750; Millipore and 8-oxo-dG (1/750; Millipore); Sp7/Osterix (1/1000; Abcam). Après rinçage et une nouvelle saturation, les lames sont incubées 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire goat anti-rabbit biotinylated (Dako, E0432) au 1/400 en solution de blocage puis incubées avec 1h à température ambiante la Streptavidine/ peroxydase (Dako, P0397) au 1/800 en TBS 1X pH=7,6 Tween 0,05%.

Les tibias sont décalcifiés en PBS 4,13% EDTA et 0,2% paraformaldéhyde grâce à la station KOS microwave de Milestone, avant inclusion en paraffine. Les sections sont analysées après marquage osterix par immunohistochimie (voir précédemment) ou coloration TRAP. Les

lames sont scannées grâce au nanozoomer 2.0RS (Hamamatsu). La quantification est réalisée via Image J (NIH 4, Bethesda, MD).

### ChIP sequencing

Le ChIP sequencing a été réalisé sur 2 millions de cellules HOS-MNNG par condition. Le HS a été effectué à 43°C pendant 1h, puis les cellules ont été remises à 37°C pendant 15 minutes. La condition Ct correspond à des cellules HOS-MNNG non modifiées. Les cellules ont été fixées avec une solution de formaldéhyde (1,1% de formaldéhyde, 10mM de NaCl, 100µM d'EDTA pH8, 5mM d'HEPES pH 7,9) et envoyées dans de la carboglace à la société Active Motif inc. Active motif inc a réalisé le ChIP sequencing, y compris la préparation de la librairie. Le séquençage a été réalisé en utilisant l'Illumina NextSeq 500 pour produire des reads de 75nt de long. Les fichiers fastq brutes ont été alignés sur le génome humain (hg19, downloaded from iGenomes web site, <https://ewels.github.io/AWS-iGenomes/>) en utilisant l'algorithme BWA mem (version: 0.7.17-r1188). La filtration des reads de basse qualité et des reads dupliqués a été effectuée avec samtools (version 1.9). Le peak calling a été réalisé avec MACS2 (version 2.1.3) et l'option SPMR pour une normalisation par million de read et pour permettre la comparaison entre les conditions. La q-value minimale utilisée pour définir les régions significativement enrichies en reads est 10e-12. Les pics retrouvés dans les régions ENCODE blacklisted regions ont été exclues. L'analyse de l'intensité de fixation de HSF1 sur l'ADN a été réalisée avec un script décrit par Ramírez et al (Ramírez et al., 2016).

Les analyses de motifs ont été réalisées avec les outils HOMER ([homer.ucsd.edu](http://homer.ucsd.edu)) et rGADEM (Droit et al., 2019).

### Analyse du RNA sequencing

Le RNA sequencing a été réalisé par Active motif inc sur 1-2 millions de cellules préparées selon les recommandations d'Active motif inc. Les reads bruts ont été alignés sur le génome (hg19) en utilisant hisat2 (version 2.1.0) puis feature Counts (version 1.6.3) a été utilisé pour compter le nombre de reads au niveau génique. DESeq2 a ensuite été utilisé pour identifier

les gènes différentiellement exprimés entre les conditions. Les p values de DESeq2 ont été ajustées pour la comparaison multiple en utilisant l'algorithme IHW (independent hypothesis weighting). Le test de sur-représentation a été réalisé avec le package ReactomePA. Le GSEA a été réalisé avec l'outil dédié ([broadinstitute.org/GSEA](http://broadinstitute.org/GSEA)).

### *Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins (RIME)*

Le RIME a été réalisé par Active motif inc.  $5 \cdot 10^7$ - $5 \cdot 10^8$  cellules ont été fixées 8 minutes à température ambiante avec une solution de formaldéhyde (1,1% de de formaldéhyde, 10mM de NaCl, 5mM d'HEPES pH7.9, 100 $\mu$ M d'EDTA pH8), puis congelées en carboglace, et envoyées à Active motif inc.

### *Test statistiques*

Tous les tests statistiques ont été réalisés grâce au logiciel Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc.). Le risque  $\alpha$  considéré est de 5% (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ). Un mann-whitney a été réalisé pour mesurer la significativité statistique de sexpériences. Un anova 2 voies a été utilisé pour la significativité statistique des expériences de mesure de la croissance tumorale.

# ANNEXES

Description	set Size	NES	p.adjust
<b>Réplication</b>			
Assembly of the pre-replicative complex	66	-1,44	0,10
Recognition of DNA damage by PCNA-containing replication complex	31	-1,68	0,06
Synthesis of DNA	117	-1,88	0,03
DNA Replication	124	-1,96	0,03
Lagging Strand Synthesis	20	-2,04	0,03
Activation of the pre-replicative complex	32	-2,16	0,03
<b>Réparation de l'ADN</b>			
SUMOylation of DNA damage response and repair proteins	74	-1,60	0,03
Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair (TC-NER)	79	-1,83	0,03
Resolution of AP sites via the multiple-nucleotide patch replacement pathway	26	-1,84	0,04
Gap-filling DNA repair synthesis and ligation in TC-NER	65	-1,85	0,03
HDR through Homologous Recombination (HRR)	66	-1,89	0,03
HDR through Single Strand Annealing (SSA)	36	-1,93	0,03
Nucleotide Excision Repair	111	-1,99	0,03
Presynaptic phase of homologous DNA pairing and strand exchange	38	-2,03	0,03
Homologous DNA Pairing and Strand Exchange	41	-2,06	0,03
Activation of ATR in response to replication stress	37	-2,08	0,03
Base-Excision Repair, AP Site Formation	58	1,73	0,03
Nonhomologous End-Joining (NHEJ)	61	1,50	0,08
Recruitment and ATM-mediated phosphorylation of repair and signaling proteins at DNA double strand breaks	68	1,48	0,10
DNA Double Strand Break Response	69	1,48	0,11
<b>Cycle cellulaire</b>			
Cell Cycle Checkpoints	276	-1,32	0,05
G2/M Transition	189	-1,46	0,04
Loss of Nlp from mitotic centrosomes	68	-1,47	0,10
Loss of proteins required for interphase microtubule organization from the centrosome	68	-1,47	0,10
Mitotic G2-G2/M phases	191	-1,49	0,04
Regulation of TP53 Activity	155	-1,51	0,06
Recruitment of mitotic centrosome proteins and complexes	80	-1,55	0,05
Centrosome maturation	80	-1,55	0,05
Separation of Sister Chromatids	178	-1,57	0,04
Mitotic Anaphase	189	-1,64	0,04
Mitotic Metaphase and Anaphase	190	-1,66	0,04
Cyclin A/B1/B2 associated events during G2/M transition	25	-1,69	0,08
DNA Replication Pre-Initiation	82	-1,72	0,03



G1/S-Specific Transcription	28	-1,72	0,06
Nuclear Pore Complex (NPC) Disassembly	33	-1,72	0,03
Regulation of TP53 Activity through Phosphorylation	90	-1,75	0,03
Mitotic Prometaphase	188	-1,79	0,04
S Phase	158	-1,81	0,04
Nuclear Envelope Breakdown	50	-1,84	0,03
Mitotic G1-G1/S phases	146	-1,95	0,04
G1/S Transition	129	-1,97	0,03
Mitotic Spindle Checkpoint	106	-1,98	0,03
Amplification of signal from the kinetochores	90	-2,02	0,03
Amplification of signal from unattached kinetochores via a MAD2 inhibitory signal	90	-2,02	0,03
<b>Transcription</b>			
Transcriptional regulation by small RNAs	100	1,53	0,04
Gene Silencing by RNA	127	1,53	0,03
mRNA 3'-end processing	56	-1,50	0,07
RNA Polymerase II Pre-transcription Events	76	-1,51	0,09
RNA Polymerase III Transcription	41	-1,57	0,09
RNA Polymerase III Abortive And Retractive Initiation	41	-1,57	0,09
RNA polymerase II transcribes snRNA genes	69	-1,58	0,04
RNA Polymerase II Transcription Termination	65	-1,70	0,03
mRNA Splicing - Minor Pathway	50	-1,70	0,03
Transport of Mature mRNA Derived from an Intronless Transcript	39	-1,81	0,03
Transport of the SLBP independent Mature mRNA	32	-1,82	0,03
Transport of Mature mRNAs Derived from Intronless Transcripts	40	-1,82	0,03
Transport of the SLBP Dependant Mature mRNA	33	-1,82	0,03
Transport of Mature mRNA derived from an Intron-Containing Transcript	69	-1,84	0,03
Transport of Mature Transcript to Cytoplasm	78	-1,88	0,03
rRNA processing	190	-1,93	0,04
mRNA Splicing	186	-1,99	0,04
mRNA Splicing - Major Pathway	178	-2,02	0,04
Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA	234	-2,06	0,04
<b>Traduction</b>			
Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	174	-1,86	0,04
Translation	286	-1,88	0,05
rRNA processing in the nucleus and cytosol	184	-1,90	0,04
Mitochondrial translation termination	85	-2,02	0,03
Mitochondrial translation elongation	85	-2,03	0,03
Mitochondrial translation	91	-2,03	0,03
Mitochondrial translation initiation	85	-2,05	0,03
DNA strand elongation	32	-2,31	0,03
<b>Migration</b>			
Collagen chain trimerization	44	1,76	0,03

Collagen biosynthesis and modifying enzymes	64	1,75	0,03
Degradation of the extracellular matrix	133	1,72	0,03
Collagen formation	87	1,62	0,03
Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	61	1,59	0,04
Extracellular matrix organization	278	1,56	0,03
Collagen degradation	63	1,52	0,05
<b>Sénescence</b>			
Oxidative Stress Induced Senescence	119	1,75	0,03
DNA Damage/Telomere Stress Induced Senescence	74	1,68	0,03
Cellular Senescence	186	1,44	0,06
Other			
Glycolysis	67	-1,44	0,10
HSF1-dependent transactivation	24	-2,00	0,03
Telomere C-strand (Lagging Strand) Synthesis	24	-2,06	0,03
Extension of Telomeres	30	-2,11	0,03
Cellular response to heat stress	86	-2,15	0,03
Regulation of HSF1-mediated heat-shock response	66	-2,19	0,03

Tableau XII : Gene-set régulés par HSF1 classés par fonctions (Analyse GSEA) p ajustée  $\leq 0,1$ . NES = Normalized enrichment score.

### Solutions de comet assay

#### Tampon de lyse (stock)

- NaCl : 292,2g
- EDTA : 74.4g
- Tris-HCl : 2.4g
- NaOH : 10g
- Eau distillée : 1300mL

Tamponer à pH10 avec du NaOH et conserver à 4°C

#### Tampon de lyse (préparée extemporanément)

- Tampon de lyse stock : 267mL

- DMSO : 30mL
- Triton X-100 : 3mL
- Volume final : 300mL

#### **Tampon de digestion enzymatique**

- Hepes : 9,5g
- KCl : 7,4g
- EDTA (500mM) : 1mL
- BSA : 0,2g
- Eau qsp 800mL

Tamponner à pH 8 avec du KOH 2N. Conserver à 4°C.

#### **Tampon de dénaturation et d'électrophorèse**

- EDTA (200mM) : 10mL
- NaOH (10N) : 60mL
- Eau qsp 2000mL

#### **Tampon de neutralisation**

- Tris : 48,5g
- Eau : 800mL

Tamponner à 7,5 avec de l'HCl

- Eau qsp 1000mL

### *Autres travaux réalisés durant la thèse*

Durant les années passées au laboratoire, j'ai participé à la rédaction d'un chapitre publié en 2019 et faisant partie du livre **Bone research protocols : Methods in Molecular Biology** (Humana Press 2019). De plus, j'ai contribué à une étude sur le rôle des miRNA 198 et 206 dans la progression tumorale et la dissémination métastatique de l'ostéosarcome. Ce travail a abouti à une publication dans *oncotarget* en 2018.

### *Analysis of mRNA, miRNA, and DNA in Bone Cells by RT-qPCR and In Situ Hybridization*

**Methods Mol Biol.** 2019;1914:169-196. doi: 10.1007/978-1-4939-8997-3\_9.

## Metadata of the chapter that will be visualized online

Chapter Title	Analysis of mRNA, miRNA, and DNA in Bone Cells by RT-qPCR and In Situ Hybridization
Copyright Year	2019
Copyright Holder	Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature
Author	Family Name <b>Moukengue</b> Particle Given Name <b>Brice</b> Suffix Organization INSERM, UMR1238, Bone Sarcoma and Remodeling of Calcified Tissues, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités Address Nantes, France
Author	Family Name <b>Amiaud</b> Particle Given Name <b>Jérôme</b> Suffix Organization INSERM, UMR1238, Bone Sarcoma and Remodeling of Calcified Tissues, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités Address Nantes, France
Author	Family Name <b>Jacques</b> Particle Given Name <b>Camille</b> Suffix Organization INSERM, UMR1238, Bone Sarcoma and Remodeling of Calcified Tissues, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités Address Nantes, France
Author	Family Name <b>Charrier</b> Particle Given Name <b>Céline</b> Suffix Organization INSERM, UMR1238, Bone Sarcoma and Remodeling of Calcified Tissues, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités Address Nantes, France
Author	Family Name <b>Ory</b> Particle Given Name <b>Benjamin</b>

	Suffix	
	Organization	INSERM, UMR1238, Bone Sarcoma and Remodeling of Calcified Tissues, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités
	Address	Nantes, France
Corresponding Author	Family Name	<b>Lamoureux</b>
	Particle	
	Given Name	<b>Francois</b>
	Suffix	
	Organization	INSERM, UMR1238, Bone Sarcoma and Remodeling of Calcified Tissues, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités
	Address	Nantes, France
	Email	francois.lamoureux@univ-nantes.fr
Abstract	The aim of this chapter is to describe a method used to evaluate gene expression and microRNAs (miRNAs) in bone cells or tissue using Reverse transcription and quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR), and a method to assess chromogenic in situ hybridization (CISH) on Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) mouse bone tissue to detect both DNA and mRNA transcripts using the double digoxigenin (DIG) locked nucleic acid (LNA <sup>TM</sup> ) probes.	
Keywords (separated by '-')	Bone - Bone sarcoma - Gene expression - RT-qPCR - Primers - Chromogenic in situ hybridization - Histology - DNA - mRNA - miRNA - LNA probes	

# Chapter 9

## Analysis of mRNA, miRNA, and DNA in Bone Cells by RT-qPCR and In Situ Hybridization

Brice Moukengue, Jérôme Amiaud, Camille Jacques, Céline Charrier, Benjamin Ory, and Francois Lamoureux

### Abstract

The aim of this chapter is to describe a method used to evaluate gene expression and microRNAs (miRNAs) in bone cells or tissue using Reverse transcription and quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR), and a method to assess chromogenic in situ hybridization (CISH) on Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) mouse bone tissue to detect both DNA and mRNA transcripts using the double digoxigenin (DIG) locked nucleic acid (LNA™) probes.

**Key words** Bone, Bone sarcoma, Gene expression, RT-qPCR, Primers, Chromogenic in situ hybridization, Histology, DNA, mRNA, miRNA, LNA probes

### 1 Introduction

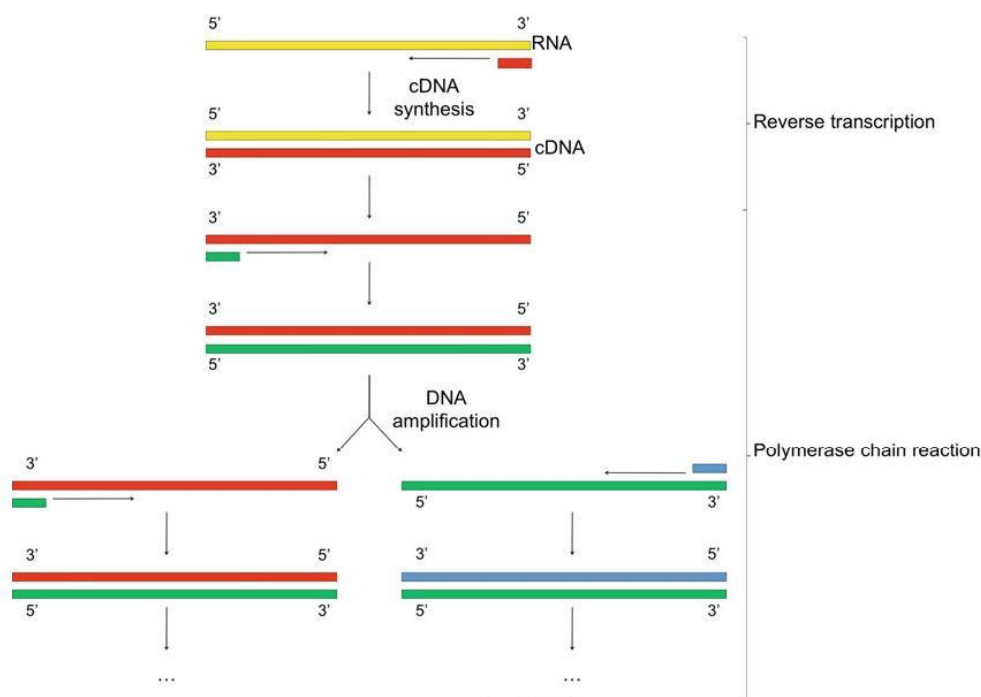
Several techniques are widely used to study changes in messenger RNA (mRNA) and gene expression in bone cells to answer specific scientific questions. However, no technical approach used in isolation can answer all questions. Consequently, several complementary techniques may be needed to obtain information that is required for the study. This chapter will describe two such complementary methods that frequently used to study mRNA, miRNA, and DNA detection: the RT-qPCR, which is a combination of the reverse transcription (RT) and the quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR; Fig. 1) and, the in situ hybridization of DNA and mRNA on formalin fixed paraffin embedded (FFPE) bone tissues.

#### 1.1 Quantitative PCR to Study Gene Expression

The Polymerase Chain Reaction (PCR) is used to amplify a DNA fragment present in a sample. It is based on the activity of DNA polymerase enzyme that uses a DNA template (here the cDNA

Brice Moukengue, Jérôme Amiaud, and Camille Jacques contributed equally to this work.

Ayemen I. Idris (ed.), *Bone Research Protocols: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1914, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3_9), © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019



**Fig. 1 RT-qPCR.** During RT, a cDNA, complementary to an RNA strand, is created by a reverse transcriptase. This cDNA is then used as a template by a DNA polymerase to create a second DNA strand. Each new strand will serve as templates, resulting in amplification

obtained after RT) and primers to produce a second DNA strand by 30  
 base complementarity. Both the original template and the new 31  
 strand will then serve as templates for other new strands, as this 32  
 process repeats several times. Consequently, the amplification is 33  
 proportional to the number of cDNA strands in the sample. The 34  
 production of new strands can be measured by different techniques 35  
 such as fluorescence described in this chapter, leading to a variation 36  
 of the original technique called qPCR. 37

The protocol described here uses the fluorophore SYBR Green: 38  
 this DNA intercalating agent emits fluorescence once associated to 39  
 double-stranded DNA. The more DNA double strands are present 40  
 in a sample after amplification by PCR, the stronger the fluorescent 41  
 signal is. By amplifying a single gene of interest with specific pri- 42  
 mers, it is possible to quantify its expression in a sample allowing for 43  
 the study of the transcriptional changes between control and exper- 44  
 imental conditions (e.g., a drug treatment or an environmental 45  
 modification). The SYBR Green dye quantification method is easier 46  
 to use and cheaper than other methods such as the TaqMan™ 47  
 probes, but it is relatively less specific [1]. 48



### 1.2 Quantitative PCR to Study miRNA Expression

As miRNAs are small noncoding RNAs of  $\approx 22$  nucleotides length, they are too small to be quantified by classical RT-qPCR methods. Unlike the common protocols used to monitor the amount of long gene-transcripts, miRNAs RT-qPCR protocols include a reverse transcription step, which is already sequence specific (i.e., miRNA specific) (Fig. 2). This step is based on the use of miRNA-specific RT primers, characterized by both a hairpin structure, artificially designed to bear a universal palindromic sequence, and a specific portion including some miRNA complementary bases. Consequently, this technique has the advantage of displaying two layers of miRNA specificity; first depending on the proper annealing of the RT primers to the right miRNA, the second being controlled by the Forward (FW) primer sequence. In this protocol, the Reverse (RV) primer used is universal among all the miRNAs to quantify, as it hybridizes to the common backbone portion added to the cDNA through the RT step. One of the pros of this technique is its extreme versatility and flexibility, as you can design your own primers for minimal costs compared with the last generation Taq-Man technologies. This technique implies the necessity of testing the designed primers toward their miRNA's specificity prior to use.

### 1.3 Use of LNA Probes for In Situ Hybridization of DNA and mRNA on Formalin Fixed Paraffin Embedded Bone Tissues

In the last few decades, the use of qPCR and chromatin immunoprecipitation (ChIP) have dramatically helped us to understand genetic and epigenetic processes involved in bone development and associated pathologies, in particular in the context of cancer. However, those techniques cannot provide the cellular localization for the expression of the gene of interest.

In this context and complementing the qPCR method, in situ hybridization (ISH) has been shown to be the more reliable technique to study gene expression [2] from embryos to cells, by describing the in situ localization and level of expression for a mRNA. While the use of ISH has been well described for mRNA using oligo and riboprobes in most tissues including bone tissue [3, 4], the aim of this work was to transfer the technologies of specific LNA modified oligonucleotides to hybridize mRNAs on mouse FFPE bone tissue and open the way to the CISH of small noncoding RNAs on FFPE bone tissues of human patients.

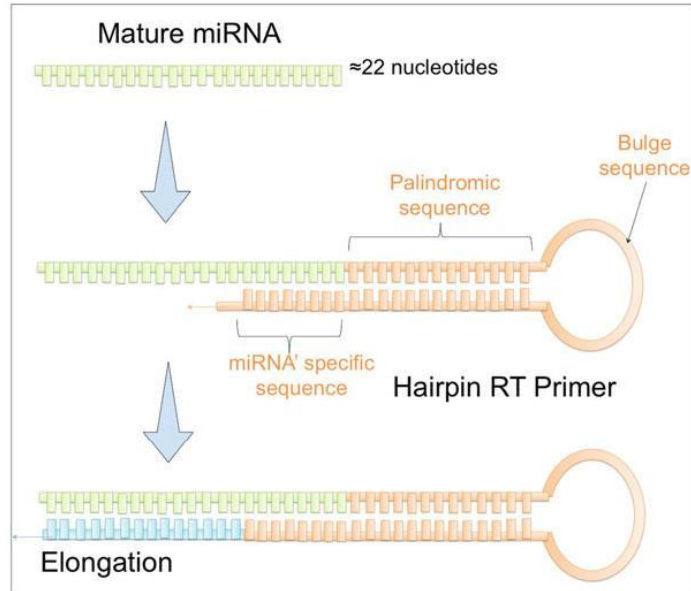
## 2 Materials

### 2.1 RT-qPCR

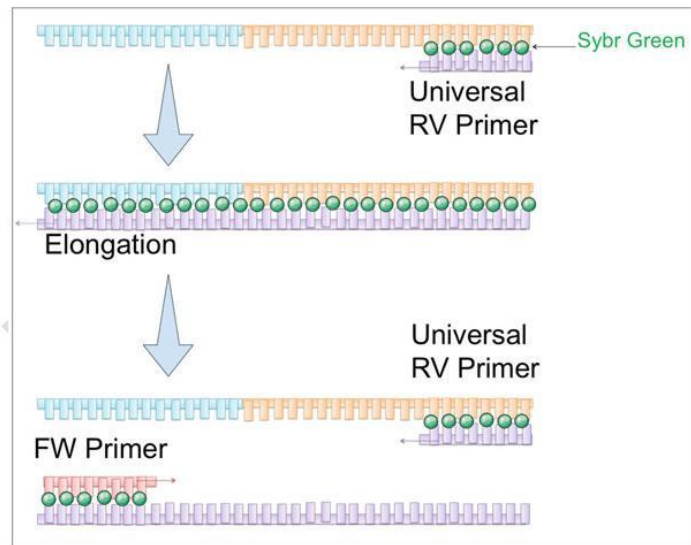
#### 2.1.1 Standard Reverse Transcription

1. 1  $\mu\text{g}$  of high quality RNA (*see Note 1*).
2. 10 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP).
3. 100  $\mu\text{M}$  of nonspecific primers (oligo dT or random hexamers).
4. Reverse transcriptase (contained in the Maxima<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit from ThermoFisher Scientific<sup>TM</sup>).

### miRNA specific RT



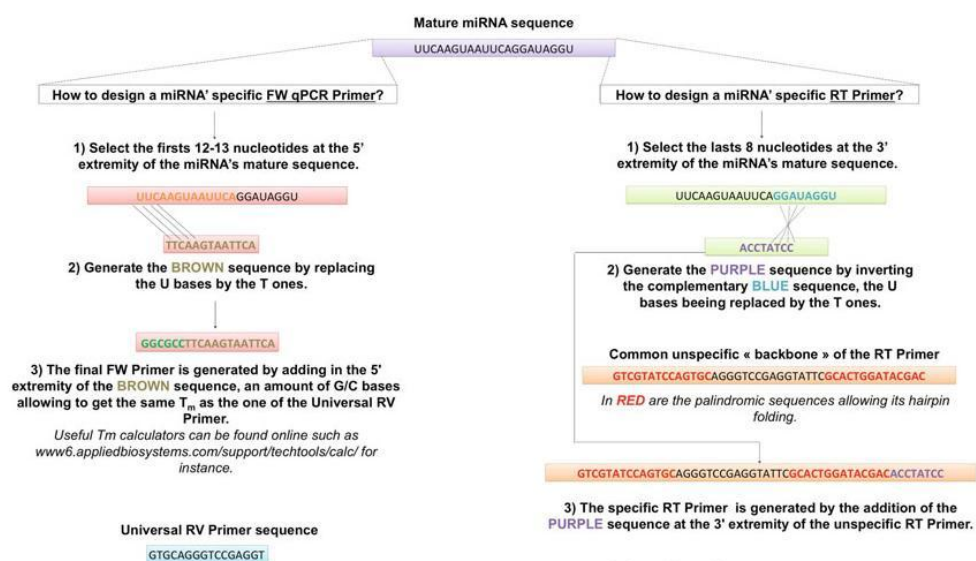
### miRNA' specific qPCR



**Fig. 2** Representative scheme of the miRNA' specific RT-qPCR steps. Due to the reverse transcription (RT) primer design, the RT is already miRNA specific. The specificity of the qPCR only depends on the FW primer sequence, as the RV one hybridizes the common backbone sequence generated in the cDNA through the RT primer. FW denotes forward, RV denotes reverse and arrows indicate the direction of elongation steps

## Analysis of Transcriptional Regulation in Bone Cells

	5. 5× RT Buffer ( <i>see Note 2</i> ).	95
	6. Nuclease-free water.	96
	7. Ice.	97
	8. RNase-free filter tips and microtubes.	98
	9. At least 2 dry bath incubators or a thermocycler (e.g., MJ Mini personal thermal cycler from Bio-Rad)	99 100 101
2.1.2 Quantitative Polymerase Chain Reaction	1. cDNA at 10 ng/μL ( <i>see Note 3</i> ).	102
	2. Custom oligonucleotides forward and reverse primers at 2.5 μM each ( <i>see Note 4</i> ).	103 104
	3. DNA polymerase (contained in the SYBR <sup>®</sup> Select Master Mix from applied Biosystems <sup>™</sup> ; <i>see Note 5</i> ).	105 106
	4. Nuclease-free water.	107
	5. Ice.	108
	6. Thermocycler (e.g., CFX96 <sup>™</sup> Real-Time PCR Detection System from Bio-Rad).	109 110
	7. 96-well qPCR microplate.	111
	8. qPCR adhesive seal.	112
	9. RNase-free microtubes.	113 114
2.1.3 miRNA-Specific Primer Design	1. miRNA primers designed for RT and/or qPCR using for example the method given in Fig. 3, or with the help on <a href="http://www.mirbase.org">www.mirbase.org</a> , or other relevant web-databases.	115 116 117 118
2.1.4 miRNA-Specific Reverse Transcription	This protocol has been optimized for producing cDNAs for miRNA-specific qPCRs. It assumes the use of RT Primers designed as described in Subheading 2.1.3 ( <i>see Note 6</i> ).	119 120 121
	1. Thermocycler.	122
	2. RNase-free 96-well qPCR microplate (or 0.1 mL microtubes, depending on the number of RNA samples to analyze).	123 124
	3. qPCR adhesive seal.	125
	4. RNase-free microtubes.	126
	5. Ice.	127
	6. 500 nM stem-loop RT primer.	128
	7. dNTP mix (10 mM).	129
	8. 100 ng total RNA (25 ng/μL).	130
	9. 5× First-strand buffer ( <i>see Note 7</i> ).	131
	10. 0.1 M DTT (dithiothreitol).	132
	11. RNase Out (40 U/μL).	133
	12. MultiScribe Reverse Transcriptase.	134 135



**Fig. 3** Overall procedure for miRNA' specific RT-qPCR primer design. The given example is based on the mature sequence of the Hsa-miR-26b-5p (*MIMAT0000083*). FW denotes forward, RV denotes Reverse, and  $T_m$  denotes melting temperature.

2.1.5 miRNA-Specific qPCR	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Thermocycler. 136</li> <li>2. 96-well qPCR microplate. 137</li> <li>3. qPCR adhesive seal. 138</li> <li>4. RNase-free microtubes. 139</li> <li>5. Ice. 140</li> <li>6. SYBRSelect Master Mix (<i>see Note 5</i>). 141</li> <li>7. FW Primer (1.5 <math>\mu</math>M) (<i>see Note 4</i>). 142</li> <li>8. RV Primer (0.7 <math>\mu</math>M) (<i>see Note 4</i>). 143</li> <li>9. cDNA (equivalent of 1 ng of total RNA). 144</li> <li>10. Nuclease-free water. 145</li> </ol>
2.2 In Situ Hybridization of DNA and mRNA in Bone Tissue	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Stainless steel tissue embedding molds. 147</li> <li>2. Spin Tissue processor station STP 120 (e.g., MicromMicrotech, cat. no. F/STP-120). 148</li> <li>3. KOS Microwave Multifunctional Tissue Processor (e.g., MicromMicrotech, cat. no. F/67051/W). 150</li> <li>4. Paraffin embedding station EC 350 (e.g., MicromMicrotech, cat. no. F/EC-350). 152</li> <li>5. Rodent Anesthesia Machine for Small Animals. 154</li> </ol>
2.2.1 Tissue Collection, Fixation, Decalcification, and Paraffin Embedding	

## Analysis of Transcriptional Regulation in Bone Cells

	6. Dulbecco's phosphate-Buffered Saline w/o Mg and Ca Sterile Filterd (e.g., Lonza, cat.no. BE17-512F).	155 156
	7. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Mg and Ca powder for 5 L (e.g., Eurobio, cat.no. CS0PBS01-08).	157 158
	8. Fixative: 4% (w/v) PFA (Paraformaldehyde prilled, 95% (e.g., Sigma-Aldrich, cat. no. 441244-1KG)) in 1× sodium phosphate buffer, pH 7.4 with 2 μM of MgCl <sub>2</sub> and 0,1 μM of NaOH ( <i>see Note 8</i> ).	159 160 161 162
	9. Fixative: commercial formaldehyde solution 4% buffered pH 7.1 (e.g., MicromMicrotech, cat. no. F/40877-41) ( <i>see Note 9</i> ).	163 164 165
	10. Decalcification solution ( <i>see Note 10</i> ). 4.13% ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) in 1× PBS, pH 7.4 and 0.2% of P.F.A.	166 167
	11. Use absolute (100%) ethanol (e.g., VWR, cat. no. 20820.464) to prepare 95%, 80%, and 70% ethanol.	168 169
	12. 2-Butanol (e.g., Sigma-Aldrich, cat. no. 1.09630.2500).	170
	13. Paraffin Histowax <sup>®</sup> (e.g., MicromMicrotech, cat. no. F/00403).	171 172
	14. Embedding Cassettes (e.g., MicromMicrotech, cat. no. F/510-04S).	173 174 175
2.2.2	<i>Tissue Sectioning</i>	
	1. Motorized rotary microtome RM2255 (Leica Biosystems) to perform constant sections of FFPE tissues.	176 177
	2. Cold plate to refresh paraffin blocks (e.g., Microm, cat. no. CP 60).	178 179
	3. Histology waterbath with range of temperature up to 80 °C (e.g., MicromMicrotech, cat. no. F/26801).	180 181
	4. Small artist's paintbrush for cleaning the knife and unroll sections.	182 183
	5. Fine metal forceps.	184
	6. MX35 Premier Plus disposable low-profile microtome blades for hard tissue sectioning.	185 186
	7. DEPC treated Ultrapure distilled water.	187
	8. Microscope Polysine <sup>®</sup> slides, 25 × 75 mm (e.g., D. Dutscher, cat. no. 045797).	188 189
	9. Microscope superfrost <sup>®</sup> Plus slides, 25 × 75 mm (e.g., Grosseron, cat. no. 9.161155).	190 191
	10. RNase-OFF solution 500 mL (e.g., Eurobio, cat.no. GMPCPG0101).	192 193 194
2.2.3	<i>Probes</i>	
	1. LNA probes purchased from Exiqon and were all double DIG modified on both end (5' and 3') ( <i>see Note 11</i> ). Specifications of each probe were detailed in Table 1.	195 196 197

t.1 **Table 1**  
Probes used in the protocol

t.2	Target RNA name	Probe sequence (5' to 3')	Product nb	Tm (°C)	Conc. (μM)
t.3	Scramble ISH	GTGTAACACGTCCTATACGCCCA	300514-15	87 (RNA)	25
t.4	Mouse actin β	CTCATTGTAGAAGGTGTGGTGCCA	300512-15	92 (RNA)	25
t.5	Mouse TNFS11	TTCACAGAGGTCCTGGCAGT	300500	85 (RNA)	35
t.6	Human Alu	TCTCGATCTCCTGACCTCATGA	500150	80 (DNA)	

#### 2.2.4 Tissue

##### Conditioning, Hybridization, and Immunodetection of Hybrides

1. Epitope recovery device (PT module, e.g., MicromMicrotech cat. no. F/PT-MODULE+). 199  
200
2. OTTIX Plus (e.g., MicromMicrotech, cat. no. F/X0076). 201
3. RNase-free UltraPure distilled water. 202
4. Dulbecco's phosphate-Buffered Saline w/o Mg and Ca Sterile Filtered (e.g., Lonza, cat.no. BE17-512F). 203  
204
5. Proteinase K stock solution at 25 mg/mL (e.g. Sigma-Aldrich, cat. no. P2308-25MG). 205  
206
6. 3% sterile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unidose (e.g., Gifrer, cat. no. DOSOXYGÉNÉE 10 VOLUMES 5 mL). 207  
208
7. Triethanolamine hydrochloride (e.g., Sigma-Aldrich, cat. no. T1502-250G). 209  
210
8. Anhydrous acetic acid (e.g., Merck Millipore, cat. no. 1.00063.1000). 211  
212
9. Tri-Sodium citrate dihydrate (e.g., VWR, cat. no. 33615.268). 213
10. Saline Sodium Citrate buffer (SSC) 20× concentrate, molecular grade (e.g., Sigma-Aldrich, cat. no. S6639-1L). 214  
215
11. Yeast tRNA stock solution at 25 mg/mL in RNase-free Ultra-Pure distilled water (e.g., Thermo Fisher Scientific, cat. no. 15401011). 216  
217  
218
12. UltraPure™ Salmon Sperm DNA solution at 10 mg/mL (e.g., Thermo Fisher Scientific, cat. no. 15632011). 219  
220
13. Denhardt's solution 50× concentrated 10 mL (e.g., Euromedex, cat. no. EU0505-A). 221  
222
14. Dextran sulfate sodium salt (e.g., Sigma-Aldrich, cat. no. D8906-50G). 223  
224
15. Formamide (e.g., Sigma-Aldrich, cat. no. F9037-100ML). 225
16. Tris-Buffered Saline with Tween 20 (TBST), 20× concentrated 10 L (e.g., MicromMicrotech, cat. no. F/TBT010). 226  
227
17. Trizma hydrochloride (Tris-HCl) pH 7.6 1 M (e.g., Sigma-Aldrich, cat. no. T2444-1 L). 228  
229

## Analysis of Transcriptional Regulation in Bone Cells

18. Levamisole hydrochloride, Alkaline phosphatase inhibitor (e.g., Abcam, cat. no. ab141217) solubilized in UltraPure distilled water to a final concentration of 100 mM. Aliquots and store at  $-20^{\circ}\text{C}$ .  
230  
231  
232  
233
19. Bovine Serum Albumine, minimum 96% (BSA, e.g., Sigma-Aldrich, cat. no. A2153-50G).  
234  
235
20. Mouse normal serum (e.g., Jackson ImmunoResearch Laboratories, cat. no. 015-000-120).  
236  
237
21. Monoclonal fraction of Mouse IgG anti-digoxin biotinylated (e.g., Jackson ImmunoResearch Laboratories, cat. no. 200-062-156).  
238  
239  
240
22. Monoclonal fraction of Mouse IgG anti-digoxin Alkaline Phosphatase conjugated (e.g., Jackson ImmunoResearch Laboratories, cat. no. 200-052-156).  
241  
242  
243
23. Peroxidase-conjugated Streptavidin (e.g., Agilent Technologies, cat. no. P039701-2).  
244  
245
24. Alkaline Phosphatase-conjugated Streptavidin (e.g., Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, cat. no. 016-050-084).  
246  
247
25. Biotin-XX TyramideSuperBoost™ Kit (e.g. Thermo Fisher Scientific, cat. no. B40931).  
248  
249
26. Sodium chloride solution 1 M (e.g., Sigma-Aldrich, cat. no. S5150-1 L).  
250  
251
27. Triton X100 (e.g., Sigma-Aldrich, cat. no. X100-500 ML).  
252
28. Tween 20 (e.g., Sigma-Aldrich, cat. no. P2287-500 ML).  
253
29. Magnesium chloride solution 1 M (e.g., Sigma-Aldrich, cat. no. M1028-100 ML).  
254  
255
30. NBT/BCIP solution ready-to-use (e.g., MicromMicrotech, cat. no. F/ACN125).  
256  
257
31. DAB Liquid Quanto 125 mL (e.g., MicromMicrotech, cat. no. F/TA-125-QHDX).  
258  
259
32. Pertex mounting medium (e.g., MicromMicrotech, cat. no. F/00811).  
260  
261  
262

---

### 3 Methods

1. Before starting, carefully clean the bench top, the pipets and all the needed lab material with an anti-RNase solution to avoid sample contaminations.  
264  
265  
266
2. Measure artifacts.  
267
3. Keep the RNA or cDNA samples and the reagents on ice to avoid degradation.  
268  
269

## Analysis of Transcriptional Regulation in Bone Cells

Guidelines for qPCR Primers Design	<p>Some rules should be followed when designing primers for a gene of interest (<i>see</i> <b>Note 16</b>):</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. The primer length should be between 18 and 30 nucleotides.</li> <li>2. The GC percentage must not exceed 60% (<i>see</i> <b>Note 17</b>).</li> <li>3. Ideally, the primers should end by a G or a C at their 3' extremity to ensure the DNA polymerase grip.</li> <li>4. The melting temperatures (<math>T_m</math>) of the primers should be between 57 and 63 °C, within 1 °C of each other.</li> <li>5. The PCR product size must be between 70 and 120 nucleotides (<i>see</i> <b>Note 18</b>).</li> <li>6. To avoid genomic DNA amplification, the primers should span two exons.</li> <li>7. Test the primers homodimerization and heterodimerization capacities (<math>\Delta G</math> superior to <math>-9</math> is good, and a <math>\Delta G</math> superior to <math>-5</math> kcal/mole is ideal) (<i>see</i> <b>Note 19</b>).</li> <li>8. Design at least 2 primer pairs for each gene of interest.</li> </ol>	<p>300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316</p>
qPCR Primers Design	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Enter the Refseq ID or the FASTA sequence in the appropriate box in The National Center for Biotechnology Information's Primer-Blast website (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast</a>) or another similar tool.</li> <li>2. In the "Primer Parameters" field, change the maximum PCR product size to 120 and the max <math>T_m</math> difference to 1.</li> <li>3. In the "Exon/intron selection field," change the exon junction span selection box from "no preference" to "primer must span an exon-exon junction."</li> <li>4. In the "Primer Pair Specificity Checking Parameters" field, enter the name of the organism of interest.</li> <li>5. Click the "Get primers" button.</li> <li>6. In the Detailed primer reports, select a primer pair and make sure there is no unintended target.</li> <li>7. Open the OligoAnalyzer 3.1 tool on the Integrated DNA Technologies web page (<a href="https://eu.idtdna.com/calc/analyzer">https://eu.idtdna.com/calc/analyzer</a>).</li> <li>8. Enter the forward primer sequence in the sequence box then click the self-dimer button. The first <math>\Delta G</math> number must be superior to <math>-9</math> kcal/mole. Do the same for the reverse primer. If this <math>\Delta G</math> number is under <math>-9</math> kcal/mole for one primer of the couple, select another couple.</li> <li>9. If the first <math>\Delta G</math> number is over <math>-9</math> kcal/mole for both of the primers, click the hetero-dimer button.</li> </ol>	<p>317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340</p>



t.1 **Table 2**  
 RT reaction mix. This table shows the concentrations and volumes of reagent needed for the preparation of one RT reaction

t.2	Reagents	Volume ( $\mu\text{L}$ per reaction)
t.3	100 $\mu\text{M}$ primer	1
t.4	10 mM dNTP	1
t.5	High quality RNA	$\times \mu\text{L}$ for 1 $\mu\text{g}$ of RNA
t.6	Nuclease-free water	To 15 $\mu\text{L}$

### 3.1 Analysis of Gene Expression and miRNA by RT-qPCR

#### 3.1.1 RT-qPCR

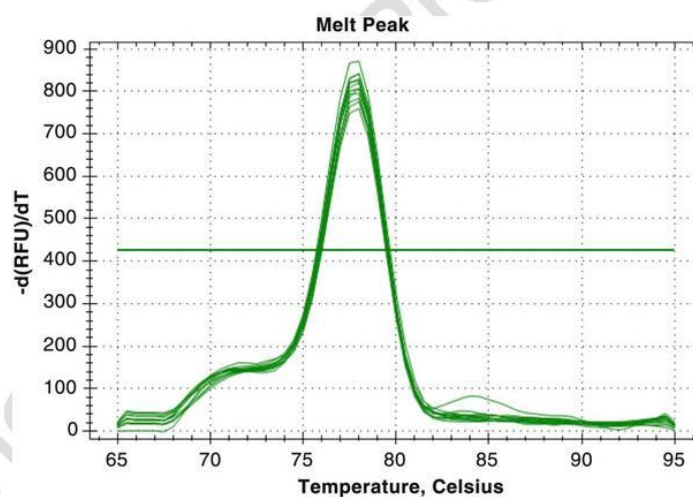
##### Reverse Transcription

1. Allow the reagents to thaw on ice. Gently vortex each tube before use. 270  
271
2. In an RNase-free microtube, prepare the RT mix as shown in Table 2. Do not forget to include the no reverse transcriptase control (*see Note 12*). To avoid mistakes linked to the pipetting of small volumes, a first mix can be prepared with only the appropriate volumes of primers and dNTP. For example, for 10 samples, a mix containing 11  $\mu\text{L}$  of primer +11  $\mu\text{L}$  of dNTP (*see Note 13*) can be prepared first, then aliquoted in the reaction microtubes (2  $\mu\text{L}$  per reaction). 272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279
3. Gently vortex the tube for 3 s. 280
4. Heat the reaction microtube in a thermocycler or a dry bath set at 65  $^{\circ}\text{C}$ , for 5 min and cool the tubes on ice for 2 min. 281  
282
5. In the meantime, prepare the enzyme mix in a tube with 4  $\mu\text{L}$  of 5 $\times$  RT buffer and 1  $\mu\text{L}$  of the Maxima<sup>TM</sup> H minus mix containing the Maxima<sup>TM</sup> H minus reverse transcriptase enzyme (*see Note 14*) for each reaction. Do not forget to add a 10% margin (*see Note 13*). 283  
284  
285  
286  
287
6. In each reaction microtube, except the NRT control (*see Note 12*), add 5  $\mu\text{L}$  of enzyme mix. 288  
289
7. Mix by flicking the tube and centrifuge shortly to keep the reaction mix at the bottom of the microtube. 290  
291
8. Heat the tubes at 50  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min (*see Note 15*), followed by 5 min at 85  $^{\circ}\text{C}$  in the thermocycler. Then cool the microtubes on ice for 2 min. 292  
293  
294
9. For qPCR, the cDNA obtained after RT must be at 10 ng/ $\mu\text{L}$ . Dilute the cDNA by adding 80  $\mu\text{L}$  of Nuclease-free water in each reaction microtubes, including the NRT control. 295  
296  
297
10. Keep on ice if used immediately, or store at  $-20^{\circ}\text{C}$ . 298  
299

**Table 4**

**Thermocycler program for qPCR. Example of cycle conditions used in a qPCR experiment. For each step, the duration and temperature are given. Program the thermocycler in this way**

Step	Temperature (°C)	Duration
1. Uracil-DNA glycosylase activation	50	2 m
2. AmpliTaq® DNA polymerase activation	95	3 m
3. Denaturation	95	15 s
4. Anneal/extend	60	50 s
5. Melt curve	65 to 95 (increment 0.5 °C)	5 s
Steps 3–5 are repeated 39 more times		



**Fig. 4** One melting peak, indicating the amplification of one gene only. Multiple melting peaks are the sign of the amplification of more than one gene

Quantitative Polymerase  
Chain Reaction

The qPCR will enable the amplification of the cDNA obtained after RT. The amplicons will then be measured to evaluate the gene expression. For this step, include a suitable housekeeping gene (*see Note 22*) for control purpose (e.g., Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase or beta-2 microglobulin). The method described here is based on the SYBR Select Master Mix by Applied Biosystems®. Note that triplicates must be done for each qPCR condition.

374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381

1. Allow the reagents to thaw on ice. 382
  2. In a microtube, for each gene of interest and housekeeping gene, prepare the qPCR reaction mix as shown in Table 3. 383  
384
  3. Gently vortex the tube for 3 s. 385
  4. In a 96-well qPCR microplate, load 8  $\mu\text{L}$  of reaction mix and 20 ng of cDNA (2  $\mu\text{L}$  of cDNA at 10 ng/ $\mu\text{L}$ ). 386  
387
  5. Include both the NRT negative control, and a no template (NT) negative control (*see Note 20*). Seal the plate with the qPCR adhesive seal. Make sure to handle the seal at its ends only. 388  
389  
390  
391
  6. Centrifuge the plate for 20 s to avoid bubbles. 392
  7. Program the thermocycler as shown in Table 4. 393
  8. Put the microplate into the thermocycler and start the program. 394  
395  
396
- 3.1.2 RT-qPCR for miRNA
1. Before starting the RT protocol, dilute the RNA samples in RNase-free water, to get a final concentration of 25 ng/ $\mu\text{L}$ . 397  
398
  2. Allow the RT reagents to thaw on ice. 399
  3. In a microtube, prepare the “RT Mix” by scaling the volumes listed in Table 5 to the number of needed RT reactions. You should therefore prepare as many tubes of “RT Mix” as miRNAs to quantify. 400  
401  
402  
403
  4. Gently vortex and centrifuge the “RT Mix.” Dispense 6  $\mu\text{L}$  per tube/well, in a 96-well microplate. 404  
405
  5. Gently vortex the RNA samples and add 4  $\mu\text{L}$  directly in the bottom of each tube/well, bringing the total volume per tube/well to 10  $\mu\text{L}$ . These 4  $\mu\text{L}$  correspond to an amount of 100 ng of RNA. 406  
407  
408  
409

Specific Reverse  
Transcription for miRNA

t.1 **Table 5**  
RT reaction mix for miRNA. This table shows the reagent concentrations and volumes needed for one RT reaction

t.2	Component	Volume per reaction ( $\mu\text{L}$ )
t.3	500 nM stem-loop RT primer	1
t.4	dNTP mix (10 mM total)	1
t.5	5 $\times$ First-strand buffer	2
t.6	0.1 M DTT	1
t.7	RNase out (40 U. $\mu\text{L}^{-1}$ )	0.4
t.8	MultiScribe reverse transcriptase	0.6
t.9	Final volume	6

**Table 6**  
**Thermocycler program for specific reverse transcription for miRNA**

Steps	Time	Temperature
Step 1	30 min	16 °C
Step 2	30 s	20 °C
Step 3	30 s	42 °C
Step 4	1 s	50 °C
Steps 2–4 are repeated 59 more times		
Step 5	5 min	85 °C

6. For each miRNA to analyze, we advise to systematically perform a negative control without Reverse Transcriptase. In this case, the equal volume of nuclease-free water replaces the enzyme amount. As a validation step, you should perform a standard curve to make sure the efficiency of your PCR is as close as possible to 100%; otherwise you must redesign your primers.
7. Carefully close the lids of the microtubes/seal the 96-well plate by sticking adhesive film.
8. Briefly centrifuge the tubes/plate in a micro-centrifuge to avoid bubbles.
9. Program the thermal cycler as shown in Table 6.
10. Load the RT reaction plate/tubes into the thermal cycler and start run.
11. At the end of the cycles, dilute the samples by adding 90  $\mu\text{L}$  of RNase-free water to the 10  $\mu\text{L}$  of RT products. The RT reaction plate/tubes can be stored at 4 °C if the qPCR is not performed immediately after.

#### Quantitative PCR for miRNA

1. In a microtube, prepare the “qPCR Mix” by scaling the volumes listed in Table 7 to the desired number of qPCR reactions. We advise to perform triplicate for one given cDNA sample and to also add a negative control without template, in which the cDNA will be replaced by nuclease-free water.
2. Gently vortex and centrifuge the “qPCR Mix.” Dispense 20  $\mu\text{L}$  per well in a 96-well microplate (*see Note 23*).
3. Gently mix the diluted RT-generated cDNAs and add 5  $\mu\text{L}$  (corresponding to an equivalent amount of 1 ng of RNA) in the bottom of each well.
4. Carefully seal the 96-well plate by sticking adhesive film.
5. Briefly centrifuge the plate in a micro-centrifuge.

t.1 **Table 7**  
**qPCR reaction mix for miRNA. This table shows the reagent concentrations and volumes needed for one qPCR reaction**

t.2	Component	Volume per reaction ( $\mu\text{L}$ )
t.3	SYBR select master mix ( $\times 2$ )	12.5
t.4	FW Primer (1.5 $\mu\text{M}$ )	1
t.5	RV primer (0.7 $\mu\text{M}$ )	1
t.6	Nuclease-free $\text{H}_2\text{O}$	5.5
t.7	Final volume	20

t.1 **Table 8**  
**Thermocycler program for qPCR for miRNA**

t.2	Step	Time	Temperature
t.3	1. Uracil-DNA glycosylase activation	2 min	50 °C
t.4	2. AmpliTaq <sup>®</sup> DNA polymerase activation	8 min	95 °C
t.5	3. Denaturation	15 s	95 °C
t.6	4. Anneal/extend	30 s	60 °C
t.7	Steps 3 and 4 are repeated 39 more times		
t.8	OPTICAL READING		

6. Program the thermal cycler as shown in Table 8. 441

7. Load the qPCR reaction plate into the thermal cycler and start run. 442  
443

### 3.1.3 Quantitative PCR Products Quantification

There are different ways to quantify qPCR products. The method described below is for relative quantification in which the gene expression is compared with the expression of an housekeeping gene [5]. 445  
446  
447  
448

The thermocycler indicates the threshold cycle (Ct), i.e., the number of cycles required for the fluorescence to exceed a threshold. Higher the gene of interest is expressed in a condition, more cDNA there is at the end of the RT, and the lower the Ct is. 449  
450  
451  
452

1. First, take the average Ct of your triplicates for each condition. The Ct used in next steps are averages. 453  
454

2. Calculate  $\Delta 0$ , the  $\Delta\text{Ct}$  for the control condition of the experiment, and  $\Delta 1$  the  $\Delta\text{Ct}$  for an experimental condition 1 as follows: 455  
456  
457

## Analysis of Transcriptional Regulation in Bone Cells

$$\Delta x = Ct_{(\text{gene of interest in condition } x)} - Ct_{(\text{Housekeeping gene in condition } x)}$$

( $\Delta x = \Delta Ct$  for the condition  $x$ )

3. Then calculate  $\Delta\Delta Ct$  as follows:  $\Delta\Delta Ct = \Delta 1 - \Delta 0$ . 458

4. To obtain the fold change, calculate  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . 459

5. Calculation of the relative standard deviation: for each condition  $x$  (control condition or experimental condition), calculate the standard deviation (STDV) for the Ct, then: 460

$$Ax = \sqrt{(\text{STDV}^2_{(\text{gene of interest in condition } x)} + \text{STDV}^2_{(\text{housekeeping gene in condition } x)})}$$

$$Bx = Ax - \Delta x$$

( $\Delta x$  was calculated earlier) 461

$$Cx = 2^{(Bx)} - 2^{(-\Delta x)}$$

Normalize by the control condition: for each condition, including the control condition, calculate D (the “normalized” standard deviation) as follows: 462

$$D = Cx/2^{(-\Delta 0)}$$

### 3.1.4 Controls and Analysis for miRNAs

Several control miRNAs or eukaryotic Ribosomal RNAs can be used to normalize the gene expression data, based on the miRNA sample amount and depending on the nature of the cells/tissue, from which the total RNA is extracted. The housekeeping gene used by our laboratory is the small nuclear RNA RNU6B, but the small noncoding RNA SNORD44, the miR-103, miR-191, miR-423-3p work well in osteosarcoma [6–8]. With regards to the calculation of relative expression levels of miRNAs, the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  cycle threshold method was applied using RNU6B and the experimental control conditions ( $T_0$ , DMSO treatment, control plasmids transfections, etc.) for normalization purpose. 463

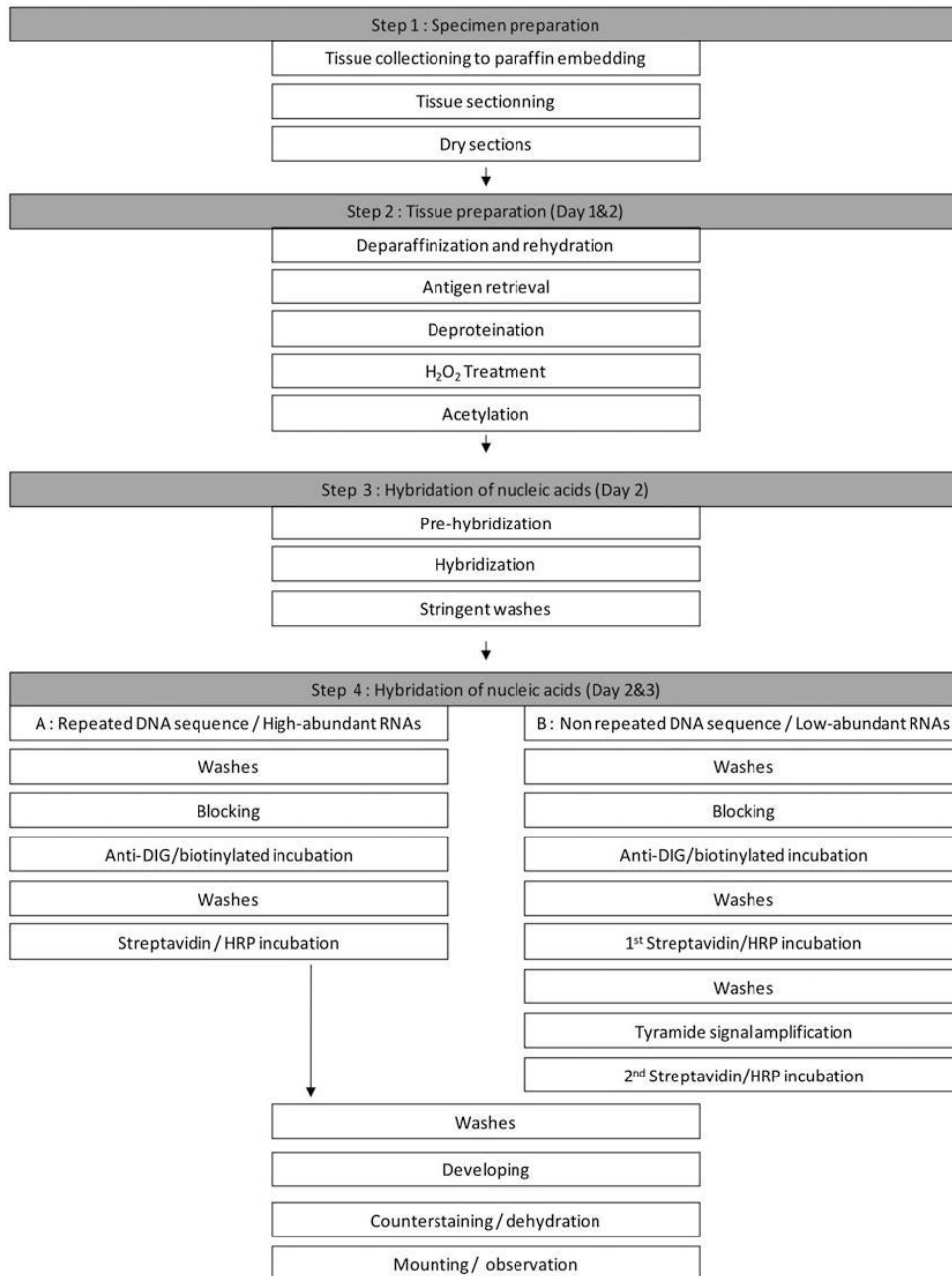
### 3.2 Use of LNA Probes for In Situ Hybridization of DNA and mRNA on Formalin Fixed Paraffin Embedded Bone Tissues

#### 3.2.1 Tissue Collection, Fixation, Decalcification, and Paraffin Embedding

1. Anesthetize animals by insufflating 3.5% isoflurane in the anesthesia box until animals are fully anesthetized. 464
2. Sacrifice the animals with cervical dislocation according to ethical rules. 465
3. Spray the animal’s legs skin with 70% ethanol and remove the skin carefully, along the legs with scissors. 466
4. Wash the tissue carefully with fresh sterile D-PBS. 467
5. Immerge the legs in a large volume (about 20 times the volume of the sample) of cold 4% paraformaldehyde fixative or formaldehyde for a maximum of 24 h at 4 °C (*see Note 24*). 468
6. Identify the samples and put them in embedding cassettes that were correctly identified. 469

	7. Decalcify bone tissues in decalcification solution ( <i>see Note 25</i> )	498
	at 49 °C for 96 h in the KOS Microwave Tissue Processor	499
	under constant stirring. This step can also be performed at	500
	4 °C but will take much longer to achieve.	501
	<b>Steps 8–12</b> (paraffin infiltration of tissue) are realized in the	502
	STP120 tissue processor under constant agitation.	503
	8. Immerse in 80% ethanol for 1 h at room temperature.	504
	9. Immerse in 95% ethanol for 3 × 2 h each at room temperature.	505
	10. Immerse in Absolute ethanol for 3 × 2.5 h each at room	506
	temperature.	507
	11. Immerse in 2-butanol for 3 × 2.5 h each at room temperature.	508
	12. Immerse in paraffin for 2 × 2.5 h each at 58 °C.	509
	13. Proceed to the embedding process, using as an example, the	510
	paraffin embedding station EC 350 which is equipped with a	511
	paraffin tank and distributor, and a cold plate to cool the	512
	embedded blocks.	513
		514
3.2.2 Tissue Sectioning	1. Put the blocks on the cold plate set to –12 °C for 30 min and at	515
	the same time, clean the water bath and the microtome with	516
	RNAse-OFF. Fill the water bath with ultrapure distilled water	517
	and warm the bath to 42 °C.	518
	2. Clean all instruments (small artist's paintbrush, fine metal for-	519
	ceps, slide holder) and the area for cutting with RNAse-OFF.	520
	Use new pack of microtome blades, which has to be used only	521
	for in situ hybridization session.	522
	3. Proceed to the trimming of the block with a range of thickness	523
	between 12 and 20 µm with a speed of cutting from 6 to	524
	7. Check that you are at the region of interest by observing a	525
	section on a noncoated slide, under a light microscope. If it is	526
	not right, trim again.	527
	4. When the block is prepared, begin the thin sectioning with a	528
	thickness range between 3 and 7 µm with a speed of cutting	529
	from 3 to 4. Collect and put the section on the water bath. Wait	530
	few seconds to unfold and mount sections on coated slides	531
	(Polysine <sup>®</sup> or superfrost <sup>®</sup> Plus; <i>see Note 26</i> ). The use of a	532
	paintbrush will be helpful to unfold sections, but you need to	533
	be careful to not make holes in it.	534
	5. Dry out the slides in an oven overnight at 37 °C. If hybridiza-	535
	tion is not performed on the next day, immerge the slides in	536
	liquid paraffin and store at 4 °C not more than 2 weeks.	537
		538
3.2.3 Tissue Conditioning and Hybridization	An overview of the different steps of the hybridization procedure is	539
	shown in Fig. 5. Note that all in situ hybridization sessions should	540
	be performed with both negative and positive controls. In this	541
	method we used a scramble probe and a no probe as negative	542

## Analysis of Transcriptional Regulation in Bone Cells



**Fig. 5** Schematic representation of the different steps of the in situ hybridization protocol



controls. If necessary, we can use a probe for housekeeping genes like murine Beta-actin, to ensure reliability and efficiency of the protocol between several types of tissues in mouse. This was used especially in preliminary experiments to validate the stringent wash conditions and optimizing other steps for a new probe.

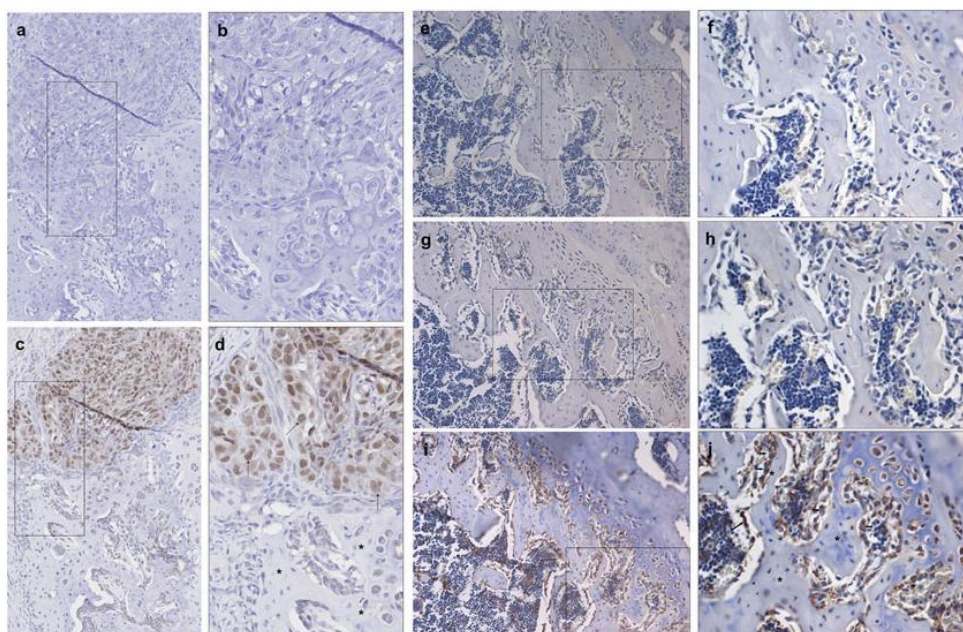
We used the study by Brennan et al. [9] on the detection of human *Alu* sequence as the basis to have an internal control for the reaction. While following the steps below (*see Note 27*), note that it is important to not let the sections dry out.

1. Dewax in OTTIX Plus, 3 × 5 min each at room temperature under constant agitation.
2. Rehydrate through graded alcohols (3 × 100%, 3 × 95%, 1 × 80%, and 1 × 70%) to RNase-free Ultrapure distilled water.
3. Perform heat-induced epitope retrieval for 20 h at 60 °C (*see Note 28*) in unmasking buffer (*see Notes 29 and 30*) in the PT module.
4. Cool to room temperature on the bench under constant agitation, for about 20 min.
5. Wash several times in ultrapure distilled water and use hydrophobic barrier pen to circle the sections.
6. Wash in 1 × PBS 3 × 5 min each at room temperature.
7. Incubate with a pre-warmed Proteinase K solution at 10 µg/mL in 1 × PBS for 10 min at 37 °C (*see Note 31*).
8. Wash in 1 × PBS 3 × 5 min each at room temperature.
9. Incubate the slides in 0.2 M HCl solution for 25 min at room temperature.
10. Wash in 1 × PBS 3 × 5 min each at room temperature.
11. Inactivate endogenous peroxidase activity by incubating sections with the 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution. This step can be avoided if the detection system uses alkaline phosphatase enzyme. In this case, continue to **step 12**.
12. Wash in 1 × PBS 3 × 5 min each at room temperature.
13. Wash for 5 min at RT in acetylation buffer (*see Note 32*).
14. Proceed to acetylation. Immerge the slides held in a rack into a box containing 200 mL of acetylation buffer. Under stirring, add immediately 500 µL of anhydrous acetic acid and incubate for 20 min at room temperature.
15. Wash 3 times with 4 × SSC.
16. Perform the pre-hybridization by applying 100 µL to cover a section of about 2.5 × 2.5 cm with the pre-hyb buffer (*see Note 33*), and put 24 × 32 mm sterile coverslips. Pre-hybridization should be performed about 20 to 25 °C

## Analysis of Transcriptional Regulation in Bone Cells

	below the $t_m$ calculated of each probe and depending on the	586
	targeted nucleic acid.	587
	17. Perform the hybridization step. Remove the entire Pre-hyb	588
	buffer and apply the probe mixture (done by diluting probe	589
	stock solution in Hyb buffer; <i>see Note 34</i> ) on the section. Put	590
	coverslips, and incubate for 2 h at the same temperature from	591
	<b>step 13</b> . Concentration of probes should be determined	592
	empirically and according to the type of tissue.	593
	18. Wash with Stringency Wash buffer A ( <i>see Note 35</i> ) for	594
	$3 \times 5$ min each at $5^\circ\text{C}$ higher than the hybridization	595
	temperature.	596
	19. Wash with Stringency Wash buffer B ( <i>see Note 36</i> ) for	597
	$2 \times 5$ min each at $5^\circ\text{C}$ higher than the hybridization	598
	temperature.	599
	20. Wash with Stringency Wash buffer C ( <i>see Note 37</i> ) for	600
	$2 \times 5$ min each at $5^\circ\text{C}$ higher than the hybridization	601
	temperature.	602
	21. Wash with Stringency Wash buffer D ( <i>see Note 38</i> ) for	603
	$2 \times 5$ min each at $5^\circ\text{C}$ higher than the hybridization	604
	temperature.	605
		606
3.2.4 Detection of Hybrids and Microscopic Conditioning  Repeated DNA Sequence and High-Abundant RNAs	1. Wash in $1 \times \text{TBST}$ $3 \times 5$ min each at room temperature.	607
	2. Apply AP blocking buffer ( <i>see Note 39</i> ) or Peroxidase blocking	608
	buffer ( <i>see Note 40</i> ) for 1 h at room temperature in a wet	609
	chamber.	610
	3. Incubate with the mouse anti-DIG Alkaline Phosphatase con-	611
	jugated or mouse anti-DIG biotinylated diluted to $0.75\text{--}1\ \mu\text{g}/$	612
	$\text{mL}$ in appropriate upper blocking buffer for overnight at $4^\circ\text{C}$	613
	in a wet chamber.	614
	4. Wash in $1 \times \text{TBST}$ $3 \times 5$ min each at room temperature under	615
	agitation.	616
	5. For alkaline phosphatase-conjugated antibody, apply	617
	NBT/BCIP solution at room temperature for a maximum of	618
	an overnight incubation in the wet chamber. Check under light	619
	microscope to control the efficiency of the revelation until the	620
	ratio-specific signal to noise background is best between the	621
	control and condition slides. Wash several times in distilled	622
	water, counterstain with nuclear fast red solution for 10 min,	623
	wash and dehydrate through graded alcohols ( $1 \times 70\%$ ,	624
	$1 \times 80\%$ , $2 \times 95\%$ , and $2 \times 100\%$ ) and clear in OTTIX Plus	625
	(3 times). Add coverslip with Pertex mounting medium.	626
	6. For biotinylated antibody, apply HRP-conjugated Streptavidin	627
	from Agilent Technologies diluted at $1/400$ in $1 \times \text{TBST}$ for	628
	1 h at room temperature in the wet chamber. Wash as <b>step 4</b> ,	629
	and proceed to revelation using DAB working solution (add	630

	one drop of DAB chromogen to 1 mL of substrate buffer) at	631
	room temperature. As in <b>step 5</b> , control the developing under	632
	light microscope.	633
	Wash several times in distilled water, counterstain with Gills	634
	hematoxylin solution for 5 s, wash 5 min in running tap water,	635
	and dehydrate through graded alcohols (1 × 70%, 1 × 80%,	636
	2 × 95%, and 2 × %) and clear in OTTIX Plus (3 times). Add	637
	coverslip with Pertex mounting medium.	638
		639
Non-repeated DNA	1. Wash in 1 × PBS 3 × 5 min each at room temperature.	640
Sequence and	2. Apply peroxidase blocking buffer for 1 h at room temperature	641
Low-Abundant RNAs	in a wet chamber.	642
	3. Incubate with the biotinylated mouse anti-DIG diluted to 1.25	643
	to 1.5 µg/mL in the same blocking buffer overnight at 4 °C in	644
	a wet chamber.	645
	4. Wash in 1 × PBS 3 × 5 min each at room temperature under	646
	agitation.	647
	All the next steps are to be performed according to the manu-	648
	facturer’s recommendation and must be optimized for each	649
	HIS protocol.	650
	5. Apply 100 µL of HRP-conjugated Streptavidin (component B)	651
	for 1 h at room temperature. This can be replaced by applying	652
	100 µL of the HRP-conjugated streptavidin from Agilent	653
	Technologies diluted at 1/400.	654
	6. Wash in 1 × PBS 3 × 10 min each at room temperature under	655
	agitation.	656
	7. Apply 100 µL of Tyramide working solution and add cover-	657
	slips. Incubate for 10 min at room temperature.	658
	8. Gently remove the coverslip and apply 100 µL of stop reagent	659
	for 1 min at room temperature.	660
	9. Wash in 1 × PBS 3 × 5 min each at room temperature under	661
	agitation.	662
	10. Apply 200 µL (depending on the size of tissue section) of the	663
	HRP-conjugated Streptavidin from Agilent Technologies	664
	diluted at 1/400 in 1 × PBS.	665
	11. Wash in 1 × PBS 3 × 5 min each at room temperature under	666
	agitation.	667
	12. Incubate with DAB working solution, <b>step 6</b> of Subheading	668
	“Repeated DNA Sequence and High-Abundant RNAs”	669
	13. Finally, proceed to the counterstaining and the mounting of	670
	the sections. An example of the ISH on bone tissue is repre-	671
	sented in Fig. 6.	672
		673



**Fig. 6** ISH of human Alu DNA sequence (**c, d**) and RANKL mRNA (**i, j**). Human osteosarcoma xenograft model in nude mice was hybridized with LNA Alu probe (**c, d**) or without probe (**a, b**). Strong positivity of nuclei (arrows) was observed on human cells (**c, d**) while murine nuclei were negatives; negative control showed no positivity. FFPE decalcified murine femoral bone sections were hybridized with LNA TNFS11 probe targeting mouse RANKL mRNA. Positivity was observed on osteoblasts (arrowheads), hypertrophic chondrocytes, as well as in endothelial cells (**i, j**). No signal was detected when tissues were hybridized with Scramble probe (**a, f**) or without probe (**g, h**), which is showing the relevance of the specific signal. Note that bone matrix was well preserved after all ISH protocol (asterisk). Original magnification:  $\times 20$  (**a, c, e, g, i**) and  $\times 40$  (**b, d, f, h, j**)

#### 4 Notes

674

1. Use a non-degraded and non-contaminated RNA sample. 675  
Heat, UV, RNase enzymes, or suboptimal storage conditions 676  
can degrade RNA. RNA contamination can impair the 677  
subsequent experiments. These contaminants include urea, 678  
salt, phenol used during RNA extraction, or genomic DNA 679  
(can be amplified during RT-qPCR), DNases, RNases, pro- 680  
teases [10]. A RNA sample is considered pure when its 681  
260/280 and 260/230 absorbance ratios are greater than 682  
1.8 [11]. 683
2.  $5\times$  RT Buffer composition: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 684  
25 °C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT. 685
3. This is the cDNA obtained from mRNA after RT. 686

4. Store the primers at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  687
5. Store the SYBR Select Master Mix in the fridge, at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 688
6. All the chemical components of miRNA-specific reverse tran- 689  
scription should be stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 690
7.  $5\times$  First-strand Buffer 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM 691  
KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>. 692
8. P.F.A is hazardous and should always be handled under a fume 693  
hood while wearing personal protective equipment. To prepare 694  
the fixative you will be careful not to boil the solution and 695  
dissolve prills at a temperature between  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 696  
When the dissolution was achieved you can notice a “cloudy” 697  
aspect due to the impurity in the tablets. When fixative is at 698  
room temperature sterile filter and store at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 2 weeks or 699  
at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in aliquots for a month. 700
9. As P.F.A., formaldehyde should be handled carefully. Waste of 701  
fixative has to be eliminated according to institution 702  
recommendations. 703
10. Decalcification solution: In a large clean beaker, dissolve 24 g 704  
of NaOH pellets (Sigma-aldrich, cat. no. S8045-1KG) in 705  
about 1.8 L of UltraPure distilled water. When dissolution is 706  
complete add 82.6 g of E.D.T.A (Sigma-aldrich, cat. no. 707  
EDS-1KG) and add progressively drops of 1 M NaOH until 708  
E.D.T.A. was totally dissolved. Then calibrate the pH to 7.4, 709  
add 100 mL of 4% P.F.A. solution and fill in a graduated flask to 710  
2 L. Solution can be stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for many weeks. 711
11. RNase-free UltraPure distilled water: To 1 L of UltraPure 712  
distilled water add 1 mL of DEPC and put it under strong 713  
stirring for 1 h. Let the solution at room temperature for 2 days 714  
and autoclave. All probes were resuspended with RNase-free 715  
Ultrapure distilled water according to company recommenda- 716  
tions, aliquoted, and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in order to avoid alter- 717  
ation of probes. 718
12. A negative control reaction microtube must be done for each 719  
RT experiment. This no reverse transcriptase (NRT) microtube 720  
contains RNA (taken from any sample), but the same volume 721  
of nuclease-free water replaces the enzyme’s volume. 722
13. Always prepare 10% more than volume needed, to cover losses 723  
of liquid on pipettes tips and microtubes walls. 724
14. The Maxima™ H minus reverse transcriptase enzyme is an 725  
in vitro evolution of the Moloney Murine Leukemia Virus 726  
reverse transcriptase. 727
15. If the oligodT primer were used, put the reaction microtube at 728  
 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min after **step 7**, then follow with **step 8**. 729

#### Analysis of Transcriptional Regulation in Bone Cells

16. These rules are the ideal conditions. In case the search yields no results, be less stringent on some of the conditions. 730  
731
17. A GC percentage over 60% can impair the denaturation process during the PCR. 732  
733
18. If the PCR product is too long, the elongation process of the qPCR could be incomplete. This can result in the new DNA strand missing the 3' end for primer annealing. 734  
735  
736
19. Primers homodimerization or heterodimerization can lead to a SYBR green fluorescence signal and distort the quantification results. 737  
738  
739
20. The no-template (NT) tube is a negative control in which the cDNA volume is replaced by the same volume of nuclease-free water. 740  
741  
742
21. If not provided by the thermocycler, the qPCR efficiency can be calculated by entering the slope of your standard curve in the qPCR efficiency calculator tool on the ThermoFisher Scientific website. 743  
744  
745  
746
22. Housekeeping genes are genes whose expression in the cell is considered stable in the experimental condition. 747  
748
23. The highest risk for failure of this protocol is the amplification of the RT primers during the PCR step. Indeed the RT primers are mixed with the cDNA at the end of the RT step, so you should be very careful in your FW primers and RV primers to avoid any complementarity that would lead to unspecific amplification. 749  
750  
751  
752  
753  
754
24. The best results for fixation are based on the size of the specimen. This fixation time can be increased if samples were bigger, but in the same way ISH parameters will have to be adapted to these new conditions depending on the increase of cross-linking caused by methylene bridging of aldehyde fixatives [12] 755  
756  
757  
758  
759
25. To ensure the efficiency of decalcification, a radiographic evaluation was done using a Faxitron SR machine. 760  
761
26. The type of coated slide to use can be empirically determined according to the final ISH protocol sequence. Note that alkaline buffer can decrease the efficacy of the coating of Superfrost® + slides especially in the case of long-term incubation at temperatures over 37 °C. In this case, and in our experience we determined that Polysine® slides offer the best results. 762  
763  
764  
765  
766  
767
27. **Steps 1** and **2** of the described protocol have been performed in an autostainer in our lab but could also be done in bath on a shaker. 768  
769  
770
28. Time course of HIER must have to be empirically determined according to your working conditions. Here we give the time 771  
772

- that offers the best result for our tissue sections in order to avoid cortical unfolding. 773  
774
29. 5% (w/v) Tween 20 stock solution: To 95 mL of UltraPure 775  
distilled water add 5 g of Tween 20. 776
30. Unmasking Buffer (citrate buffer pH 6.10 mM plus Tween 777  
20 0.05%): To prepare 1 L of buffer add 2.941 g of tri-sodium 778  
citrate dihydrate ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$ ) to about 970 mL of 779  
ultrapure distilled water in a beaker. Adjust the pH to 6.0 add 780  
10 mL of the 5% Tween 20 stock solution and fill in a 781  
graduated flask to 1 L. Solution can be stored at RT for 2 to 782  
3 months or at +4 °C for longer storage. 783
31. Proteinase K concentration must have to be empirically deter- 784  
mined for your experimental setup. 785
32. Acetylation buffer (TEA 0.1 M pH 8.00): To prepare 1 L of 786  
buffer add 18.565 g of TEA powder to about 950 mL of 787  
UltraPure distilled water in an 1 L beaker. Adjust the pH to 788  
8.00 and fill to 1 L in graduated flask with UltraPure distilled 789  
water. 790
33. Pre-hyb buffer: To prepare 40 mL of buffer weigh 1.2 g of 791  
B.S.A. and 4 g of dextran sulfate. Add 8 mL of 20× concen- 792  
trated SSC solution and 16 mL of UltraPure distilled water. 793  
Mix vigorously until the powder is totally dissolved. Fill to 794  
40 mL with 16 mL of UltraPure distilled water. 795
34. Hyb buffer: To prepare 20 mL of buffer weigh 1 g of dextran 796  
sulfate (5% final). Add 10 mL of deionized formamide (50% 797  
final), 0.4 mL of Denhardt's 50× (1× final), 4 mL of 20× 798  
concentrated SSC solution (4× final), 0.2 mL of yeast tRNA 799  
stock solution (0.25 mg/mL final), 0.2 mL of salmon sperm 800  
DNA solution (0.1 mg/mL final). Finally add 5.2 mL of 801  
UltraPure distilled water. Mix vigorously until all the compo- 802  
nents are totally dissolved. Aliquots to 2 mL and store at 803  
−20 °C. 804
35. Stringency Wash buffer A (SSC 4× 0.1% Tween 20): To pre- 805  
pare 1 L of buffer add 200 mL of 20× concentrated SSC 806  
solution and 1 mL (use a cut tips to pipet Tween which is 807  
viscous) in a 1 L graduated flask. Fill to 1 L with UltraPure 808  
distilled water. 809
36. Stringency Wash buffer B (SSC 2×): To prepare 1 L of buffer 810  
add 100 mL of 20× concentrated SSC solution in a 1 L- 811  
graduated flask. Fill to 1 L with UltraPure distilled water. 812
37. Stringency Wash buffer C (SSC 1×): To prepare 1 L of buffer 813  
add 50 mL of 20× concentrated SSC solution in a 1 L- 814  
graduated flask. Fill to 1 L with UltraPure distilled water. 815

38. Stringency Wash buffer D (SSC 0.2×): To prepare 1 L of buffer 816  
add 10 mL of 20× concentrated SSC solution in a 1 L- 817  
graduated flask. Fill to 1 L with UltraPure distilled water. 818
39. AP Blocking buffer: To prepare 40 mL of buffer weigh 0.8 g of 819  
B.S.A. (2% final) in a 50 mL Falcon®. Add 1.2 mL of 1 M 820  
Tris-HCl pH 7.6 (30 mM final), 1.2 mL of 5 M NaCl solution 821  
(150 mM final), 0.2 mL of Triton X-100 (0.5% final). Finally, 822  
add 0.4 mL of 100 mM levamisole (1 mM final) and 0.8 mL of 823  
normal mouse serum (2% final). Mix vigorously until the BSA 824  
is totally dissolved. Fill to 40 mL with 36.2 mL of UltraPure 825  
distilled water. Store at 4 °C for not more than a month. 826
40. Peroxidase Blocking buffer: To prepare 40 mL of buffer weigh 827  
0.8 g of B.S.A. (2% final) in a 50 mL Falcon®. Add 1.2 mL of 828  
1 M Tris-HCl pH 7.6 (30 mM final), 1.2 mL of 5 M NaCl 829  
solution (150 mM final), 0.2 mL of Triton X-100 (0.5% final), 830  
and 0.8 mL of normal mouse serum (2% final). Mix vigorously 831  
until the BSA is totally dissolved. Fill to 40 mL with 36.6 mL of 832  
UltraPure distilled water. Store at 4 °C for not more than a 833  
month. 834

---

## Acknowledgment

Thanks to [www.servier.fr](http://www.servier.fr) for the free-access' to the clipart used. 835

## References

- 837  
838  
839 1. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH (2014) Comparison of SYBR green and Taq- 861  
840 Man methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine 862  
841 receptor subtypes. *Adv Biomed Res* 3  
842  
843  
844 2. Cassidy A, Jones J (2014) Developments in in situ hybridisation. *Methods* 70(1):39–45 863  
845  
846 3. Ogasawara T et al (2004) In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cyto- 864  
847 kines in osteoclasts of rat periodontal tissue. *J Periodontal Res* 39(1):42–49 865  
848  
849  
850 4. Shwartz Y., Zelzer E. (2014) Nonradioactive in situ hybridization on skeletal tissue sections. 866  
851 In: Hilton MJ (ed). *Skeletal development and repair*, mcxxx. Humana Press, Totowa, NJ, 867  
852 p. 203–215 868  
853  
854  
855 5. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time 869  
856 RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45 870  
857  
858 6. Arabi L et al (2014) Upregulation of the miR-17-92 cluster and its two paraloga in osteo- 871  
859 sarcoma—reasons and consequences. *Genes* 872  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882
7. Allen-Rhoades W et al (2015) Cross-species identification of a plasma microRNA signature for detection, therapeutic monitoring, and prognosis in osteosarcoma. *Cancer Med* 4:977–988. <https://doi.org/10.1002/cam4.438>
8. Chen R, Li X, He B, Hu W (2017) MicroRNA-410 regulates autophagy-related gene ATG16L1 expression and enhances chemosensitivity via autophagy inhibition in osteosarcoma. *Mol Med Rep.* <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6149>
9. Brennan MA et al (2014) Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem Cell Res Ther* 5(5):114
10. Vermeulen J, De Preter K, Lefever S, Nuytens J, De Vloed F, Derveaux S, Hellemans J, Speleman F, Vandesompele J (2011) Measurable impact of RNA quality on



883	gene expression results from quantitative PCR.	independent classifiers of microcapillary elec-	889
884	Nucleic Acids Res 39:e63	trophoresis traces. Nucleic Acids Res 33:e56	890
885	11. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X,	12. D'Amico F, Skarmoutsou E, Stivala F (2009)	891
886	Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A,	State of the art in antigen retrieval for immu-	892
887	Auffray C (2005) Towards standardization of	nohistochemistry. J Immunol Methods	893
888	RNA quality assessment using user-	341:1-2, 1-18	894

Uncorrected Proof

# Loss of miR-198 and -206 during primary tumor progression enables metastatic dissemination in human osteosarcoma

www.oncotarget.com

Oncotarget, 2018, Vol. 9, (No. 87), pp: 35726-35741

Research Paper

## Loss of miR-198 and -206 during primary tumor progression enables metastatic dissemination in human osteosarcoma

Steven Georges<sup>1,2,\*</sup>, Lidia Rodriguez Calleja<sup>1,2,\*</sup>, Camille Jacques<sup>1,2,\*</sup>, Melanie Lavaud<sup>1,2</sup>, Brice Moukengue<sup>1,2</sup>, Fernando Lecanda<sup>3</sup>, Thibaut Quillard<sup>1,2</sup>, Marta Tellez Gabriel<sup>1,6</sup>, Pierre-François Cartron<sup>4,5,6,7</sup>, Marc Baud'huin<sup>1,2</sup>, François Lamoureux<sup>1,2</sup>, Dominique Heymann<sup>4,6</sup> and Benjamin Ory<sup>1,2,7</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR-S 1238, Nantes 44035, France

<sup>2</sup>PhyOs, Sarcomes Osseux et Remodelage des Tissus Calcifiés, Université de Nantes, Nantes 44035, France

<sup>3</sup>Division of Oncology, Adhesion and Metastasis Laboratory, Center for Applied Medical Research, University of Navarra, Pamplona, Navarra 31008, Spain

<sup>4</sup>Equipe Apoptose et Progression Tumorale, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers, CRCINA, INSERM, U1232, Université de Nantes, Université d'Angers, Nantes 44035, France

<sup>5</sup>LaBCT, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint Herblain 44800, France

<sup>6</sup>European Associated Laboratory Sarcoma Research Unit, INSERM, University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK

<sup>7</sup>Cancéropole Grand-Ouest, Réseau Epigénétique (RepiCGO), France

\*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Benjamin Ory, email: Benjamin.ory@univ-nantes.fr

Keywords: osteosarcoma; microRNAs; metastasis; C-Met

Received: March 09, 2018

Accepted: October 23, 2018

Published: November 06, 2018

Copyright: Georges et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT

The metastatic dissemination is a complex multistep process by which tumor cells from a primary site enter into the systemic circulation to finally spread at distant sites. Even if this mechanism is rare at the tumor level, it remains the major cause of Osteosarcoma-patients' relapse and mortality. MicroRNAs (miRNAs) have recently been described as novel epigenetics' genes' expression regulators actively implicated in cancer progression and dissemination. The understanding of their implication in the metastatic spreading could help clinicians to improve the outcome of osteosarcoma. We established the miRNA's expression-profile between primary bone-tumors (PTs), circulating tumor cells (CTCs) and lung metastatic (META) samples from *in vivo* mice xenograft models. Our results show that the expression level of the miR-198 and -206 was decreased in META samples, in which the expression of the metastasis-related receptor C-Met was up-regulated. Those expression variations were validated in osteosarcoma patient biopsies from matching primary tumors and lung metastasis. We validated *in vitro* the endogenous miRNAs inhibitory effects on both migration and invasion, as well as we confirmed by luciferase assays that the C-Met receptor is one of their *bona-fide* targets. The anti-metastatic effect of these miRNAs was also validated *in vivo*, as their direct injections into the tumors reduce the number of lung-metastases and prolongs the overall survival of the treated animals. All together, our results suggest the absence of the miR-198 and -206 as powerful predictive biomarkers of the tumor cell dissemination and the rationale of their potential therapeutic use in the treatment of Osteosarcoma.

## INTRODUCTION

With an incidence of 4 to 5 cases per million diagnosed in the United-States, Osteosarcoma is the most common primary malignant bone-tumor [1, 2]. It mainly affects children and young adults and is characterized by an osteoid neo-formation associated with osteolysis, principally occurring at the metaphysis of the long bones [3]. The current treatments of this disease are usually based on a combination of surgery and chemotherapy that have markedly improved the five-year survival rate to 60–70%. However, a significant proportion of the patients still responds poorly to chemotherapy regimens and has a high risk of local relapse or distant metastasis spreading, even after surgical resection [4, 5]. The achievement of the drug's toxicity thresholds and the presence of lung metastasis at the diagnosis time-point are the two major hindrances of the proper Osteosarcoma's cure. Despite all the therapeutic-optimization's efforts, the metastatic dissemination still dramatically compromises the cancer patients' survival and a better understanding of its underlying mechanisms is needed.

Several studies support the implication of the well known Hepatocyte Growth Factor (HGF) Receptor, C-Met in the regulation of the metastatic dissemination in a wide variety of malignancies including hepatocellular carcinoma [6], lung [7], breast [8] and colon cancers [9], as well as Osteosarcoma [10]. Understanding the mechanisms which modulate the expression of this receptor is thus of particular importance in this context. The epigenetic regulations mechanisms involving the microRNAs are just emerging and still have to be deciphered.

MicroRNAs (miRNAs) are small, 18- to 24-nucleotides non-coding RNAs that regulate gene expression by targeting the 3' untranslated region (3'UTR) of messenger RNAs (mRNAs), resulting in either mRNA cleavage or protein-translation's repression [11, 12]. Since the discovery of the first development-related miRNA in *C. elegans* [13], hundreds of others have been identified in many species, including *Homo sapiens* [14]. These epigenetic regulators are involved in plethora of natural biological processes such as proliferation, differentiation, development or apoptosis, but they have also been found to play a major role in tumorigenesis [15, 16]. Indeed, as their expression is often altered in cancer, their deregulation is furthermore frequently associated with the pathological stage of the disease. For instance, it was reported that such deregulation affects the Osteosarcoma progression, chemoresistance and metastatic dissemination [5]. The miR-183 was indeed found to be down-regulated in Osteosarcoma and its expression level was correlated with the one of the Ezrin, a protein that affects motility and invasion and which also confers the required survival advantages allowing the cells to reach the lungs [17]. In addition, it was demonstrated that restoring the miR-143's expression in Osteosarcoma cells has functional effects

both *in vitro* and *in vivo*, as it reduces the cell viability, induces apoptosis and suppresses the lung metastases [18]. Such effects were mediated through its ability to target the anti-apoptotic factor BCL-2. Finally, the miR-26a and -454 were also down-regulated in Osteosarcoma and as the expression of the former correlates with the poor prognosis of the patients and their metastatic occurrence, the latter displays anti-proliferative and anti-invasive features through its direct targeting of C-Met [19, 20]. All those evidences sustain the fact that the miRNAs are promising tools in an attempt to better understand the processes that drive malignancies, from their onset to their metastatic spreading. In line with these considerations, the miRNA-mediated control of the C-Met receptor's expression is of particular interest in the context of the Osteosarcomas' metastatic dissemination.

This was thus the purpose of this study, whose departing point was the differential expression analyze of the miRNA from primary bone tumors (PTs), Circulating Tumor Cells (CTCs) and lung metastases (MET) from an *in vivo* xenograft model of Osteosarcoma. We identified both the miR-198 and the miR-206 as two miRNAs only expressed in PTs. We have shown that their loss by some tumor cells permit them to acquire migrative and invasive capabilities, allowing them to detach from primary tumor sites, enter into the systemic circulation and grow at distant sites. By artificially modulating their expression in Osteosarcoma cells and by performing *in vitro* luciferase reporter assays, we confirmed that the Hepatocyte Growth Factor Receptor C-Met was a *bona-fide* target of these miRNAs. Such results consequently corroborate the fact that an increased expression of this receptor was found in metastases samples from both our *in vivo* model and from Osteosarcoma patients.

In a clinical approach, our work thus adds a novel glimpse at the possibility to use the miR-198 and -206 as novel molecular prognosis markers of the Osteosarcoma's metastatic spreading. In addition, this study shed lights on the potentiality to avoid the poor outcome of Osteosarcoma through restoring a sufficient expression level of these miRNAs into the tumors, which could be a hopeful therapeutic strategy for the future.

## RESULTS

### A set of miRNAs differentially expressed in primary tumors (PTs), circulating tumor cells (CTCs) and metastatic samples (METs) potentially targets the C-Met receptor for inhibition

In order to better understand to what extent the miRNAs could be involved in the metastatic spreading of the Osteosarcoma, we analyze the miRNA-profiles of bone PTs, CTCs and lung META samples obtained from an *in vivo* orthotopic xenograft model of Osteosarcoma.

1.5 million of human Osteosarcoma HOS LucF-GFP cells were thus paratibially injected in athymic mice (Figure 1A, upper panel). The tumor growth was assessed and the animals were sacrificed when the tumor's volumes reached 2500 mm<sup>3</sup> (Figure 1B). At the time of euthanasia, samples of both the bone PTs and METAs were collected from the lungs of the animals, as they are the preferentially site of metastatic dissemination in this model. CTCs were isolated from the systemic blood by cell sorting facilities, based on the granulometry, the size and the GFP-fluorescence properties of the injected tumor cells. An average of three hundred CTCs were isolated in each experiment (Figure 1A, bottom panel).

The total RNA of each kind of sample was extracted and the expression-profile of 760 known-miRNAs was established by performing Taqman low density arrays (TLDA's). The miRNA's expression-profiles obtained in the METAs samples were normalized on the ones of the PTs samples in two independent experiments (Figure 1C). To go further in our study, the strategy chosen was to focus only on the miRNAs found in PTs whose the expression is lost during the course of the metastatic spreading already at the stage of CTCs. It suggests that the target-genes normally repressed by these anti-metastatic miRNAs are involved in pathways of paramount importance in promoting the migration of the cancer cells. Eight miRNAs were thus identified as being the most under-expressed in the CTCs and the metastatic cells compared to the PTs (Figure 1D).

These candidate miRNAs were then subjected to an *in silico* analyses using the algorithms provided by TargetScan, DianaLab and miRANDA databases, in order to identify common putative targets involved in the metastatic dissemination. These analyses reveal that four of them; namely the miR-133b, -198, -206 and -582-5p were predicted to target the C-Met receptor, a well-known protein that triggers the metastatic C-Met pathway (Figure 1D, bolded miRNAs).

#### Validation of candidate miRNAs repression and C-Met overexpression in the lung-metastasis (METs) samples from both mice and patients' samples

To confirm that the four previously selected miRNAs, namely the miR-133b, -198, -206 and -582-5p are indeed under-expressed in the METAs samples compared with the PTs ones, we analysed their expression by RT-qPCR in each PT sample and the corresponding META from our initial *in vivo* model. We could indeed validate the TLDA's results, as the miR-133b and -198 were found to be overexpressed 5-fold and 8-fold respectively, in PTs compared with METAs (Figure 2A). In addition, the expression of the miR-206 is almost ablated in METAs, validating the previous Taqman results.

The miR-582-5p also follows the same expression-profile with however a less pronounced variation, less than 2-fold.

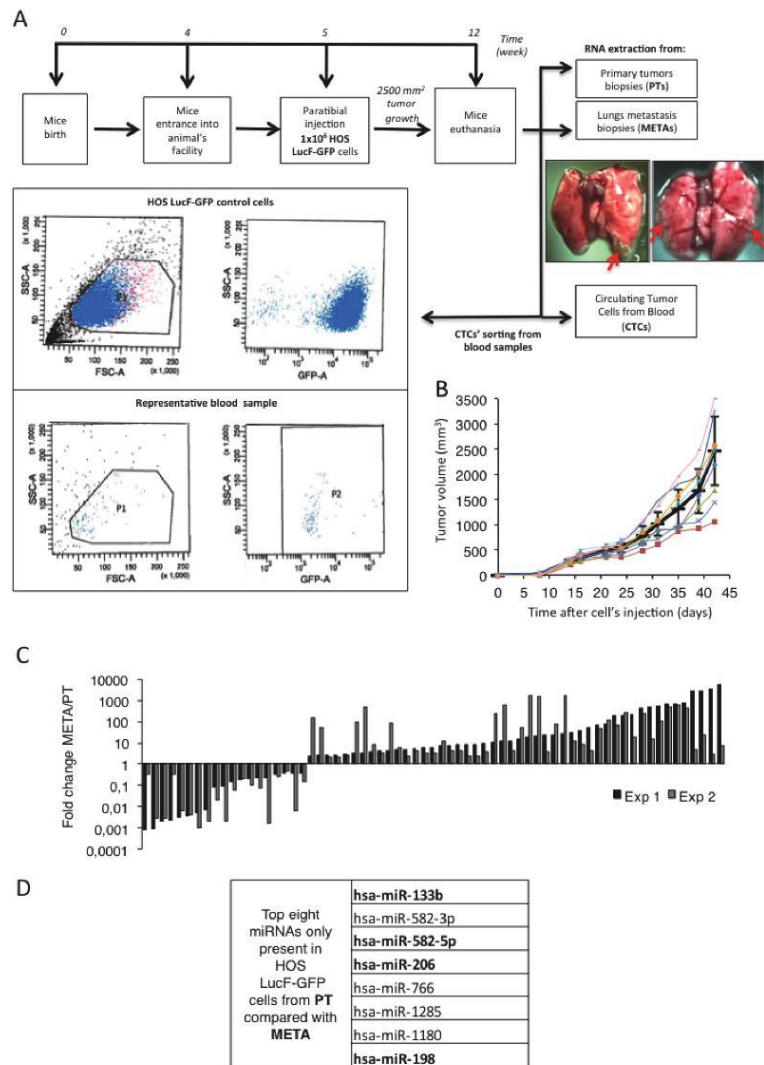
Because all the candidate miRNAs are predicted to target the C-Met receptor or are already validated as *bona-fide* C-Met inhibitor, the mRNA level of this gene was also assessed in the same samples. Interestingly, and inversely to the candidate miRNAs, we found that the C-Met receptor is more expressed in METAs than in PTs samples (Figure 2A).

In order to confirm and to give more accuracy to our *in vivo* results, we performed the same analyze with samples from four metastatic Osteosarcoma patients. The expression of the four candidate miRNAs was thus analyzed by RT-qPCR in PTs and in their corresponding lung metastasis. As observed in the *in vivo* model, all the microRNAs except the miR-582-5p are more expressed in PTs than in METAs. The expression of the miR-133b was indeed decreased by 2.5-fold, the one of the miR-198 by 1.4-fold and the one of the miR-206 by 2.6-fold (Figure 2B). Consistent with the miRNAs' expression, we found that their putative target c-Met was 2-fold more expressed in METAs than in PTs. Given the inconsistent results obtained with the miR-582-5p regarding our starting hypothesis, this miRNA was excluded from the further investigations.

All this data contributes to establish the rationale of the starting hypothesis suggesting that the loss of expression of the candidate miRNAs by some tumor cells located within the heterogeneous primary Osteosarcoma is a selecting factor for them in order to spread into the whole body (Figure 2C). As these miRNAs are potential or validated repressors of C-Met, their lost in such cells could result in an increased expression of this receptor, giving them a metastatic potential.

#### Direct inhibition of the C-Met's protein's translation by miR-198 and -206 modulates the downstream Akt and the ERK 1/2 signaling pathways

After confirming that the loss of expression of the miR-133b, -198 and -206, altogether with the concomitant up-regulation of C-Met was a feature of Osteosarcoma-metastases, we would like to confirm the C-Met receptor as a *bona-fide* target of these miRNAs. Through an *in vitro* approach, we artificially modulated the expression level of the three candidate miRNAs, by transfecting either the pre-miRNAs (miRNA mimics) or their corresponding anti-miRNAs (antisense oligonucleotides, complementary to the specific target-miRNA, inducing its degradation [21]) into HOS LucF-GFP Osteosarcoma cells. The expression of C-Met was assessed at mRNA level 72 hours after transfections and no significant differences were observed regarding the miRNAs-levels' modulations (Figure 3A).



**Figure 1: A set of miRNAs differentially expressed in primary tumors (PTs), circulating tumor cells (CTCs) and metastatic samples (METs) potentially targets the C-Met receptor for inhibition.** (A) Experimental design: 1 million HOS LucF-GFP Osteosarcoma cells paratibially injected in nude mice. The mice were sacrificed when the tumor volume reach 2500 mm<sup>3</sup> and samples from Primary bone tumors (PTs), Circulating Tumor Cells (CTCs) and metastatic nodules (METs) were collected and subjected to RNA extraction (upper panel). The lower panel shows the two scatter plots used to isolate the CTCs (representative of the 2 experiments performed), cell-granulometry (SSC) in function of the cell-size (FSC) (left panel) and SSC in function of the GFP-fluorescent signal (right panel). Both top scatter plots illustrate the control conditions used as a reference for the blood-sample CTCs' isolation, composed of the HOS LucF-GFP cells cultured *in vitro*. Both bottom scatter plots illustrate the results from the CTCs sorted from the blood-samples and P2 is composed of the CTC population recovered in one of the experiments. (B) Tumor volumes (mm<sup>3</sup>) of eight mice paratibially injected with HOS LucF-GFP cells. Average tumor volume is represented by the black thick curve. Tumor volumes were calculated with the formula ( $t^2 \times l$ )/2 where  $t$  is the tumor thickness and  $l$  is the tumor length. Error bars show s.e.m. (C) Differential miRNAs' expression-profiles assessed by Taqman low density array analysis. Each histogram shows both the fold change and the direction of change for one given

miRNA's expression regulated more than 2-folds between the PTs and the METs samples from two independent experiments (Exp 1 and Exp 2). RNU6B, RNU44 and RNU48 were used as housekeeping genes and the miRNA's expression from the METs is normalized on the PT one. (D) List of the eight microRNAs over the 760 analyzed, found to be expressed only in PTs. Analysis performed using TargetScan, DianaLab and miRANDA databases' algorithms. Four miRNAs were found to potentially target the C-Met receptor (bolded miRNAs).

However, as miRNAs can regulate the gene's expression by only preventing the protein-translation instead of directly inducing the degradation of the corresponding mRNA [22], the miRNA-mediated inhibition of C-Met has been investigated at the protein level. The C-Met protein's expression was thus analyzed by Western blotting 48 hours after transfections of our three candidates pre-miRNAs or anti-miRNAs (Figure 3B). Although only a slight reduction of the C-Met's expression was observed consequently to the pre-miRNAs transfections (Figure 3B, left panel), it is obvious that an increased expression of the receptor was obtained when the endogenous miRNAs are inhibited, especially in the anti-miR-198 and -206's conditions (Figure 3B, right panel).

To functionally support the inhibitory-power of these miRNAs on the expression of C-Met, we assessed the activation's status of the Akt and the ERK 1/2 signaling, two of the C-Met's downstream pathways. We thus evaluated the phosphorylation level of Akt and ERK 1/2 by Western blotting, forty-eight hours after either the pre-miRNAs or the anti-miRNAs' transfections (Figure 3C). Although they have no effect on the total Akt amount, all the miRNAs reduce the P-Akt level, especially the miR-198 (Figure 3C, left panel). Furthermore, they also inhibit the activation of the MAPK pathway, as illustrated by the reduced intensity of the 44 kDa-ERK1-corresponding bands. As expected, the anti-miRNAs, in particular the miR-133b and the -206 ones display the opposite effect on this pathway, by increasing the phosphorylation level of both ERK1 and 2 (Figure 3C, right panel). Surprisingly, and contrary to all expectations, the anti-miRs seem to decrease the phosphorylation of Akt. Nevertheless, this data even support that these miRNAs have functional consequences on the regulation of pathways which are normally activated by the C-Met receptor.

Finally, to further assess if the candidate miRNAs directly modulate the C-Met's expression through a direct targeting, we performed a luciferase reporter assay, by transfecting a luciferase-bearing vector in which the 3'UTR of C-Met replaces the one of the luciferase gene. Such vectors were thus concomitantly transfected with each candidate pre- or anti-miRNA and the luciferase activity was measured forty-eight hours after transfections. A significant decrease in the bioluminescence was observed consequently to the pre-miRNA-198 and -206's transfections, 37 and 45% respectively compared to the control conditions, meaning that both miRNAs are truly able to bind to the 3'UTR of C-Met (Figure 3D, left panel). Nonetheless, no similar effect was observed with the pre-miR-133b. As expected, an increase in the measured-bioluminescence was obtained in the case of

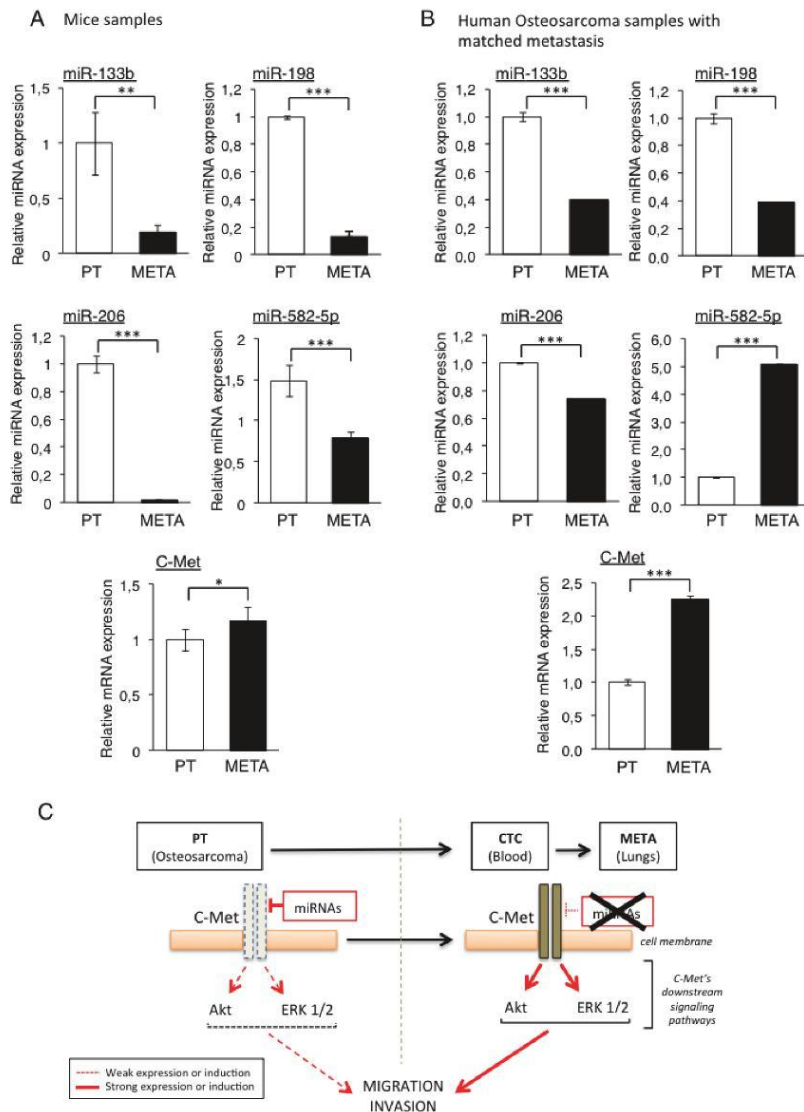
the anti-miRNAs' transfections compared with the control conditions, even if the changes monitored were not statistically significant (Figure 3D, right panel).

Curiously, even if Hu *et al.*, have previously demonstrated the direct targeting of C-Met by the miR-133b in a colorectal cancer model [23], the inconsistency in the results of both the luciferase-assay and the Western Blot analysis obtained with this miRNA does not allow us to get the same conclusion, thus we have chosen to exclude this miRNA from further studies. In agreement with the studies from Tan *et al.*, and from Yan *et al.*, our data give evidence that C-Met is a *bona-fide* target of both the miR-198 and -206, these ones exerting their epigenetic inhibitory functions through preventing the translation of this receptor into protein [24, 25].

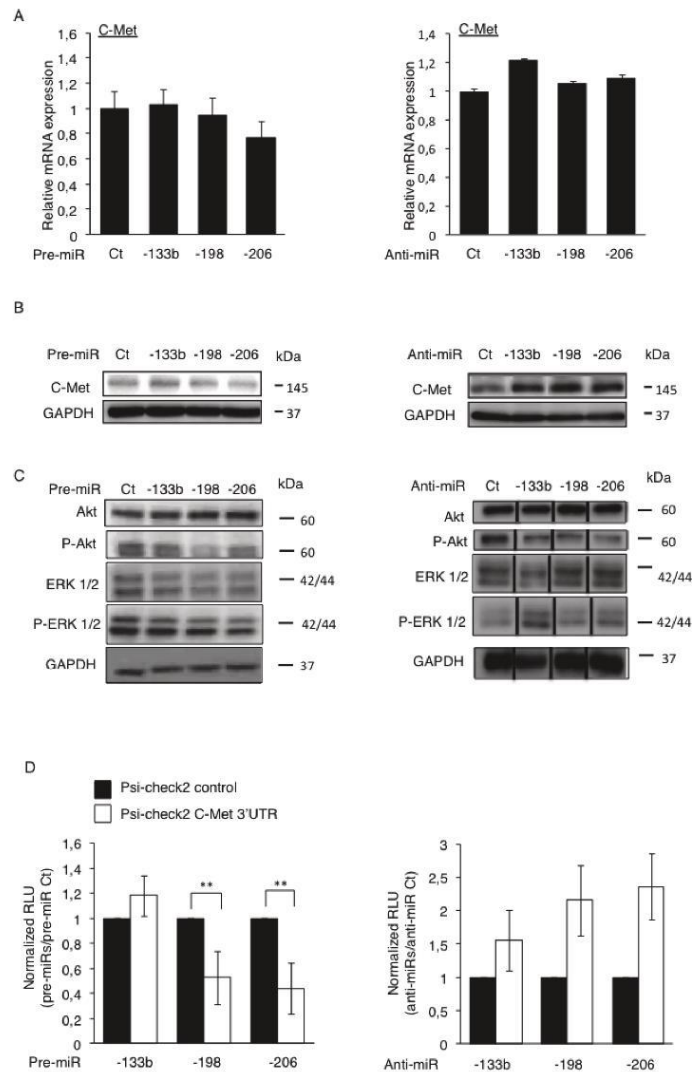
#### **miR-198 and -206 inhibit both the migration and invasion capabilities of the osteosarcoma cells *in vitro***

As previously described in the literature and as sustained by our results, it is well established that the C-Met receptor is implicated in the control of several signaling pathways, including the ERK1/2 and the Akt ones, which further regulate the cellular proliferation, migration and invasion. In line with this consideration and given the C-Met's targeting capabilities of the miR-198 and -206, the functional effects of these miRNAs on cellular migration was assessed by performing *in vitro* Boyden Chamber assays. The two miRNAs studied display significant effects on the migrative potential of the Osteosarcoma cells *in vitro*, as the pre-miR-198's transfections decreased the migration by 27.3% whereas the pre-miR-206's ones reduced it by 34.2% compared to the Control pre-miR's conditions (Figure 4A, left panel). Consistently, inhibiting these endogenous miRNAs with anti-miRNAs stimulated the cells' migration (by 16.23% and 16.86% for the anti-miR-198 and the -206 one, respectively) compared to the Control anti-miR (Figure 4A, right panel). Such results thus sustain the inhibitory effect of these miRNAs on the migrative capabilities of the Osteosarcoma cells.

For further evidence, we also performed a wound-healing assay in which a scratch was done in the HOS cells' layer, 48h after their transfection with the candidate pre-miRNAs or anti-miRNAs. In such assays, the pre-miRNAs-transfected cells display early reduced recovering features, still noticeable 12 hours after performing the scratch, compared with the control conditions (Supplementary Figure 1A, left panel). Withal, the stimulating effects of the anti-miRNAs on the migration were barely detectable in this assay (Supplementary Figure 1A, right panel).



**Figure 2: Validation of candidate miRNAs repression and C-Met overexpression in the lung-metastasis (METAs) samples from both mice and patients' samples.** The four candidate miRNAs' expression (miR-133b, -198, -206 and -582-5p) as well as C-Met were analysed by RT-qPCR from xenografted-Osteosarcoma from mice samples (A) and from four metastatic Osteosarcoma patients (B). The expression levels were compared between primary tumors (PTs) and their associated metastases (METs).  $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$ . One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison tests were used to compare the significance of the results. Average expression and error bars (s.d.) are represented for  $n = 3$  measurements from representative experiments. RNU6B, GAPDH and B2M are used as housekeeping genes. (C) Rationale of the hypothetic mechanism: cells from the primary bone tumor (PT) express the candidates miRNAs predicted to target C-Met, thus maintaining a low activity of this receptor and its downstream signaling pathways, keeping the PT cells at their initial site. The miRNAs' loss of expression in Circulating Tumor Cells (CTCs) and metastatic nodules (METAs) releases the pressure exerted on C-Met, resulting in increasing both its expression and activity, thus enhancing the metastatic potential of those cells.



**Figure 3: Direct inhibition of the C-Met's protein's translation by miR-198 and -206 modulates the downstream Akt and the ERK 1/2 signaling pathways.** The expression of C-Met was assessed at mRNA level by RT-qPCR (A) and at protein level by Western blotting (B) in the HOS LucF-GFP Osteosarcoma cell line pre-miRNAs' (left panel) or anti-miRNAs' transfections (right panel). Error bars show s.d. for  $n = 3$  measurements from representative experiments. GAPDH and B2M were used as housekeeping genes. (C) The expression of Akt, P-Akt, ERK1/2 and P-ERK1/2 was assessed by Western blotting in the HOS LucF-GFP Osteosarcoma cell line 48 hours after either the pre-miRNAs' transfections (left panel) or the anti-miRNAs' ones (right panel). For all the Western blots presented, the GAPDH was used as an internal loading control. (D) The HOS LucF-GFP Osteosarcoma cells were co-transfected with the indicated pre-miRNAs (left panel) or anti-miRNAs (right panel), together with either the UTR-reporter (Psi-check2 C-Met 3'UTR, white bars) or the control vector (Psi-check2 control, black bars), the cells were lysed forty-eight hours after transfections and the luciferase bioluminescence was assessed. Results are shown as relative luciferase units (RLU) normalized to the control pre/anti-miR, and the control vector's results were assigned to 1. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Error bars show s.d. for  $n = 3$  measurements from representative experiments. One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison tests were used to compare the significance of the results.



We then wondered if the miR-198 and -206 also modulate the invasive properties of the Osteosarcoma cells. Matrigel-coated Boyden Chamber assays reveal that in the pre-miRNAs' transfections' conditions, the invading cells' proportion was decreased by more than 70% for each miRNA, compared to the control conditions (Figure 4B, left panel). Moreover, the transfections with the antagonists, especially the one with the anti-miR-198, induced an increase in the invasive capacities of the cells, which were enhanced by 287% in this case (Figure 4B, right panel).

As the invasive capabilities of the cells are often correlated with the expression of the Matrix Metalloproteinases (MMPs), we wondered if the miRNAs of interest inhibit the Osteosarcoma cell's invasiveness through modulating the expression of c-Met and indirectly the expression and/or the activity of the MMPs. Our qPCR results show that the miR-133b, -198 and -206 are all able to reduce the MMP1's expression whereas neither seem to impact the MMP2's one (Supplementary Figure 1B). In addition, only the miR-206 displays a slight inhibitory effect on the MMP9's expression. We complete this study by assessing the activity of the MMPs in the culture-media through zymography assays from the proteins secreted by the malignant cells. The results show that both the MMP2's and the MMP9's activities are reduced after increasing the miR-133b's expression only (Supplementary Figure 1C). Taken together, this body of data argues for the crucial role played by the miR-198 and -206, not only on the migration, but also in the invasion process, two prerequisite steps contributing to the metastatic-nodules formation.

As the cell survival is another biological aspect sustained by the activation of the C-Met receptor and its downstream pathways, we finally checked the implication of the miR-198 and -206 in modulating this component. However, the WST-1 assays results show no significant differences in terms of viability in cells overexpressing either the miR-198 or the miR-206 compared to the control cells (Figure 4C). Nonetheless, this data sustains that these miRNAs' effects, previously observed on both the migrative and the invasive capabilities of the Osteosarcoma cells, are only attributable to their inhibitory effects on pathways directly related to these functions and are not caused by modulations in the cell survival, arguing still here for their anti-metastatic role.

#### **The miR-198 and -206 reduce the metastatic spreading of osteosarcoma in a HOS LucF-GFP xenograft model and prolong cancer-specific survival**

To finally support the *in vitro* anti-migrative capabilities of the miR-198 and -206, we assessed their power in further inhibiting the *in vivo* metastatic dissemination of Osteosarcoma. We thus used an Osteosarcoma xenograft model in which athymic mice were

paratibially injected with 1.5 million HOS LucF-GFP cells. When the tumor volumes reached approximately 100 mm<sup>3</sup>, the mice received the pre-miR Control (Ct), the pre-miR-198 or the pre-miR-206 as intra-tumoral injections, three times a week (Figure 5A). The average tumor growth was followed in each group until the time of euthanasia. At that time the lungs were dissected and subjected to a luciferase-monitored counting of the metastasis number.

The miR-198 doesn't display a significant effect on the tumor growth after the forty-seventh day following the tumor cells injection while the miR-206's injected group shows a slowed tumor progression (Figure 5B). Furthermore, the intra-tumoral's miRNAs' injections significantly improve the overall mice-survival (Figure 5C).

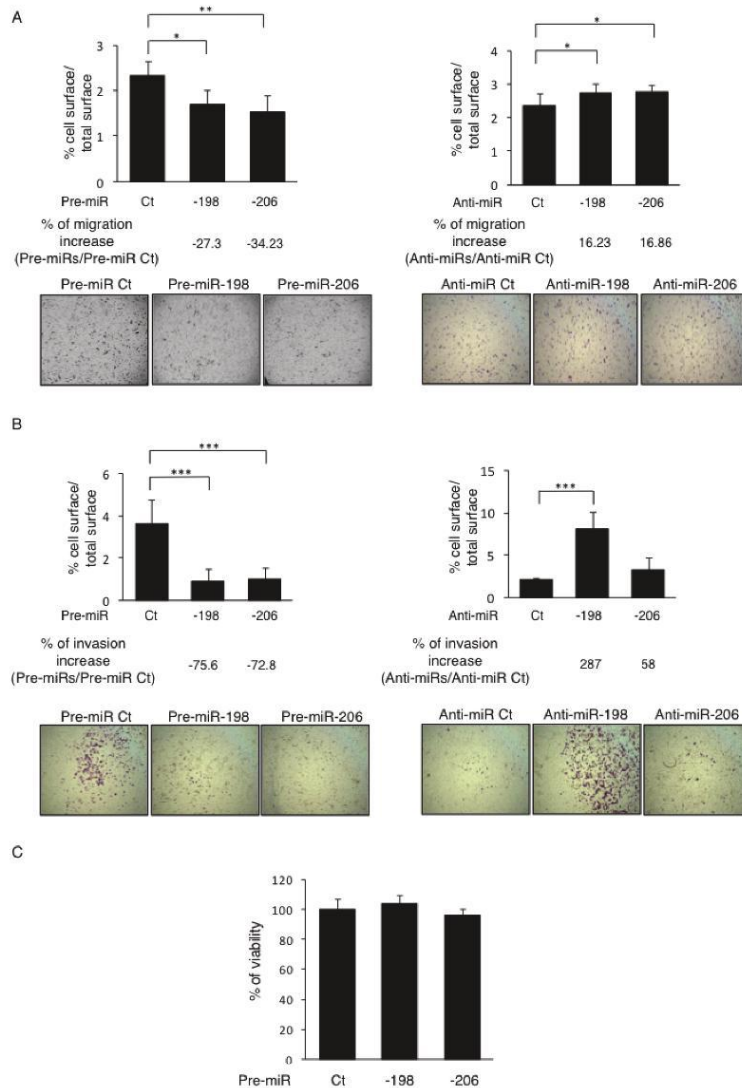
Moreover, although about 78% of the animals develop metastasis in the Control group, only 25 and 56% display any secondary lung-metastases in the pre-miR-198 and -206 injected groups, respectively (Figure 5D). In addition, both miRNAs reduce the number of the lung-metastases developed by the animals, especially the miR-198 which decreases by about four times the average metastatic spreading compared with the Control miRNA's injected group (Figure 5E). In parallel, we observed that the reduced expression of both the miR-198 and the miR-206 in the metastases samples compared with the primary tumors ones is less pronounced in the pre-miR-206's injected mice group than in the Control one (Supplementary Figure 2A, 2B). In conclusion, the injection of these miRNAs not only impacts the number of the animal-bearing metastasis, but also the average metastasis number per animal.

In addition, the protein expression of C-Met in PT samples from the miR-206's injected group is reduced compared with the Control one (Supplementary Figure 2C, 2D), thus reinforcing the demonstration of the *in vivo* inhibitory effect of this miRNA on its target and its consequent impact on the metastasis occurrence.

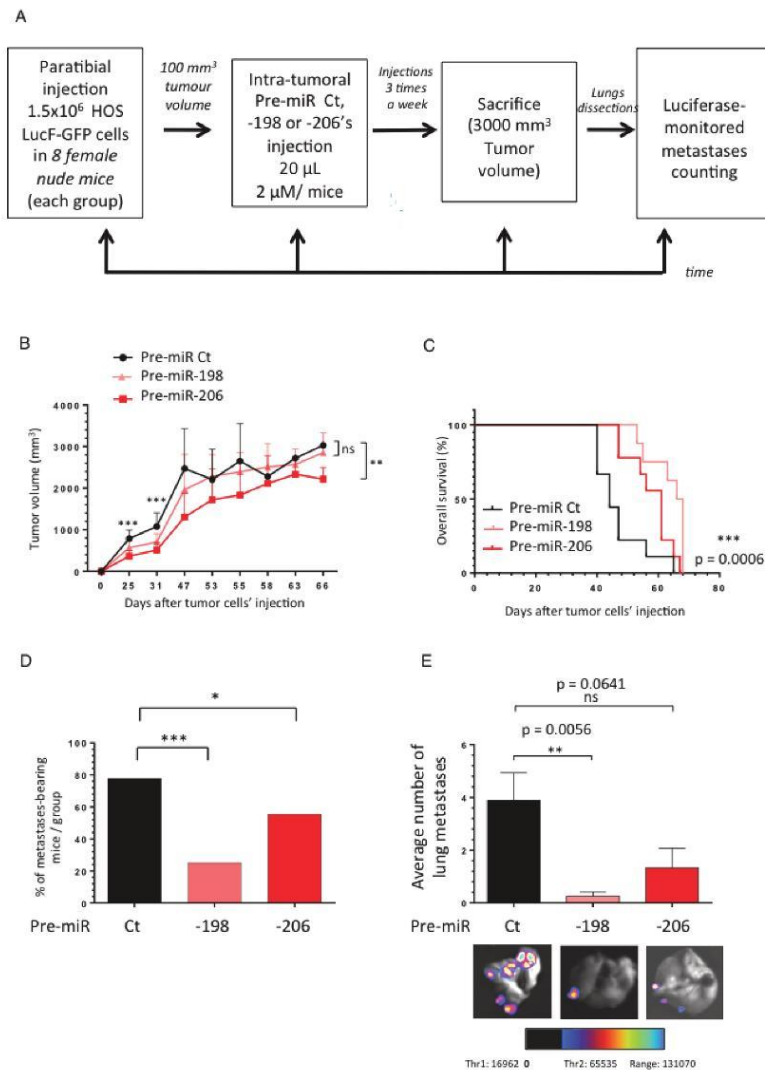
These data bring the proof of concept of the use of these miRNAs as potential therapeutic tools in order to control the metastatic spreading of the Osteosarcoma.

## **DISCUSSION**

The metastatic spreading of the tumor's cells is one of the main causes of the cancer-therapies' failure, especially in Osteosarcoma in which only few therapeutic options are available. As this multistep-process depends on the intrinsic properties of the tumor cells and the treatment-responses from the patients, it seems by far obvious that this evasion-mechanism is regulated by both genetic and epigenetic components [26]. Its genetic-related fraction can at least partially correspond to the accumulation of oncogenes' activating-mutations by the most genetically unstable cells within the heterogeneous primary tumor. Such mutations-bearing cells can acquire new properties, allowing them to detach from the bone-



**Figure 4: miR-198 and -206 inhibit both the migrative and invasive capabilities of the osteosarcoma cells *in vitro*.** (A) The migrative capabilities of the Osteosarcoma cells were assessed by migration assays in Boyden Chambers. The HOS LucF-GFP cells were transfected with the indicated pre-miRs (left panels) or anti-miRs (right panels) and 30 000 cells were seeded on the upper surface of the 8  $\mu$ m-pored-Chambers in a 1% FBS-containing medium. The cells that had migrated to the lower surface of membranes after 24 h of incubation were counted. Histograms show the percentage of the lower membranes' surface occupied by cells / the total lower membranes' surface. Representative pictures were taken. Error bars show s. e. m. for  $n = 3$  measurements from representative experiments. (B) The invasive capabilities of the cells were assessed as the same way as presented in (A), the upper surfaces of the Boyden Chambers were preliminary coated with 50 ng of Matrigel. (C) The viability of the cells was assessed through WST-1 assays in HOS LucF-GFP cells 72 h after the cells' transfections with the pre-miRNAs -198, -206 or controls (Ct). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Error bars show s. e. m. for  $n = 3$  measurements from representative experiments. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test was used to assess the significance of the results in the experiments presented here.



**Figure 5: The miR-198 and -206 reduce the metastatic spreading of osteosarcoma in a HOS LucF-GFP xenograft model and prolong cancer-specific survival.** (A) Experimental design: 1.5 million HOS LucF-GFP Osteosarcoma cells were paratibially injected in nude mice. Three groups of eight mice were then randomly assigned and each one was intra-tumorally injected with either the Pre-miR Ct, the -198 or the -206 ones three times a week since the tumor volumes reached 100 mm<sup>3</sup>. The tumor growth was monitored until the time of the euthanasia, when the tumors were approximately 3000 mm<sup>3</sup>. At this time, the lungs were dissected and subjected to a luciferase-monitored counting of the metastases. (B) The mean tumor volume of the treated-mice was compared with control group ± s.e.m. (*n* = 8 mice in each group). A Two-way ANOVA statistical test was used to compare the effect of the different miRNAs on the tumor growth. (C) In Kaplan–Meier curves, cancer-specific survival were compared between mice treated with Pre-miR Ct, Pre-miR-198 and -206. The log-rank (Mantel-Cox) test was used to compare the overall survival between the three groups. (D) Histograms represent the percentage of the lung metastases-bearing mice depending on the treatment-groups. (E) Histograms show the average number of metastases counted thanks to luciferase-monitoring in each group of mice. Representative overlay illustrating pictures were presented. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

primary site, enter into the circulation, extravasate and thereby grow at secondary organs, preferentially the lungs in the case of the Osteosarcoma [27].

Furthermore, beyond the mutational processes undergone by oncogenes, their epigenetic modulation through the miRNA-silencing machinery is another alternative way to control their expression level, consequently impacting the metastatic dissemination. Even if some studies have already demonstrated the implication of such tumor-suppressor miRNAs in the metastatic-dissemination of Osteosarcoma, their precise functions still need to be deciphered in this context. For instance, it was reported that the miR-26b inhibits the metastatic spreading of this cancer through both its CTGF and Smad1 direct targeting [28]. In addition, the miR-33b-mediated inhibition of C-Myc was reported to decrease both the migrative and the invasive properties of the MG63 Osteosarcoma cells *in vitro* [29]. Therefore, identifying new miRNAs/targets couples involved in the metastatic progression of Osteosarcoma appears of paramount interest in an attempt to use them as biomarkers to improve the diagnostic, the prognostic and the outcome of this rare malignancy.

Here, we report that human primary Osteosarcoma samples from *in vivo* xenograft models harbor a different miRNA-signature compared with their associated distant lung-metastases. We found that among the most differentially expressed miRNAs, four in particular, namely; the miR-133b, -198, -206 and -582-5p are only expressed in the cells from bone-primary sites (Figures 1C, 1D, 2A). Interestingly, the loss of expression of these miRNAs was confirmed in metastatic samples from Osteosarcoma patients compared with their primary tumor biopsies (Figure 2B).

Over both *in vitro* and *in vivo* experiments, we have more precisely defined that the down-deregulation of the miR-198 and -206 are associated features allowing the metastatic spreading of the Osteosarcoma cells. Indeed, by modulating the expression of these miRNAs *in vitro*, we highlighted their functional implication in regulating both the migrative and the invasive capacities of the cells (Figure 4A, 4B and Supplementary Figure 1A). In addition, we confirmed that such functional effects were at least partially mediated through these miRNAs' direct binding-capabilities towards the 3'UTR of the tyrosine-kinase receptor C-Met, as previously described in other models (Figure 3D) [24, 25]. Furthermore, our results are in accordance with another study, reporting that inhibiting the expression of this receptor through a siRNA-mediated strategy or by using a pharmacologic inhibitor, the Crizotinib, prevented the uveal melanoma's metastatic spreading [30]. In addition, it was shown that the expression of this receptor was gradually increased during the course of the colorectal cancer development, as well as it was correlated with its liver-metastatic dissemination [9]. In line with this data, we have also

shown that the C-Met's expression was up-regulated in the lung-metastases from our mice Osteosarcoma xenograft model and, even more importantly, in the ones from Osteosarcoma's patients (Figure 2A, 2B).

As the metastatic dissemination-related functional effects of the miR-198 and -206 are at least partially attributable to their direct targeting of C-Met (Figure 3A, 3B), we have also demonstrated that they consequently act on the activation levels of two of its downstream pathways, the ERK ½ and the Akt ones (Figure 3D) [31, 32]. Besides, a recent work highlighted the implication of the ERK ½ signaling in the metastatic dissemination of the Osteosarcoma cells, as it reports that a (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment markedly inhibits both the migrative and the invasive capabilities of the cells, as well as it reduces the P-ERK level [33]. Additionally, it was also demonstrated that the EMT is mediated by the ERK ½ pathway in Osteosarcoma cells [34]. Moreover, the crucial role of the PI3K/Akt pathway in the metastatic development of Osteosarcoma was also reported, this pathway displaying a significant higher activation level in lung-metastasis bearing patients compared with the non-metastatic ones [35]. Interestingly, the PI3K/Akt pathway is also linked to the EMT and the invasive capabilities of the Osteosarcoma cells, as it contributes to the Matrix Metalloproteinases' activation. It was indeed reported that inhibiting this pathway decreases both the MMP2 and the MMP9 activities, further impeding the metastatic spreading of the murine Osteosarcoma cell line LM8, nevertheless highly aggressive [36]. This data are linked to the anti-invasive potential of the miR-198 and -206, here rather associated with their inhibitory effect on the MMP1's expression (Figure 4B and Supplementary Figure 1B).

Furthermore, in a therapeutic approach, this study brings the proof of concept that the miR-198 and -206 could be employed as powerful treatment-tools in the Osteosarcoma context. To our knowledge, it is indeed the first time that the direct intra-tumoral injection of these miRNAs was performed in a Bone Sarcoma model. Our study shows that, used as therapeutics, these miRNAs reduce both the tumor growth and the metastatic-spreading, further resulting in increasing the mice's overall survival (Figure 5). Besides, our data even strengthen the relevance of using these miRNAs in an Osteosarcoma's context, as the anti-migrative and the anti-invasive roles of the miR-198 were previously demonstrated in this pathology, due to its direct binding to another target gene : ROCK1 [37]. In addition, these authors demonstrated that the expression level of this miRNA was correlated with the TNM stage and the metastatic spreading of the disease. In gastric, colorectal and lung cancers a decrease in the miR-198's expression was also correlated with the metastasis occurrence [38-40]. Furthermore, Osteosarcoma patients displaying low levels of miR-206 and -133b in tumor and sera were shown to exhibit high Osteosarcoma grade as well as distant metastasis [41, 42].

Such results complete the mode-of-action-related knowledge about the miR-198 and -206 and shed light on their crucial role in the metastatic spreading of the Osteosarcoma, at least through their direct C-Met targeting. In a clinical context, this work thus aims to open the road to new therapeutic opportunities provided by the use of a synthetic version of these molecules, in an attempt to improve the outcome of this pediatric cancer.

## MATERIALS AND METHODS

### Tumor cell lines and patient tumor material

The HOS LucF-GFP cells are modified MNNG/HOS cells (young female high grade Osteosarcoma from femoral origin, transformed *in vitro* by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine treatment) that include the Firefly luciferase (LucF) and the Green Fluorescent protein (GFP) genes stably inserted in their genome. Cell modification was done by lentiviral infection following the procedure previously described to modify mouse POS-1 and rat OSRGA cell lines [43]. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen-Life Technologies Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone), 2 mmol/L L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin. The cells were maintained in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/air atmosphere at 37° C and were passaged for less than 3 months.

Osteosarcoma cell lines sub-populations were obtained at the time of diagnostic biopsy (B) or after surgical resection of lung metastasis (M), in patients diagnosed with Osteosarcoma at the Hospital of the University of Navarra (Clinica Universidad de Navarra, CUN, Pamplona, Spain). Samples were obtained following patient informed consent and after ethical approval by the Navarra University Hospital Ethics Committee. All sub-populations were thoroughly characterized as previously described by Patiño-García *et al.*, [44]. The Supplementary Table 1 contains all the patients' details.

### Animal treatment

All procedures involving mice (their housing in the Experimental Therapeutic Unit at the Faculty of Medicine of Nantes (France) and care, the method by which they were anesthetized and killed and all experimental protocols) were conducted in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA.PdL.06). MNNG/HOS osteolytic xenograft model was induced by paratibial injection of  $1.5 \times 10^6$  of HOS LucF-GFP cells in five weeks-old female athymic nude mice (Harlan Sprague-Dawley, Inc.), leading to a rapidly growing tumor in soft tissue with secondary contiguous bone invasion. The tumor growth was monitored three times weekly and tumor volumes were calculated by

using the formula: length\*width\*depth\*0.5. Data points were expressed as average tumor volume  $\pm$  s.e.m. until a maximum of 2500 mm<sup>3</sup>.

Mice were anesthetized by inhalation of a combination of isoflurane/air (1.5%, 1L/min) and blood was collected in tubes containing EDTA (1.5 mg  $\pm$  0.35 mg EDTA/mL of blood) by intracardiac puncture. Blood samples were incubated with a red-cells lysis buffer (composition: 8.26 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub>, 200  $\mu$ L EDTA 0.5 M, pH 8; all together diluted in 100 mL ddH<sub>2</sub>O; filtered and adjusted to pH 7.4) and the remaining cells were counted and diluted in PBS 2% FBS + 0.7 mM EDTA. From *in vitro* culture  $1 \times 10^6$  HOS LucF-GFP cells were trypsinized and diluted in PBS 2% FBS + 0.7 mM EDTA and served as a control for CTCs' isolation. Cell sorting was made in the cell sorting facility SFR/INSERM U892. Primary tumor samples and lungs from each animal were also collected. Lungs observation and further metastasis dissection and collection were done under an optic microscope. RNA was extracted from all samples.

### Luciferase-monitored counting of the metastasis

The mice were sacrificed seven minutes after they received an intra-peritoneal injection of 250  $\mu$ L of a luciferine solution. The lungs were dissected and the EG&G Berthold Night Owl *In-vivo* Molecular Imaging System facility associated to the WinLight 32 software, were used to monitor the disseminated HOS LucF-GFP cells and to count the lung-metastasis.

### RNA extraction

Cultured cells and *in vivo* samples were lysed with 700  $\mu$ L of "QIAzol<sup>®</sup> Lysis Reagent" (QIAGEN, CA, USA). Messenger RNA (mRNA) and miRNA were extracted with the "QIAGEN miRNeasy Mini Kit" (QIAGEN) following manufacturer's instructions. The mRNA concentration was measured by optical density (OD) at 230, 260 and 280 nm thanks to a spectrophotometer (Nanodrop, Thermo Scientific).

### Taqman low density array (TLDA)

RNAs from the isolated CTCs, PTs and MET samples were sent to the IGGM (*Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier*) where the expression of 760 miRNAs was analyzed by Taqman Low Density Array (TLDA). To obtain the miRNAs' expression profiles of the above-mentions samples, data was normalized with three reference miRNAs (RNU6B, RNU44 and RNU48), with respect to primary tumors and a 2-fold difference was considered as significant threshold regarding each miRNA's expression variation. The results from two independent experiments were compared.

### Quantitative reverse transcription-PCR

The mRNA was retro-transcribed into complementary DNA (cDNA) with the ThermoScript™ RT-qPCR System (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. Real-time monitoring of PCR amplification of cDNA was performed using DNA primers (primers sequences are available in Supplementary Table 2) on CFX96 real-time PCR detector system (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) with SYBR PCR Master Mix buffer (Bio-Rad). Target genes expression were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and  $\beta$ -2 microglobulin (B2M) levels in respective samples as an internal standard and the comparative cycle threshold (Ct) method was used to establish a relative quantification of target mRNAs. Each assay was performed in triplicate.

A specific reverse-transcription (RT) was performed for each miRNA from 100 ng of total RNA, using a specific stem-loop RT primer (50 nM) and the MultiScribe Reverse transcriptase (Applied Biosystems). The mature miRNAs' expression levels were measured by Real-time qPCR using the SYBR PCR Master Mix buffer (Bio-Rad) and a CFX96 real-time PCR detector system (Bio-Rad). The expression of each gene was normalized to the one of the small nuclear RNU6B RNA as a reference. All experiments were performed in triplicate. Primers sequences are available in Supplementary Tables 3 and 4.

### Transfections

MirVana™ miRNA mimics (pre-miRNAs) or mirVana™ miRNA inhibitors (anti-miRs) (Ambion, Invitrogen) were transfected at 30 nM final concentration thanks to the siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent (Invitrogen), following manufacturer's instructions.

### Western blotting analysis

Samples containing equal amounts of protein (depending on the antibody, 5–50  $\mu$ g) from lysates of cultured Osteosarcoma cells underwent electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels and were transferred to polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes. The membranes were blocked in 3% BSA-PBS-0.05% Tween at room temperature for 1 h and blots were probed overnight at 4° C with the following primary antibodies : rabbit anti-MET (C-12), 1:500; Santa Cruz Biotechnology, rabbit anti-Akt #9272S, 1:1000; rabbit anti-P-Akt (S473) #9272S, 1:1000; rabbit anti-p44/42 #9102S, 1:1000; rabbit anti-P-44/42 MAPK (T202/Y204) #4370S, 1:2000; or rabbit anti-GAPDH 14c10, 1:2000; Cell Signaling Technologies, Beverly, CA, to detect proteins of interests. After incubation, the membranes were washed 3 times with washing buffer (PBS containing 0.05% Tween) for 5 min. Membranes were then incubated for 1 h with 1:10,000 diluted secondary antibody (goat-anti-rabbit

sc-2004 #J1512, 1:10000; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) at room temperature. Specific proteins were detected using SuperSignal® WestDura Extended Duration Substrate (ThermoScientific, Rockford, USA) and a G-Box (Syngene, Cambridge, UK) after washing. Pictures were analysed thanks to the ImageJ software. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as an internal loading control.

### Luciferase reporter assay

HOS LucF-GFP cells were cultured in 24 well-plate (40,000 cells/well) and transfected with 10 ng of either control reporter vector (Psi-check2 control) or UTR-reporter vector (Psi-check2 C-Met 3'UTR) together with pre/anti-miRs control, -133b, -198 and -206 (15  $\mu$ M) following manufacturer's recommendation thanks to the siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent (Invitrogen). Forty-eight hours after transfection, cells were lysed and the luciferase activity was measured with the "Dual-Luciferase® Reporter Assay System" kit (Promega). 25  $\mu$ L of substrates for Renilla and Firefly luciferases are added each time to the lysed cells and the resultant bioluminescence was measured with TriStar LB 941 (Berthold Technologies). Psi-check2 C-Met 3'UTR was a kind gift from Dr. Chonglin Luo German (Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany) in which the C-Met 3'UTR sequence was inserted between the NotI and XhoI sites [45].

### Migration and invasion assays

HOS LucF-GFP cells were transfected with the indicated pre-miRs or anti-miRs and 30 000 cells were seeded on the upper side of a Transwell Chamber (Falcon), on a porous transparent polyethyleneterephthalate (PET) membrane (8- $\mu$ m pore size) in 1% FBS. The lower chamber of the Transwell was filled with growth medium containing 10% FBS. Such 1%/10% FBS-gradient was generated between the upper and the lower Chambers of the system, to promote the cell migration. After 24 hours of incubation, cells on the upper side of the Chambers were mechanically removed and cells that migrated to the lower side were fixed with 10% Glutaraldehyde and stained with 0.1% Crystal Violet. Pictures of the Chambers were taken and five different areas were arbitrary chosen to perform quantitative analyses. Representative pictures of the Boyden were chosen here. For all the Boyden Chambers experiments, error bars show the standard deviation for  $n = 8$  measurements from representative experiments and two-tailed paired Student's *t*-tests were used to compare the different conditions.

The same procedure was used to monitor the invasive capabilities of the cells, with this difference that the upper side of the Transwell Chambers were Matrigel-coated (50 ng Matrigel/well).

### Time-lapse scratch assays

HOS LucF-GFP cells were plated in 24-well plate and transfected with the indicated pre/anti-miRs (50 nM). 48 hours later and upon cell confluence, scratches on the center of the wells were performed thanks to pipet-tips. The scratch recovery was recorded for 24 h and pictures were taken every 10 minutes. Calculations were made with AxionVisionRel 4.8 software (Zeiss).

### Viability assays

HOS LucF-GFP Osteosarcoma cells were plated in 96-wells plates (2000 cells/well) and transfected with the pre-miRs, as previously mentioned. The cell viability was evaluated with WST-1 solution (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate, Roche, Mannheim, Germany). 72 hours after the transfections, the culture medium was removed and replaced by the WST-1 reagent diluted in fresh medium in a 1:10 proportion. After a 7 hours incubation time, the absorbance at 470 nm was measured for each well on a 96-multiwell microplate reader (Victor<sup>2</sup> 1420; PerkinElmer Inc.) and normalized to the average reading of wells containing medium only. Each assay was performed in triplicate. The viability percentage is calculated by this formula: OD at 470 nm with indicated pre-miR/OD at 470 nm with Control pre-miR × 100.

### Statistical analysis

All error bars show SEM (s.e.m.) or SD (s.d.) for at least triplicate measurement from representative experiments. Statistical tests were done with GraphPad Prism 6 software ( $^* = p \leq 0.05$ ,  $^{**} = p \leq 0.01$ ,  $^{***} = p \leq 0.001$ ). In the case of comparing two samples, two-tailed Student *t*-tests were performed, whereas multiple comparisons were analysed by one-way ANOVA tests followed by a Dunnett's test. The test used in each case is indicated on the legend of the corresponding figure. Error bars from the *in vivo* tumor growth monitoring represent the s.e.m. from the mean tumor volume of the mice ( $n = 8$  mice in each group). A  $p < 0.05$  was used as the criteria for statistical significance.

### Author contributions

BO, FL, MB, PFC and DH designed the project, interpreted the data and wrote the manuscript.

SG, CJ, LJC, ML, BM, FL, TQ and MTG performed the experiment, interpreted the data, wrote the manuscript and designed the figures.

### ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

Thanks for the financial support of Région pays de la Loire, Ligue contre le cancer, SFCE, Etoile de martin, Fondation ARC.

### CONFLICTS OF INTEREST

None of the authors has any financial interest in relation to this study

### REFERENCES

1. Geller DS, Gorlick R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2010; 8:705–718.
2. Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist*. 2004; 9:422–441.
3. Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*. 2009; 152:3–13.
4. Gorlick R. Current concepts on the molecular biology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*. 2009; 152:467–478.
5. Kobayashi E, Hornicek FJ, Duan Z. MicroRNA Involvement in Osteosarcoma. *Sarcoma*. 2012; 2012:359739.
6. Ogunwobi OO, Puszyk W, Dong HJ, Liu C. Epigenetic upregulation of HGF and c-Met drives metastasis in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2013; 8:e63765.
7. Cassinelli G, Lanzi C, Petrangolini G, Tortoreto M, Pratesi G, Cuccuru G, Laccabue D, Supino R, Belluco S, Favini E, Poletti A, Zunino F. Inhibition of c-Met and prevention of spontaneous metastatic spreading by the 2-indolinone RPI-1. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5:2388–2397.
8. Ebrahim HY, Elsayed HE, Mohyeldin MM, Akl MR, Bhattacharjee J, Egbert S, El Sayed KA. Norstictic Acid Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation, Migration, Invasion, and *In Vivo* Invasive Growth Through Targeting C-Met. *Phytother Res*. 2016; 30:557–566.
9. Gayyed MF, Abd El-Maqsoud NM, El-Hameed El-Heeny AA, Mohammed MF. c-MET expression in colorectal adenomas and primary carcinomas with its corresponding metastases. *J Gastrointest Oncol*. 2015; 6:618–627.
10. Cantiani L, Manara MC, Zucchini C, De Sanctis P, Zuntini M, Valvassori L, Serra M, Olivero M, Di Renzo MF, Colombo MP, Picci P, Scotlandi K. Caveolin-1 reduces osteosarcoma metastases by inhibiting c-Src activity and met signaling. *Cancer Res*. 2007; 67:7675–7685.
11. Nana-Sinkam SP, Croce CM. Clinical applications for microRNAs in cancer. *Clin Pharmacol Ther*. 2013; 93:98–104.
12. Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett*. 2013; 329:125–136.
13. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75:843–854.
14. Pasquinelli AE, Ruvkun G. Control of developmental timing by micromas and their targets. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002; 18:495–513.

15. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol*. 2009; 27:5848–5856.
16. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:259–269.
17. Zhao H, Guo M, Zhao G, Ma Q, Ma B, Qiu X, Fan Q. miR-183 inhibits the metastasis of osteosarcoma via downregulation of the expression of Ezrin in F5M2 cells. *Int J Mol Med*. 2012; 30:1013–1020.
18. Zhang H, Cai X, Wang Y, Tang H, Tong D, Ji F. microRNA-143, down-regulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting Bcl-2. *Oncol Rep*. 2010; 24:1363–1369.
19. Song QC, Shi ZB, Zhang YT, Ji L, Wang KZ, Duan DP, Dang XQ. Downregulation of microRNA-26a is associated with metastatic potential and the poor prognosis of osteosarcoma patients. *Oncol Rep*. 2014; 31:1263–1270.
20. Niu G, Li B, Sun J, Sun L. miR-454 is down-regulated in osteosarcomas and suppresses cell proliferation and invasion by directly targeting c-Met. *Cell Prolif*. 2015; 48:348–355.
21. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9:775–789.
22. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:4034–4039.
23. Hu G, Chen D, Li X, Yang K, Wang H, Wu W. miR-133b regulates the MET proto-oncogene and inhibits the growth of colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol Ther*. 2010; 10:190–197.
24. Tan S, Li R, Ding K, Lobie PE, Zhu T. miR-198 inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting the HGF/c-MET pathway. *FEBS Lett*. 2011; 585:2229–2234.
25. Yan D, Dong Xda E, Chen X, Wang L, Lu C, Wang J, Qu J, Tu L. MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. *J Biol Chem*. 2009; 284:29596–29604.
26. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:453–458.
27. Zhu L, McManus MM, Hughes DP. Understanding the Biology of Bone Sarcoma from Early Initiating Events through Late Events in Metastasis and Disease Progression. *Front Oncol*. 2013; 3:230.
28. Duan G, Ren C, Zhang Y, Feng S. MicroRNA-26b inhibits metastasis of osteosarcoma via targeting CTGF and Smad1. *Tumour Biol*. 2015; 36:6201–6209.
29. Xu N, Li Z, Yu Z, Yan F, Liu Y, Lu X, Yang W. MicroRNA-33b suppresses migration and invasion by targeting c-Myc in osteosarcoma cells. *PLoS One*. 2014; 9:e115300.
30. Surriga O, Rajasekhar VK, Ambrosini G, Dogan Y, Huang R, Schwartz GK. Crizotinib, a c-Met inhibitor, prevents metastasis in a metastatic uveal melanoma model. *Mol Cancer Ther*. 2013; 12:2817–2826.
31. Paumelle R, Tulasne D, Kherrouche Z, Plaza S, Leroy C, Reveneau S, Vandenbunder B, Fafeur V. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene*. 2002; 21:2309–2319.
32. Hui AY, Meens JA, Schick C, Organ SL, Qiao H, Tremblay EA, Schaeffer E, Uniyal S, Chan BM, Elliott BE. Src and FAK mediate cell-matrix adhesion-dependent activation of Met during transformation of breast epithelial cells. *J Cell Biochem*. 2009; 107:1168–1181.
33. Tang G, Zhang Z, Qian H, Chen J, Wang Y, Chen X, Chen B, Chen Y. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits osteosarcoma cell invasiveness by inhibiting the MEK/ERK signaling pathway in human osteosarcoma cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2015; 34:85–93.
34. Hou CH, Lin FL, Hou SM, Liu JF. Cyr61 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis of osteosarcoma by Raf-1/MEK/ERK/Elk-1/TWIST-1 signaling pathway. *Mol Cancer*. 2014; 13:236.
35. Zhu LB, Jiang J, Zhu XP, Wang TF, Chen XY, Luo QF, Shu Y, Liu ZL, Huang SH. Knockdown of Aurora-B inhibits osteosarcoma cell invasion and migration via modulating PI3K/Akt/NF-kappaB signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7:3984–3991.
36. Tsubaki M, Satou T, Itoh T, Imano M, Ogaki M, Yanae M, Nishida S. Reduction of metastasis, cell invasion, and adhesion in mouse osteosarcoma by YM529/ONO-5920-induced blockade of the Ras/MEK/ERK and Ras/PI3K/Akt pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012; 259:402–410.
37. Zhang S, Zhao Y, Wang L. MicroRNA-198 inhibited tumorous behaviors of human osteosarcoma through directly targeting ROCK1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 472:557–565.
38. Cui Z, Zheng X, Kong D. Decreased miR-198 expression and its prognostic significance in human gastric cancer. *World J Surg Oncol*. 2016; 14:33.
39. Wu S, Zhang G, Li P, Chen S, Zhang F, Li J, Jiang C, Chen X, Wang Y, Du Y, Sun Q, Zhao G. miR-198 targets SHMT1 to inhibit cell proliferation and enhance cell apoptosis in lung adenocarcinoma. *Tumour Biol*. 2016; 37:5193–202.
40. Wang M, Wang J, Kong X, Chen H, Wang Y, Qin M, Lin Y, Xu J, Hong J, Chen YX, Zou W, Fang JY. MiR-198 represses tumor growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fucosyl transferase 8. *Sci Rep*. 2014; 4:6145.
41. Zhang C, Yao C, Li H, Wang G, He X. Serum levels of microRNA-133b and microRNA-206 expression predict prognosis in patients with osteosarcoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7:4194–4203.



42. Bao YP, Yi Y, Peng LL, Fang J, Liu KB, Li WZ, Luo HS. Roles of microRNA-206 in osteosarcoma pathogenesis and progression. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14:3751–3755.
43. Rousseau J, Escriou V, Perrot P, Picarda G, Charrier C, Scheman D, Heymann D, Redini F, Trichet V. Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models. *Cancer Gene Ther*. 2010; 17:387–397.
44. Patino-Garcia A, Zalacain M, Folio C, Zanduetta C, Sierrasesumaga L, San Julian M, Toledo G, De Las Rivas J, Lecanda F. Profiling of chemo-naive osteosarcoma and paired-normal cells identifies EBF2 as a mediator of osteoprotegerin inhibition to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:5082–5091.
45. Luo C, Tetteh PW, Merz PR, Dickes E, Abukiwan A, Hotz-Wagenblatt A, Holland-Cunz S, Sinnberg T, Schittek B, Schadendorf D, Diederichs S, Eichmüller SB. miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes. *J Invest Dermatol*. 2013; 133:768–775.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarden, E.M., Burger, E.H., Nijweide, P.J., 1994. Function of osteocytes in bone. *J. Cell. Biochem.* 55, 287–299. <https://doi.org/10.1002/jcb.240550304>
- Abane, R., Mezger, V., 2010. Roles of heat shock factors in gametogenesis and development. *FEBS J.* 277, 4150–4172.
- Abou Neel, E.A., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A.M., Bozec, L., Mudera, V., 2016. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *Int. J. Nanomedicine* 11, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>
- Abrovaya, K., Myers, M.P., Murphy, S.P., Morimoto, R.I., 1992. The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes Dev.* 6, 1153–1164. <https://doi.org/10.1101/gad.6.7.1153>
- Ahmad, G., Agarwal, A., Esteves, S.C., Sharma, R., Almasry, M., Al-Gonaim, A., AlHayaza, G., Singh, N., Kattan, L.A., Sannaa, W.M., Sabanegh, E., 2017. Ascorbic acid reduces redox potential in human spermatozoa subjected to heat-induced oxidative stress. *Andrologia* 49, e12773. <https://doi.org/10.1111/and.12773>
- Ahmad, W., Ijaz, B., Shabbiri, K., Ahmed, F., Rehman, S., 2017. Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer’s disease: mechanisms behind ROS/ RNS generation. *J. Biomed. Sci.* 24. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0379-z>
- Ahn, S.-G., Thiele, D.J., 2003. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.* 17, 516–528. <https://doi.org/10.1101/gad.1044503>
- Akerfelt, M., Morimoto, R.I., Sistonen, L., 2010. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 545–555. <https://doi.org/10.1038/nrm2938>
- Åkerfelt, M., Morimoto, R.I., Sistonen, L., 2010. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 545–555. <https://doi.org/10.1038/nrm2938>
- Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T., Kishimoto, T., 1990. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* 9, 1897–1906.
- Akiyama, T., Dass, C.R., Choong, P.F.M., 2008. Novel therapeutic strategy for osteosarcoma targeting osteoclast differentiation, bone-resorbing activity, and apoptosis pathway. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3461–3469. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0530>
- Alastalo, T.-P., Hellesuo, M., Sandqvist, A., Hietakangas, V., Kallio, M., Sistonen, L., 2003. Formation of nuclear stress granules involves HSF2 and coincides with the nucleolar localization of Hsp70. *J. Cell Sci.* 116, 3557–3570. <https://doi.org/10.1242/jcs.00671>
- Alonso, J., García-Miguel, P., Abelairas, J., Mendiola, M., Pestaña, A., 2001. A microsatellite fluorescent method for linkage analysis in familial retinoblastoma and deletion detection at the RB1 locus in retinoblastoma and osteosarcoma. *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B* 10, 9–14.
- Al-Romaih, K., Somers, G.R., Bayani, J., Hughes, S., Prasad, M., Cutz, J.-C., Xue, H., Zielenska, M., Wang, Y., Squire, J.A., 2007. Modulation by decitabine of gene expression and growth of osteosarcoma U2OS cells in vitro and in xenografts: identification of apoptotic genes as targets for demethylation. *Cancer Cell Int.* 7, 14. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-7-14>
- Alvarez, O., Freeman, A., Bedros, A., Call, S.K., Volsch, J., Kalbermatter, O., Halverson, J., Convy, L., Cook, L., Mick, K., 1995. Randomized double-blind crossover ondansetron-dexamethasone versus ondansetron-placebo study for the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting in pediatric patients with malignancies. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 17, 145–150.
- Amend, S.R., Pienta, K.J., 2015. Ecology meets cancer biology: the cancer swamp promotes the lethal cancer phenotype. *Oncotarget* 6, 9669–9678. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3430>
- Amin, J., Ananthan, J., Voellmy, R., 1988. Key features of heat shock regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3761–3769. <https://doi.org/10.1128/MCB.8.9.3761>
- Ananthan, J., Goldberg, A.L., Voellmy, R., 1986. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232, 522–524. <https://doi.org/10.1126/science.3083508>
- Anckar, J., Sistonen, L., 2011. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 1089–1115. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060809-095203>
- Andersen, T.L., Sondergaard, T.E., Skorzynska, K.E., Dagnaes-Hansen, F., Plesner, T.L., Hauge, E.M., Plesner, T., Delaisse, J.-M., 2009. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am. J. Pathol.* 174, 239–247. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080627>
- Andreassen, A., Oyjord, T., Hovig, E., Holm, R., Flørenes, V.A., Nesland, J.M., Myklebost, O., Høie, J., Bruland, O.S., Børresen, A.L., 1993. p53 abnormalities in different subtypes of human sarcomas. *Cancer Res.* 53, 468–471.
- Anfinsen, K.P., Grotmol, T., Bruland, O.S., Jonasdottir, T.J., 2011. Breed-specific incidence rates of canine primary bone tumors—a population based survey of dogs in Norway. *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Veterinaire* 75, 209–215.
- Anninga, J.K., Gelderblom, H., Fiocco, M., Kroep, J.R., Taminiau, A.H.M., Hogendoorn, P.C.W., Egeler, R.M., 2011. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 47, 2431–2445. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.05.030>
- Aplenc, R., Blaney, S.M., Strauss, L.C., Balis, F.M., Shusterman, S., Ingle, A.M., Agrawal, S., Sun, J., Wright, J.J., Adamson, P.C., 2011. Pediatric Phase I Trial and Pharmacokinetic Study of Dasatinib: A Report From the Children’s Oncology Group Phase I Consortium. *J. Clin. Oncol.* 29, 839. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.7231>
- Arczewska, K.D., Stachurska, A., Wojewódzka, M., Karpińska, K., Kruszewski, M., Nilsen, H., Czarnocka, B., 2018. hMTH1 is required for maintaining migration and invasion potential of human thyroid cancer cells. *DNA Repair* 69, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.07.006>
- Arndt, C.A., Crist, W.M., 1999. Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. *N. Engl. J. Med.* 341, 342–352. <https://doi.org/10.1056/NEJM199907293410507>
- Arshita, N., Lestari, R.V., Hutajulu, S.H., Ghozali, A., Paramita, D.K., 2018. The Tendency of Having MSH2 and MSH6 Microsatellite Instability among Clinicopathological Features in Patients with Colorectal Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 19, 3147–3152. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.11.3147>

- Atkins, C., Liu, Q., Minthorn, E., Zhang, S.-Y., Figueroa, D.J., Moss, K., Stanley, T.B., Sanders, B., Goetz, A., Gaul, N., Choudhry, A.E., Alsaïd, H., Jucker, B.M., Axten, J.M., Kumar, R., 2013. Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res.* 73, 1993–2002. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3109>
- Azimi, I., Petersen, R.M., Thompson, E.W., Roberts-Thomson, S.J., Monteith, G.R., 2017. Hypoxia-induced reactive oxygen species mediate N-cadherin and SERPINE1 expression, EGFR signalling and motility in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Sci. Rep.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15474-7>
- Bacci, G., Longhi, A., Fagioli, F., Briccoli, A., Versari, M., Picci, P., 2005. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities: 27 year experience at Rizzoli Institute, Italy. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 41, 2836–2845. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.08.026>
- Badal, V., Menendez, S., Coomber, D., Lane, D.P., 2008. Regulation of the p14ARF promoter by DNA methylation. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 112–119. <https://doi.org/10.4161/cc.7.1.5137>
- Balamurugan, K., 2016. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 138, 1058–1066. <https://doi.org/10.1002/ijc.29519>
- Barna, J., Csermely, P., Vellai, T., 2018a. Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 2897–2916. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2836-6>
- Barna, J., Csermely, P., Vellai, T., 2018b. Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 2897–2916. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2836-6>
- Barrott, J.J., Haystead, T.A.J., 2013. Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer. *FEBS J.* 280. <https://doi.org/10.1111/febs.12147>
- Barzilai, A., Yamamoto, K.-I., 2004. DNA damage responses to oxidative stress. DNA Repair, BRIDGE OVER BROKEN ENDS - The Cellular Response to DNA Breaks in Health and Disease 3, 1109–1115. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.002>
- Basu, M., Khan, M.W., Chakrabarti, P., Das, C., 2017. Chromatin reader ZMYND8 is a key target of all trans retinoic acid-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* 1860, 450–459. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.02.004>
- Batra, N., Kar, R., Jiang, J.X., 2012. Gap Junctions and Hemichannels in Signal Transmission, Function and Development of Bone. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1909–1918. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2011.09.018>
- Baudino, T.A., McKay, C., Pendeville-Samain, H., Nilsson, J.A., Maclean, K.H., White, E.L., Davis, A.C., Ihle, J.N., Cleveland, J.L., 2002. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev.* 16, 2530–2543. <https://doi.org/10.1101/gad.1024602>
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326–332. <https://doi.org/10.1038/35014014>
- Bettigole, S.E., Glimcher, L.H., 2015. Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 107–138. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112116>
- Bielack, S., Jürgens, H., Jundt, G., Kevric, M., Kühne, T., Reichardt, P., Zoubek, A., Werner, M., Winkelmann, W., Kotz, R., 2009. Osteosarcoma: the COSS experience. *Cancer Treat. Res.* 152, 289–308. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_15)
- Bielack, S.S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., Exner, G.U., Flege, S., Helmke, K., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Werner, M., Winkelmann, W., Zoubek, A., Jürgens, H., Winkler, K., 2002. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 776–790. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.3.776>
- Bielack, S.S., Smeland, S., Whelan, J.S., Marina, N., Jovic, G., Hook, J.M., Krailo, M.D., Gebhardt, M., Pápai, Z., Meyer, J., Nadel, H., Randall, R.L., Deffenbaugh, C., Nagarajan, R., Brennan, B., Letson, G.D., Teot, L.A., Goorin, A., Baumhoer, D., Kager, L., Werner, M., Lau, C.C., Sundby Hall, K., Gelderblom, H., Meyers, P., Gorlick, R., Windhager, R., Helmke, K., Eriksson, M., Hoogerbrugge, P.M., Schomberg, P., Tunn, P.-U., Kühne, T., Jürgens, H., van den Berg, H., Böhlting, T., Picton, S., Renard, M., Reichardt, P., Gerss, J., Butterfass-Bahloul, T., Morris, C., Hogendoorn, P.C.W., Seddon, B., Calaminus, G., Michelagnoli, M., Dhooge, C., Sydes, M.R., Bernstein, M., EURAMOS-1 investigators, 2015. Methotrexate, Doxorubicin, and Cisplatin (MAP) Plus Maintenance Pegylated Interferon Alfa-2b Versus MAP Alone in Patients With Resectable High-Grade Osteosarcoma and Good Histologic Response to Preoperative MAP: First Results of the EURAMOS-1 Good Response Randomized Controlled Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 2279–2287. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.0734>
- Bishop, M.W., Janeway, K.A., Gorlick, R., 2016. Future Directions in the Treatment of Osteosarcoma. *Curr. Opin. Pediatr.* 28, 26–33. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000298>
- Boellmann, F., Guettouche, T., Guo, Y., Fenna, M., Mnayer, L., Voellmy, R., 2004. DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4100–4105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0304768101>
- Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J., Dizdaroglu, M., 1992. Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 31, 106–110.
- Bond, M., Bernstein, M.L., Pappo, A., Schultz, K.R., Krailo, M., Blaney, S.M., Adamson, P.C., 2008. A phase II study of imatinib mesylate in children with refractory or relapsed solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Pediatr. Blood Cancer* 50, 254–258. <https://doi.org/10.1002/pbc.21132>
- Bonewald, L.F., Johnson, M.L., 2008. Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling. *Bone* 42, 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.12.224>
- Bossi, O., Gartsbein, M., Leitges, M., Kuroki, T., Grossman, S., Tennenbaum, T., 2008. UV irradiation increases ROS production via PKC $\delta$  signaling in primary murine fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 105, 194–207. <https://doi.org/10.1002/jcb.21817>
- Bouchama, A., Hammami, M.M., Haq, A., Jackson, J., Al-Sedairy, S., 1996. Evidence for endothelial cell activation/injury in heatstroke. *Crit. Care Med.* 24, 1173–1178.
- Bouchama, A., Knochel, J.P., 2002. Heat Stroke. *N. Engl. J. Med.* 346, 1978–1988. <https://doi.org/10.1056/NEJMra011089>
- Bousquet, M., Noirot, C., Accadbled, F., Sales de Gauzy, J., Castex, M.P., Brousset, P., Gomez-Brouchet, A., 2016. Whole-exome sequencing in osteosarcoma reveals important heterogeneity of genetic alterations. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 27, 738–744. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw009>
- Brandvold, K.R., Morimoto, R.I., 2015. The Chemical Biology of Molecular Chaperones--Implications for Modulation of Proteostasis. *J. Mol. Biol.* 427, 2931–2947. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.05.010>
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J., Krause, K.-H., 2012. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly.* 142, w13659. <https://doi.org/10.4414/smww.2012.13659>

- Britten, C.D., Rowinsky, E.K., Baker, S.D., Weiss, G.R., Smith, L., Stephenson, J., Rothenberg, M., Smetzer, L., Cramer, J., Collins, W., Von Hoff, D.D., Eckhardt, S.G., 2000. A phase I and pharmacokinetic study of the mitochondrial-specific rhodacyanine dye analog MKT 077. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 42–49.
- Bronner, F., 2001. Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *ScientificWorldJournal* 1, 919–925. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.489>
- Brown, A.J.P., Cowen, L.E., Di Pietro, A., Quinn, J., 2017. STRESS ADAPTATION. *Microbiol. Spectr.* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0048-2016>
- Brunet Simioni, M., De Thonel, A., Hammann, A., Joly, A.L., Bossis, G., Fourmaux, E., Bouchot, A., Landry, J., Piechaczyk, M., Garrido, C., 2009. Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene* 28, 3332–3344. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.188>
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., Chen, D.J., 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276, 42462–42467. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100466200>
- Carreras-Sureda, A., Pihán, P., Hetz, C., 2018. Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. *Cell Calcium, The role of Ca<sup>2+</sup> signals in the regulation of cell death & survival processes in health, disease and therapy* 70, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.08.004>
- Castilla, C., Congregado, B., Conde, J.M., Medina, R., Torrubia, F.J., Japón, M.A., Sáez, C., 2010. Immunohistochemical expression of Hsp60 correlates with tumor progression and hormone resistance in prostate cancer. *Urology* 76, 1017.e1–6. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2010.05.045>
- Cavadas, M.A.S., Cheong, A., Taylor, C.T., 2017. The regulation of transcriptional repression in hypoxia. *Exp. Cell Res., Cellular Hypoxia* 356, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.024>
- Ceriello, A., 2008. Possible Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hypertension. *Diabetes Care* 31, S181–S184. <https://doi.org/10.2337/dc08-s245>
- Chai, R.C., Kouspou, M.M., Lang, B.J., Nguyen, C.H., van der Kraan, A.G.J., Vieusseux, J.L., Lim, R.C., Gillespie, M.T., Benjamin, I.J., Quinn, J.M.W., Price, J.T., 2014. Molecular stress-inducing compounds increase osteoclast formation in a heat shock factor 1 protein-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 289, 13602–13614. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530626>
- Chan, S.-W., 2014. Unfolded protein response in hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00233>
- Chanas, S.A., Jiang, Q., McMahon, M., McWalter, G.K., McLellan, L.I., Elcombe, C.R., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Moffat, G.J., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J.D., 2002. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm1*, *Gstm2*, *Gstm3* and *Gstm4* genes in the livers of male and female mice. *Biochem. J.* 365, 405–416. <https://doi.org/10.1042/BJ20020320>
- Chang, Z., Lu, M., Park, S.-M., Park, H.-K., Kang, H.S., Pak, Y., Park, J.-S., 2012. Functional HSF1 requires aromatic-participant interactions in protecting mouse embryonic fibroblasts against apoptosis via G2 cell cycle arrest. *Mol. Cells* 33, 465–470. <https://doi.org/10.1007/s10059-012-2246-9>
- Chao, J., Budd, G.T., Chu, P., Frankel, P., Garcia, D., Junqueira, M., Loera, S., Somlo, G., Sato, J., Chow, W.A., 2010. Phase II clinical trial of imatinib mesylate in therapy of KIT and/or PDGFRalpha-expressing Ewing sarcoma family of tumors and desmoplastic small round cell tumors. *Anticancer Res.* 30, 547–552.
- Chatterjee, S., Burns, T.F., 2017. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18091978>
- Chawla, S.P., Staddon, A.P., Baker, L.H., Schuetz, S.M., Tolcher, A.W., D'Amato, G.Z., Blay, J.-Y., Mita, M.M., Sankhala, K.K., Berk, L., Rivera, V.M., Clackson, T., Loewy, J.W., Haluska, F.G., Demetri, G.D., 2012. Phase II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus in patients with advanced bone and soft tissue sarcomas. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 78–84. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.6329>
- Chen, B.-J., Wu, Y.-L., Tanaka, Y., Zhang, W., 2014. Small molecules targeting c-Myc oncogene: promising anti-cancer therapeutics. *Int. J. Biol. Sci.* 10, 1084–1096. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10190>
- Chen, J., Luo, Y., Hui, H., Cai, T., Huang, H., Yang, F., Feng, J., Zhang, J., Yan, X., 2017. CD146 coordinates brain endothelial cell–pericyte communication for blood–brain barrier development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E7622–E7631. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710848114>
- Chen, J., Yu, Y., Ji, T., Ma, R., Chen, M., Li, G., Li, F., Ding, Q., Kang, Q., Huang, D., Liang, X., Lin, H., Cai, X., 2016. Clinical implication of Keap1 and phosphorylated Nrf2 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Med.* 5, 2678–2687. <https://doi.org/10.1002/cam4.788>
- Chen, P., Luo, X., Nie, P., Wu, B., Xu, W., Shi, X., Chang, H., Li, B., Yu, X., Zou, Z., 2017. CQ synergistically sensitizes human colorectal cancer cells to SN-38/CPT-11 through lysosomal and mitochondrial apoptotic pathway via p53-ROS cross-talk. *Free Radic. Biol. Med.* 104, 280–297. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.033>
- Chen, W., Sun, Z., Wang, X.-J., Jiang, T., Huang, Z., Fang, D., Zhang, D.D., 2009. Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol. Cell* 34, 663–673. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.029>
- Chen, X., Bahrami, A., Pappo, A., Easton, J., Dalton, J., Hedlund, E., Ellison, D., Shurtleff, S., Wu, G., Wei, L., Parker, M., Rusch, M., Nagahawatti, P., Wu, J., Mao, S., Boggs, K., Mulder, H., Yergeau, D., Lu, C., Ding, L., Edmonson, M., Qu, C., Wang, J., Li, Y., Naved, F., Daw, N., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R., Zhang, J., Dyer, M.A., 2014. Recurrent Somatic Structural Variations Contribute to Tumorigenesis in Pediatric Osteosarcoma. *Cell Rep.* 7, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.003>
- Chen, X., Qian, Y., Wu, S., 2015. The Warburg Effect: Evolving Interpretations Of An Established Concept. *Free Radic. Biol. Med.* 0, 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.027>
- Cheung, N.-K.V., Zhang, J., Lu, C., Parker, M., Bahrami, A., Tickoo, S.K., Heguy, A., Pappo, A.S., Federico, S., Dalton, J., Cheung, I.Y., Ding, L., Fulton, B., Wang, J., Chen, X., Becksfort, J., Wu, J., Billups, C.A., Ellison, D., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R., Dyer, M.A., 2012. Association of Age at Diagnosis and Genetic Mutations in Patients with Neuroblastoma. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 307, 1062–1071. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.228>
- Christen, Y., 2000. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 621S–629S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.621s>
- Chu, B., Soncin, F., Price, B.D., Stevenson, M.A., Calderwood, S.K., 1996. Sequential Phosphorylation by Mitogen-activated Protein Kinase and Glycogen Synthase Kinase 3 Represses Transcriptional Activation by Heat Shock Factor-1. *J. Biol. Chem.* 271, 30847–30857. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30847>

- Chu, B., Zhong, R., Soncin, F., Stevenson, M.A., Calderwood, S.K., 1998. Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 degrees C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases Calpha and Czeta. *J. Biol. Chem.* 273, 18640–18646.
- Chugh, R., Wathen, J.K., Maki, R.G., Benjamin, R.S., Patel, S.R., Meyers, P.A., Myers, P.A., Priebe, D.A., Reinke, D.K., Thomas, D.G., Keohan, M.L., Samuels, B.L., Baker, L.H., 2009. Phase II multicenter trial of imatinib in 10 histologic subtypes of sarcoma using a bayesian hierarchical statistical model. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 3148–3153. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.5054>
- Clemons, M., Gelmon, K.A., Pritchard, K.I., Paterson, A.H.G., 2012. Bone-targeted agents and skeletal-related events in breast cancer patients with bone metastases: the state of the art. *Curr. Oncol. Tor. Ont* 19, 259–268. <https://doi.org/10.3747/co.19.1011>
- Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., Colgan, S.P., 2002. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* 62, 3387–3394.
- Corral, L.G., Muller, G.W., Moreira, A.L., Chen, Y., Wu, M., Stirling, D., Kaplan, G., 1996. Selection of Novel Analogs of Thalidomide with Enhanced Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Inhibitory Activity. *Mol. Med.* 2, 506–515. <https://doi.org/10.1007/BF03401909>
- Cortes, E.P., Holland, J.F., Wang, J.J., Sinks, L.F., Blom, J., Senn, H., Bank, A., Glidewell, O., 1974. Amputation and adriamycin in primary osteosarcoma. *N. Engl. J. Med.* 291, 998–1000. <https://doi.org/10.1056/NEJM197411072911903>
- Coskun, E., Jaruga, P., Jemth, A.-S., Loseva, O., Scanlan, L.D., Tona, A., Lowenthal, M.S., Helleday, T., Dizdaroglu, M., 2015. Addiction to MTH1 protein results in intense expression in human breast cancer tissue as measured by liquid chromatography-isotope-dilution tandem mass spectrometry. *DNA Repair* 33, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.05.008>
- Cripe, T.P., 2015. Pediatric Osteosarcoma Clinical Presentation: History, Physical, Causes [WWW Document]. URL <https://emedicine.medscape.com/article/988516-clinical#a0217> (accessed 10.2.19).
- Cui, X., Xie, P.P., Jia, P.P., Lou, Q., Dun, G., Li, S., Liu, G., Zhang, J., Dong, Z., Ma, Y., Hu, Y., 2015. Hsf4 counteracts Hsf1 transcription activities and increases lens epithelial cell survival in vitro. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1853, 746–755. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.004>
- Cullinan, S.B., Diehl, J.A., 2004. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 279, 20108–20117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314219200>
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., Diehl, J.A., 2003. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7198–7209. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.20.7198-7209.2003>
- Dai, C., Sampson, S.B., 2016. HSF1: Guardian of Proteostasis in Cancer. *Trends Cell Biol.* 26, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.011>
- Dai, C., Santagata, S., Tang, Z., Shi, J., Cao, J., Kwon, H., Bronson, R.T., Whitesell, L., Lindquist, S., 2012. Loss of tumor suppressor NF1 activates HSF1 to promote carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* 122, 3742–3754. <https://doi.org/10.1172/JCI62727>
- Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A.B., Lindquist, S., 2007. Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell* 130, 1005–1018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.020>
- Dai, F., Du, P., Chang, Y., Ji, E., Xu, Y., Wei, C., Li, J., 2018. Downregulation of MiR-199b-5p Inducing Differentiation of Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) Toward Cardiomyocyte-Like Cells via HSF1/HSP70 Pathway. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 24, 2700–2710. <https://doi.org/10.12659/MSM.907441>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 329, 23–38. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)
- Dancey, J.E., 2005. Inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Expert Opin. Investig. Drugs* 14, 313–328. <https://doi.org/10.1517/13543784.14.3.313>
- Daneshmand, S., Quek, M.L., Lin, E., Lee, C., Cote, R.J., Hawes, D., Cai, J., Groshen, S., Lieskovsky, G., Skinner, D.G., Lee, A.S., Pinski, J., 2007. Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival. *Hum. Pathol.* 38, 1547–1552. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.03.014>
- Dang, C.V., 2012. MYC on the Path to Cancer. *Cell* 149, 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003>
- Dass, C.R., Choong, P.F.M., 2007. Zoledronic acid inhibits osteosarcoma growth in an orthotopic model. *Mol. Cancer Ther.* 6, 3263–3270. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0546>
- Dawe, J., 2007. Osteosarcoma in a 6-year-old Newfoundland dog: Limb-sparing surgery and cisplatin chemotherapy. *Can. Vet. J.* 48, 1169–1171.
- Day, T.F., Guo, X., Garrett-Beal, L., Yang, Y., 2005. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell* 8, 739–750. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.016>
- Dayalan Naidu, S., Dikovskaya, D., Gaurilcikaite, E., Knatko, E.V., Healy, Z.R., Mohan, H., Koh, G., Laurell, A., Ball, G., Olgagnier, D., de la Vega, L., Ganley, I.G., Talalay, P., Dinkova-Kostova, A.T., 2017. Transcription factors NRF2 and HSF1 have opposing functions in autophagy. *Sci. Rep.* 7, 11023. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11262-5>
- de Groot, A.F., Appelman-Dijkstra, N.M., van der Burg, S.H., Kroep, J.R., 2018. The anti-tumor effect of RANKL inhibition in malignant solid tumors - A systematic review. *Cancer Treat. Rev.* 62, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.10.010>
- de Jager, T.L., Cockrell, A.E., Du Plessis, S.S., 2017. Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. *Adv. Exp. Med. Biol.* 996, 15–23. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_2)
- De Maio, A., Santoro, M.G., Tanguay, R.M., Hightower, L.E., 2012. Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress Chaperones* 17, 139–143. <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0320-z>
- De Thonel, A., Mezger, V., Garrido, C., 2011a. Implication of heat shock factors in tumorigenesis: therapeutical potential. *Cancers* 3, 1158–1181. <https://doi.org/10.3390/cancers3011158>
- De Thonel, A., Mezger, V., Garrido, C., 2011b. Implication of heat shock factors in tumorigenesis: therapeutical potential. *Cancers* 3, 1158–1181. <https://doi.org/10.3390/cancers3011158>
- DeLaney, T.F., Park, L., Goldberg, S.I., Hug, E.B., Liebsch, N.J., Munzenrider, J.E., Suit, H.D., 2005. Radiotherapy for local control of osteosarcoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 61, 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.05.051>
- Demetri, G.D., Chawla, S.P., Ray-Coquard, I., Le Cesne, A., Staddon, A.P., Milhem, M.M., Penel, N., Riedel, R.F., Bui-Nguyen, B., Cranmer, L.D., Reichardt, P., Bompas, E., Alcindor, T., Rushing, D., Song, Y., Lee, R.-M., Ebbinghaus, S., Eid, J.E., Loewy, J.W., Haluska, F.G., Dodion, P.F., Blay, J.-Y., 2013. Results of an international randomized phase III trial of the mammalian target of rapamycin

- inhibitor ridaforolimus versus placebo to control metastatic sarcomas in patients after benefit from prior chemotherapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 2485–2492. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.5766>
- Desai, S., Liu, Z., Yao, J., Patel, N., Chen, J., Wu, Y., Ahn, E.E.-Y., Fodstad, O., Tan, M., 2013. Heat shock factor 1 (HSF1) controls chemoresistance and autophagy through transcriptional regulation of autophagy-related protein 7 (ATG7). *J. Biol. Chem.* 288, 9165–9176. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.422071>
- Dharmaraja, A.T., 2017. Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Therapeutics and Drug Resistance in Cancer and Bacteria. *J. Med. Chem.* 60, 3221–3240. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01243>
- Dhesy-Thind, S., Fletcher, G.G., Blanchette, P.S., Clemons, M.J., Dillmon, M.S., Frank, E.S., Gandhi, S., Gupta, R., Mates, M., Moy, B., Vandenberg, T., Van Poznak, C.H., 2017. Use of Adjuvant Bisphosphonates and Other Bone-Modifying Agents in Breast Cancer: A Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 35, 2062–2081. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.7257>
- Dickinson, B.C., Chang, C.J., 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* 7, 504–511. <https://doi.org/10.1038/nchembio.607>
- Diller, L., Kassel, J., Nelson, C.E., Gryka, M.A., Litwak, G., Gebhardt, M., Bressac, B., Ozturk, M., Baker, S.J., Vogelstein, B., 1990. p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5772–5781.
- Divisato, G., Formicola, D., Esposito, T., Merlotti, D., Pazzaglia, L., Del Fattore, A., Siris, E., Orcel, P., Brown, J.P., Nuti, R., Strazzullo, P., Benassi, M.S., Cancela, M.L., Michou, L., Rendina, D., Gennari, L., Gianfrancesco, F., 2016. ZNF687 Mutations in Severe Paget Disease of Bone Associated with Giant Cell Tumor. *Am. J. Hum. Genet.* 98, 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.12.016>
- Divisato, G., Scotto di Carlo, F., Petrillo, N., Esposito, T., Gianfrancesco, F., 2018. ZNF687 mutations are frequently found in pagetic patients from South Italy: implication in the pathogenesis of Paget's disease of bone. *Clin. Genet.* 93, 1240–1244. <https://doi.org/10.1111/cge.13247>
- Doyle, L.A., 2014. Sarcoma classification: An update based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. *Cancer* 120, 1763–1774. <https://doi.org/10.1002/cncr.28657>
- Doyle, S.M., Genest, O., Wickner, S., 2013. Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 617–629. <https://doi.org/10.1038/nrm3660>
- Droit, A., Gottardo, R., Robertson, G., Li, L., 2019. rGADEM: de novo motif discovery. R package version 2.32.0.
- Dubrez, L., Causse, S., Borges Bonan, N., Dumétier, B., Garrido, C., 2019. Heat-shock proteins: chaperoning DNA repair. *Oncogene.* <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1016-y>
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A., Karsenty, G., 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448–452. <https://doi.org/10.1038/382448a0>
- Eastmond, D.L., Nelson, H.C.M., 2006. Genome-wide Analysis Reveals New Roles for the Activation Domains of the *Saccharomyces cerevisiae* Heat Shock Transcription Factor (Hsf1) during the Transient Heat Shock Response. *J. Biol. Chem.* 281, 32909–32921. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602454200>
- Elsing, A.N., Aspelin, C., Björk, J.K., Bergman, H.A., Himanen, S.V., Kallio, M.J., Roos-Mattjus, P., Sistonen, L., 2014. Expression of HSF2 decreases in mitosis to enable stress-inducible transcription and cell survival. *J. Cell Biol.* 206, 735–749. <https://doi.org/10.1083/jcb.201402002>
- Ennour-Idrissi, K., Maunsell, E., Diorio, C., 2017. Telomere Length and Breast Cancer Prognosis: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* 26, 3–10. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0343>
- Entz-Werle, N., Lavaux, T., Metzger, N., Stoetzel, C., Lasthaus, C., Marec, P., Kalifa, C., Brugieres, L., Pacquement, H., Schmitt, C., Tabone, M.-D., Gentet, J.-C., Lutz, P., Babin, A., Oudet, P., Gaub, M.P., Perrin-Schmitt, F., 2007. Involvement of MET/TWIST/APC combination or the potential role of ossification factors in pediatric high-grade osteosarcoma oncogenesis. *Neoplasia N. Y. N.* 9, 678–688.
- Erdamar, H., Demirci, H., Yaman, H., Erbil, M.K., Yakar, T., Sancak, B., Elbeg, S., Biberoglu, G., Yetkin, I., 2008. The effect of hypothyroidism, hyperthyroidism, and their treatment on parameters of oxidative stress and antioxidant status. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46, 1004–1010. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.183>
- Fang, F., Chang, R., Yang, L., 2012. Heat shock factor 1 promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer* 118, 1782–1794. <https://doi.org/10.1002/cncr.26482>
- Faulkner, B., Astleford, K., Mansky, K.C., 2019. Regulation of Osteoclast Differentiation and Skeletal Maintenance by Histone Deacetylases. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24071355>
- Fernandez, P.M., Tabbara, S.O., Jacobs, L.K., Manning, F.C., Tsangaris, T.N., Schwartz, A.M., Kennedy, K.A., Patierno, S.R., 2000. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res. Treat.* 59, 15–26.
- Fernández-Medarde, A., Santos, E., 2011. Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes Cancer* 2, 344–358. <https://doi.org/10.1177/1947601911411084>
- Fisher, L.W., Termine, J.D., DeJter, S.W., Whitson, S.W., Yanagishita, M., Kimura, J.H., Hascall, V.C., Kleinman, H.K., Hassell, J.R., Nilsson, B., 1983. Proteoglycans of developing bone. *J. Biol. Chem.* 258, 6588–6594.
- Fleisch, H., 2002. The role of bisphosphonates in breast cancer: Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res.* 4, 30–34. <https://doi.org/10.1186/bcr414>
- Fleming, A.M., Burrows, C.J., 2017. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine, friend and foe: Epigenetic-like regulator versus initiator of mutagenesis. *DNA Repair* 56, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.009>
- Fleuren, E.D.G., Versleijen-Jonkers, Y.M.H., Boerman, O.C., van der Graaf, W.T.A., 2014. Targeting receptor tyrosine kinases in osteosarcoma and Ewing sarcoma: Current hurdles and future perspectives. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1845, 266–276. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.02.005>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, P.S., 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res. Int.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Fok, J.H.L., Hedayat, S., Zhang, L., Aronson, L.I., Mirabella, F., Pawlyn, C., Bright, M.D., Wardell, C.P., Keats, J.J., De Billy, E., Rye, C.S., Chessum, N.E.A., Jones, K., Morgan, G.J., Eccles, S.A., Workman, P., Davies, F.E., 2018. HSF1 Is Essential for Myeloma Cell Survival and A Promising Therapeutic Target. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 24, 2395–2407. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1594>
- Fong, G.-H., Takeda, K., 2008. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ.* 15, 635–641. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.10>

- Franceschini, N., Cleton-Jansen, A.-M., VMG Bovée, J., 2018. Bone: Conventional Osteosarcoma [WWW Document]. URL <http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/ConvOsteoID5344.html> (accessed 9.28.19).
- Fujimoto, A., Furuta, M., Totoki, Y., Tsunoda, T., Kato, M., Shiraishi, Y., Tanaka, H., Taniguchi, H., Kawakami, Y., Ueno, M., Gotoh, K., Ariizumi, S.-I., Wardell, C.P., Hayami, S., Nakamura, T., Aikata, H., Arihiro, K., Boroevich, K.A., Abe, T., Nakano, K., Maejima, K., Sasaki-Oku, A., Ohsawa, A., Shibuya, T., Nakamura, H., Hama, N., Hosoda, F., Arai, Y., Ohashi, S., Urushidate, T., Nagae, G., Yamamoto, S., Ueda, H., Tatsuno, K., Ojima, H., Hiraoka, N., Okusaka, T., Kubo, M., Marubashi, S., Yamada, T., Hirano, S., Yamamoto, M., Ohdan, H., Shimada, K., Ishikawa, O., Yamaue, H., Chayama, K., Miyano, S., Aburatani, H., Shibata, T., Nakagawa, H., 2016. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. *Nat. Genet.* 48, 500–509. <https://doi.org/10.1038/ng.3547>
- Fujimoto, M., Hayashida, N., Katoh, T., Oshima, K., Shinkawa, T., Prakasam, R., Tan, K., Inouye, S., Takii, R., Nakai, A., 2010. A Novel Mouse HSF3 Has the Potential to Activate Nonclassical Heat-Shock Genes during Heat Shock. *Mol. Biol. Cell* 21, 106–116. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-07-0639>
- Fujimoto, M., Izu, H., Seki, K., Fukuda, K., Nishida, T., Yamada, S., Kato, K., Yonemura, S., Inouye, S., Nakai, A., 2004. HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. *EMBO J.* 23, 4297–4306. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600435>
- Fujimoto, M., Nakai, A., 2010. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS J.* 277, 4112–4125.
- Fujimoto, M., Oshima, K., Shinkawa, T., Wang, B.B., Inouye, S., Hayashida, N., Takii, R., Nakai, A., 2008. Analysis of HSF4 binding regions reveals its necessity for gene regulation during development and heat shock response in mouse lenses. *J. Biol. Chem.* 283, 29961–29970. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804629200>
- Fujimoto, M., Takii, R., Takaki, E., Katiyar, A., Nakato, R., Shirahige, K., Nakai, A., 2017. The HSF1-PARP13-PARP1 complex facilitates DNA repair and promotes mammary tumorigenesis. *Nat. Commun.* 8, 1638. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01807-7>
- Fujiwara, T., Uotani, K., Yoshida, Aki, Morita, T., Nezu, Y., Kobayashi, E., Yoshida, Akihiko, Uehara, T., Omori, T., Sugiu, K., Komatsubara, T., Takeda, K., Kunitada, T., Kawamura, M., Kawai, A., Ochiya, T., Ozaki, T., 2017. Clinical significance of circulating miR-25-3p as a novel diagnostic and prognostic biomarker in osteosarcoma. *Oncotarget* 8, 33375–33392. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16498>
- Fuse, Y., Kobayashi, M., 2017. Conservation of the Keap1-Nrf2 System: An Evolutionary Journey through Stressful Space and Time. *Mol. Basel Switz.* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22030436>
- Gad, H., Koolmeister, T., Jemth, A.-S., Eshtad, S., Jacques, S.A., Ström, C.E., Svensson, L.M., Schultz, N., Lundbäck, T., Einarsdottir, B.O., Saleh, A., Göktürk, C., Baranczewski, P., Svensson, R., Berntsson, R.P.-A., Gustafsson, R., Strömberg, K., Sanjiv, K., Jacques-Cordonnier, M.-C., Desroses, M., Gustavsson, A.-L., Olofsson, R., Johansson, F., Homan, E.J., Loseva, O., Bräutigam, L., Johansson, L., Höglund, A., Hagenkört, A., Pham, T., Altun, M., Gaugaz, F.Z., Vikingsson, S., Evers, B., Henriksson, M., Vallin, K.S.A., Wallner, O.A., Hammarström, L.G.J., Wiita, E., Almlöf, I., Kalderén, C., Axelsson, H., Djureinovic, T., Puigvert, J.C., Häggblad, M., Jeppsson, F., Martens, U., Lundin, C., Lundgren, B., Granelli, I., Jensen, A.J., Artursson, P., Nilsson, J.A., Stenmark, P., Scobie, M., Berglund, U.W., Helleday, T., 2014. MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature* 508, 215–221. <https://doi.org/10.1038/nature13181>
- Gad, H., Mortusewicz, O., Rudd, S.G., Stolz, A., Amaral, N., Brautigham, L., Pudielko, L., Sanjiv, K., Kaldéren, C., Jemth, A.-S., Almlöf, I., Visnes, T., Schultz, N., Boström, J., Montano, J.M.C., Hagenkört, A., Groth, P., Loseva, O., Gokturk, C., Koolmeister, T., Wakchaure, P., Homan, E., Ström, C.E., Scobie, M., Bastians, H., Berglund, U.W., Helleday, T., 2019. MTH1 promotes mitotic progression to avoid oxidative DNA damage in cancer cells. *bioRxiv* 575290. <https://doi.org/10.1101/575290>
- Gamberi, G., Benassi, M.S., Bohling, T., Ragazzini, P., Molendini, L., Sollazzo, M.R., Pompetti, F., Merli, M., Magagnoli, G., Balladelli, A., Picci, P., 1998. C-myc and c-fos in human osteosarcoma: prognostic value of mRNA and protein expression. *Oncology* 55, 556–563. <https://doi.org/10.1159/000011912>
- Gaschler, M.M., Stockwell, B.R., 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482, 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Georgoulis, A., Vorgias, C.E., Chrousos, G.P., Rogakou, E.P., 2017. Genome Instability and γH2AX. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18091979>
- Gerber, P.A., Rutter, G.A., 2017. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxid. Redox Signal.* 26, 501–518. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6755>
- Ghosh, R., Likun, W., Wang, E.S., Perera, B.G.K., Igbaria, A., Morita, S., Prado, K., Thamsen, M., Caswell, D., Macias, H., Weiberth, K.F., Gliedt, M.J., Alavi, M.V., Hari, S.B., Mitra, A.K., Bhatarai, B., Schürer, S.C., Snapp, E.L., Gould, D.B., German, M.S., Backes, B.J., Maly, D.J., Oakes, S.A., Papa, F.R., 2014. Allosteric inhibition of the IRE1α RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell* 158, 534–548. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.002>
- Giribaldi, M.G., Monzo, A., Halvorsen, K., Patel, A., Rai, P., 2015. MTH1 expression is required for effective transformation by oncogenic HRAS. *Oncotarget* 6, 11519–11529. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3447>
- Gobin, B., Moriceau, G., Ory, B., Charrier, C., Brion, R., Blanchard, F., Redini, F., Heymann, D., 2014. Imatinib Mesylate Exerts Anti-Proliferative Effects on Osteosarcoma Cells and Inhibits the Tumour Growth in Immunocompetent Murine Models. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090795>
- Gomez-Pastor, R., Burchfiel, E.T., Thiele, D.J., 2018. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 4–19. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.73>
- Gong, J., Weng, D., Eguchi, T., Murshid, A., Sherman, M.Y., Song, B., Calderwood, S.K., 2015. Targeting the hsp70 gene delays mammary tumor initiation and inhibits tumor cell metastasis. *Oncogene* 34, 5460–5471. <https://doi.org/10.1038/nc.2015.1>
- Gonsalves, S.E., Moses, A.M., Razak, Z., Robert, F., Westwood, J.T., 2011. Whole-genome analysis reveals that active heat shock factor binding sites are mostly associated with non-heat shock genes in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 6, e15934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015934>
- Goodson, M.L., Park-Sarge, O.K., Sarge, K.D., 1995. Tissue-dependent expression of heat shock factor 2 isoforms with distinct transcriptional activities. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5288–5293.
- Gosheger, G., Gebert, C., Ahrens, H., Streitbueger, A., Winkelmann, W., Harges, J., 2006. Endoprosthetic reconstruction in 250 patients with sarcoma. *Clin. Orthop.* 450, 164–171. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000223978.36831.39>
- Griffiths, H.J., 1994. Radiologic Atlas of Bone Tumors. *Radiology.* <https://doi.org/10.1148/radiology.192.2.492>
- Grignani, G., Palmerini, E., Ferraresi, V., D'Ambrosio, L., Bertulli, R., Asaftei, S.D., Tamburini, A., Pignochino, Y., Sangiolo, D., Marchesi, E., Capozzi, F., Biagini, R., Gambarotti, M., Fagioli, F., Casali, P.G., Picci, P., Ferrari, S., Aglietta, M., Italian Sarcoma Group, 2015.

- Sorafenib and everolimus for patients with unresectable high-grade osteosarcoma progressing after standard treatment: a non-randomised phase 2 clinical trial. *Lancet Oncol.* 16, 98–107. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71136-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71136-2)
- Grimer, R.J., 2005. Surgical options for children with osteosarcoma. *Lancet Oncol.* 6, 85–92. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)01734-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)01734-1)
- Guedes, L.B., Antonarakis, E.S., Schweizer, M.T., Mirkheshti, N., Almutairi, F., Park, J.C., Glavaris, S., Hicks, J., Eisenberger, M.A., De Marzo, A.M., Epstein, J.I., Isaacs, W.B., Eshleman, J.R., Pritchard, C.C., Lotan, T.L., 2017. MSH2 Loss in Primary Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 6863–6874. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0955>
- Guettouche, T., Boellmann, F., Lane, W.S., Voellmy, R., 2005. Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.* 6, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-6-4>
- Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I.B., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Letexier, M., Degos, F., Clément, B., Balabaud, C., Chevet, E., Laurent, A., Couchy, G., Letouzé, E., Calvo, F., Zucman-Rossi, J., 2012. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* 44, 694–698. <https://doi.org/10.1038/ng.2256>
- Guise, T.A., Mohammad, K.S., Clines, G., Stebbins, E.G., Wong, D.H., Higgins, L.S., Vessella, R., Corey, E., Padalecki, S., Suva, L., Chirgwin, J.M., 2006. Basic Mechanisms Responsible for Osteolytic and Osteoblastic Bone Metastases. *Clin. Cancer Res.* 12, 6213s–6216s. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1007>
- Guo, J., Qin, W., Xing, Q., Gao, M., Wei, F., Song, Z., Chen, L., Lin, Y., Gao, X., Lin, Z., 2017. TRIM33 is essential for osteoblast proliferation and differentiation via BMP pathway. *J. Cell. Physiol.* 232, 3158–3169. <https://doi.org/10.1002/jcp.25769>
- Guo, Y., Guettouche, T., Fenna, M., Boellmann, F., Pratt, W.B., Toft, D.O., Smith, D.F., Voellmy, R., 2001. Evidence for a Mechanism of Repression of Heat Shock Factor 1 Transcriptional Activity by a Multichaperone Complex. *J. Biol. Chem.* 276, 45791–45799. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105931200>
- Hahn, J.-S., Hu, Z., Thiele, D.J., Iyer, V.R., 2004. Genome-Wide Analysis of the Biology of Stress Responses through Heat Shock Transcription Factor. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5249–5256. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5249-5256.2004>
- Hall, I.H., Liou, Y.F., Okano, M., Lee, K.H., 1982. Antitumor agents XLVI: In vitro effects of esters of brusatol, bisbrusatol, and related compounds on nucleic acid and protein synthesis of P-388 lymphocytic leukemia cells. *J. Pharm. Sci.* 71, 345–348. <https://doi.org/10.1002/jps.2600710321>
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147–1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>
- Han, J., Tian, R., Yong, B., Luo, C., Tan, P., Shen, J., Peng, T., 2013. Gas6/Axl mediates tumor cell apoptosis, migration and invasion and predicts the clinical outcome of osteosarcoma patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435, 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.019>
- Harada, K., Toyooka, S., Maitra, A., Maruyama, R., Toyooka, K.O., Timmons, C.F., Tomlinson, G.E., Mastrangelo, D., Hay, R.J., Minna, J.D., Gazdar, A.F., 2002. Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. *Oncogene* 21, 4345–4349. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205446>
- Harris, M.B., Cantor, A.B., Goorin, A.M., Shochat, S.J., Ayala, A.G., Ferguson, W.S., Holbrook, T., Link, M.P., 1995. Treatment of osteosarcoma with ifosfamide: comparison of response in pediatric patients with recurrent disease versus patients previously untreated: a Pediatric Oncology Group study. *Med. Pediatr. Oncol.* 24, 87–92.
- Hart, J., 2019. Bone Osteosarcoma General [WWW Document]. URL <http://www.pathologyoutlines.com/topic/boneosteosarcomageneral.html> (accessed 9.28.19).
- Harvey, C.J., Thimmulappa, R.K., Singh, A., Blake, D.J., Ling, G., Wakabayashi, N., Fujii, J., Myers, A., Biswal, S., 2009. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040>
- Hawkes, H.-J.K., Karlenius, T.C., Tonissen, K.F., 2014. Regulation of the human thioredoxin gene promoter and its key substrates: a study of functional and putative regulatory elements. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.013>
- He, H., Soncin, F., Grammatikakis, N., Li, Y., Sigano, A., Gong, J., Brown, S.A., Kingston, R.E., Calderwood, S.K., 2003. Elevated expression of heat shock factor (HSF) 2A stimulates HSF1-induced transcription during stress. *J. Biol. Chem.* 278, 35465–35475. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304663200>
- Heaphy, C.M., de Wilde, R.F., Jiao, Y., Klein, A.P., Edil, B.H., Shi, C., Bettegowda, C., Rodriguez, F.J., Eberhart, C.G., Hebbar, S., Offerhaus, G.J., McLendon, R., Rasheed, B.A., He, Y., Yan, H., Bigner, D.D., Oba-Shinjo, S.M., Marie, S.K.N., Riggins, G.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Hruban, R.H., Maitra, A., Papadopoulos, N., Meeker, A.K., 2011. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* 333, 425. <https://doi.org/10.1126/science.1207313>
- Heck, D.E., Vetrano, A.M., Mariano, T.M., Laskin, J.D., 2003. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase. *J. Biol. Chem.* 278, 22432–22436. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300048200>
- Helleday, T., 2014. Cancer phenotypic lethality, exemplified by the non-essential MTH1 enzyme being required for cancer survival. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 25, 1253–1255. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu158>
- Hemmatian, H., Bakker, A.D., Klein-Nulend, J., van Lenthe, G.H., 2017. Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction. *Curr. Osteoporos. Rep.* 15, 401–411. <https://doi.org/10.1007/s11914-017-0402-z>
- Heymann, D., 2012. Anti-RANKL therapy for bone tumours: Basic, pre-clinical and clinical evidences. *J. Bone Oncol.* 1, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2012.03.001>
- Heymann, D., Ory, B., Blanchard, F., Heymann, M.-F., Coipeau, P., Charrier, C., Couillaud, S., Thiery, J.P., Gouin, F., Redini, F., 2005. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 37, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.02.020>
- Heymann, M.-F., Brown, H., Heymann, D., 2017. Drugs in early clinical development for the treatment of osteosarcoma.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H.A., Fujimoto, M., Palvimo, J.J., Nakai, A., Sistonen, L., 2006. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 45–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503698102>
- Hingorani, P., Zhang, W., Gorlick, R., Kolb, E.A., 2009. Inhibition of Src phosphorylation alters metastatic potential of osteosarcoma in vitro but not in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 3416–3422. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1657>
- Ho, X.D., Phung, P., Q Le, V., H Nguyen, V., Reimann, E., Prans, E., Köks, G., Maasalu, K., Le, N.T., H Trinh, L., G Nguyen, H., Mårtson, A., Köks, S., 2017. Whole transcriptome analysis identifies differentially regulated networks between osteosarcoma and normal bone samples. *Exp. Biol. Med.* 242, 1802–1811. <https://doi.org/10.1177/1535370217736512>



- Holmberg, C.I., Hietakangas, V., Mikhailov, A., Rantanen, J.O., Kallio, M., Meinander, A., Hellman, J., Morrice, N., MacKintosh, C., Morimoto, R.I., Eriksson, J.E., Sistonen, L., 2001a. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J.* 20, 3800–3810. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3800>
- Holmberg, C.I., Hietakangas, V., Mikhailov, A., Rantanen, J.O., Kallio, M., Meinander, A., Hellman, J., Morrice, N., MacKintosh, C., Morimoto, R.I., Eriksson, J.E., Sistonen, L., 2001b. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J.* 20, 3800–3810. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3800>
- Hortobagyi, G.N., Van Poznak, C., Harker, W.G., Gradishar, W.J., Chew, H., Dakhil, S.R., Haley, B.B., Sauter, N., Mohanlal, R., Zheng, M., Lipton, A., 2017. Continued Treatment Effect of Zoledronic Acid Dosing Every 12 vs 4 Weeks in Women With Breast Cancer Metastatic to Bone: The OPTIMIZE-2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 3, 906–912. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.6316>
- Hosokawa, N., Hirayoshi, K., Nakai, A., Hosokawa, Y., Marui, N., Yoshida, M., Sakai, T., Nishino, H., Aoike, A., Kawai, K., 1990. Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct. Funct.* 15, 393–401.
- Hou, P., Ji, M., Yang, B., Chen, Z., Qiu, J., Shi, X., Lu, Z., 2006. Quantitative analysis of promoter hypermethylation in multiple genes in osteosarcoma. *Cancer* 106, 1602–1609. <https://doi.org/10.1002/cncr.21762>
- Hu, C., Deng, Z., Zhang, Y., Yan, L., Cai, L., Lei, J., Xie, Y., 2015. The prognostic significance of Src and p-Src expression in patients with osteosarcoma. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 21, 638–645. <https://doi.org/10.12659/MSM.892803>
- Huber, K.V.M., Salah, E., Radic, B., Gridling, M., Elkins, J.M., Stukalov, A., Jemth, A.-S., Göktürk, C., Sanjiv, K., Strömberg, K., Pham, T., Berglund, U.W., Colinge, J., Bennett, K.L., Loizou, J.I., Helleday, T., Knapp, S., Superti-Furga, G., 2014. Stereospecific targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as an anticancer strategy. *Nature* 508, 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature13194>
- Humbert, O., Achour, I., Lautier, D., Laurent, G., Salles, B., 2003. hMSH2 expression is driven by AP1-dependent regulation through phorbol-ester exposure. *Nucleic Acids Res.* 31, 5627–5634.
- Humphrey, E.L., Morris, G.E., Fuller, H.R., 2013. Valproate reduces collagen and osteonectin in cultured bone cells. *Epilepsy Res.* 106, 446–450. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2013.06.011>
- Hybertson, B.M., Gao, B., Bose, S.K., McCord, J.M., 2011. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol. Aspects Med., Oxidative Damage and Disease* 32, 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.006>
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., Horikawa, T., 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology, Environmental and Nutritional Interactions Antioxidant Nutrients and Environmental Health, Part C* 189, 21–39. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00150-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00150-1)
- Iida, T., Furuta, A., Kawashima, M., Nishida, J., Nakabeppu, Y., Iwaki, T., 2001. Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and increased expression of hMTH1 protein in brain tumors. *Neuro-Oncol.* 3, 73–81. <https://doi.org/10.1093/neuonc/3.2.73>
- Imran, H., Enders, F., Krailo, M., Sim, F., Okuno, S., Hawkins, D., Neglia, J., Randall, R.L., Womer, R., Mascarenhas, L., Arndt, C.A.S., 2009. Effect of time to resumption of chemotherapy after definitive surgery on prognosis for non-metastatic osteosarcoma. *J. Bone Joint Surg. Am.* 91, 604–612. <https://doi.org/10.2106/JBJS.H.00449>
- Inouye, S., Hatori, Y., Kubo, T., Saito, S., Kitamura, H., Akagi, R., 2018. NRF2 and HSF1 coordinately regulate heme oxygenase-1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 506, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.030>
- Isomoto, H., Oka, M., Yano, Y., Kanazawa, Y., Soda, H., Terada, R., Yasutake, T., Nakayama, T., Shikuwa, S., Takeshima, F., Udono, H., Murata, I., Ohtsuka, K., Kohno, S., 2003. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in gastric cancer. *Cancer Lett.* 198, 219–228. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(03\)00305-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(03)00305-7)
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y., 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313–322. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943>
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T., Yamamoto, M., 2003. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 8, 379–391.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.-M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A. von, Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, ‡ Christopher W., Ratcliffe, ‡ Peter J., 2001. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O<sub>2</sub>-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science* 292, 468–472. <https://doi.org/10.1126/science.1059796>
- Jacob, P., Hirt, H., Bendahmane, A., 2017. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnol. J.* 15, 405–414. <https://doi.org/10.1111/pbi.12659>
- Jaeschke, H., Ramachandran, A., 2018. Oxidant Stress and Lipid Peroxidation in Acetaminophen Hepatotoxicity. *React. Oxyg. Species Apex NC* 5, 145–158.
- Jafari, R., Almqvist, H., Axelsson, H., Ignatushchenko, M., Lundbäck, T., Nordlund, P., Molina, D.M., 2014. The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells. *Nat. Protoc.* 9, 2100–2122. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.138>
- Jaffe, N., Paed, D., Farber, S., Traggis, D., Geiser, C., Kim, B.S., Das, L., Frauenberger, G., Djerassi, I., Cassady, J.R., 1973. Favorable response of metastatic osteogenic sarcoma to pulse high-dose methotrexate with citrovorum rescue and radiation therapy. *Cancer* 31, 1367–1373.
- Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K.B., Awuh, J.A., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D., Johansen, T., 2010. p62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NRF2 and Creates a Positive Feedback Loop by Inducing Antioxidant Response Element-driven Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* 285, 22576–22591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118976>
- Jawad, M.U., Scully, S.P., 2010. In Brief: Classifications in Brief: Enneking Classification: Benign and Malignant Tumors of the Musculoskeletal System. *Clin. Orthop.* 468, 2000–2002. <https://doi.org/10.1007/s11999-010-1315-7>
- Jego, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R., Garrido, C., 2013. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* 332, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.10.014>
- Jego, G., Lanneau, D., De Thonel, A., Berthenet, K., Hazoumé, A., Droin, N., Hamman, A., Girodon, F., Bellaye, P.-S., Wettstein, G., Jacquelin, A., Duplomb, L., Le Mouél, A., Papanayotou, C., Christians, E., Bonniaud, P., Lallemand-Mezger, V., Solary, E., Garrido, C., 2014. Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes. *Leukemia* 28, 1676–1686. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.63>
- Jentsch, T., Robl, B., Husmann, M., Bode-Lesniewska, B., Fuchs, B., 2014. Worse prognosis of osteosarcoma patients expressing IGF-1 on a tissue microarray. *Anticancer Res.* 34, 3881–3889.
- Ji, X., Wang, H., Zhu, J., Zhu, L., Pan, H., Li, W., Zhou, Y., Cong, Z., Yan, F., Chen, S., 2014. Knockdown of Nrf2 suppresses glioblastoma angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 $\alpha$ . *Int. J. Cancer* 135, 574–584. <https://doi.org/10.1002/ijc.28699>

- Ji, X.-J., Chen, S.-H., Zhu, L., Pan, H., Zhou, Y., Li, W., You, W.-C., Gao, C.-C., Zhu, J.-H., Jiang, K., Wang, H.-D., 2013. Knockdown of NF-E2-related factor 2 inhibits the proliferation and growth of U251MG human glioma cells in a mouse xenograft model. *Oncol. Rep.* 30, 157–164. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2476>
- Jiang, N., Chen, M., Yang, G., Xiang, L., He, L., Hei, T.K., Chotkowski, G., Tarnow, D.P., Finkel, M., Ding, L., Zhou, Y., Mao, J.J., 2016. Hematopoietic Stem Cells in Neural-crest Derived Bone Marrow. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep36411>
- Jiang, S., Tu, K., Fu, Q., Schmitt, D.C., Zhou, L., Lu, N., Zhao, Y., 2015. Multifaceted roles of HSF1 in cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 36, 4923–4931. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3674-x>
- Jingushi, K., Ueda, Y., Kitae, K., Hase, H., Egawa, H., Ohshio, I., Kawakami, R., Kashiwagi, Y., Tsukada, Y., Kobayashi, T., Nakata, W., Fujita, K., Uemura, M., Nonomura, N., Tsujikawa, K., 2015. miR-629 Targets TRIM33 to Promote TGF $\beta$ /Smad Signaling and Metastatic Phenotypes in ccRCC. *Mol. Cancer Res. MCR* 13, 565–574. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0300>
- Jo, V.Y., Fletcher, C.D.M., 2014. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology (Phila.)* 46, 95–104. <https://doi.org/10.1097/PAT.000000000000050>
- Joost, P., Therkildsen, C., Dominguez-Valentin, M., Jönsson, M., Nilbert, M., 2015. Urinary Tract Cancer in Lynch Syndrome; Increased Risk in Carriers of MSH2 Mutations. *Urology* 86, 1212–1217. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2015.08.018>
- Jung, T., Höhn, A., Grune, T., 2014. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II - protein oxidation and proteasomal degradation. *Redox Biol.* 2, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.008>
- Jüppner, H., Abou-Samra, A.B., Freeman, M., Kong, X.F., Schipani, E., Richards, J., Kolakowski, L.F., Hock, J., Potts, J.T., Kronenberg, H.M., 1991. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 254, 1024–1026.
- Kamiya, H., Kasai, H., 1995. Formation of 2-Hydroxydeoxyadenosine Triphosphate, an Oxidatively Damaged Nucleotide, and Its Incorporation by DNA Polymerases STEADY-STATE KINETICS OF THE INCORPORATION. *J. Biol. Chem.* 270, 19446–19450. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.33.19446>
- Kanazawa, Y., Isomoto, H., Oka, M., Yano, Y., Soda, H., Shikuwa, S., Takeshima, F., Omagari, K., Mizuta, Y., Murase, K., Nakagoe, T., Ohtsuka, K., Kohno, S., 2003. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in colorectal cancer. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 20, 157–164. <https://doi.org/10.1385/MO:20:2:157>
- Kansara, M., Thomas, D.M., 2007. Molecular pathogenesis of osteosarcoma. *DNA Cell Biol.* 26, 1–18. <https://doi.org/10.1089/dna.2006.0505>
- Kansara, M., Tsang, M., Kodjabachian, L., Sims, N.A., Trivett, M.K., Ehrich, M., Dobrovic, A., Slavin, J., Choong, P.F.M., Simmons, P.J., Dawid, I.B., Thomas, D.M., 2009. Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 837–851. <https://doi.org/10.1172/JCI37175>
- Kantidze, O.L., Velichko, A.K., Razin, S.V., 2015. Heat stress-induced transcriptional repression. *Biochem. Mosc.* 80, 990–993. <https://doi.org/10.1134/S0006297915080039>
- Karsten, U., Goletz, S., 2013. What makes cancer stem cell markers different? *SpringerPlus* 2. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-301>
- Kasai, H., Crain, P.F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A., Tanooka, H., 1986. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 7, 1849–1851. <https://doi.org/10.1093/carcin/7.11.1849>
- Kasai, H., Nishimura, S., 1984. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* 12, 2137–2145. <https://doi.org/10.1093/nar/12.4.2137>
- Katafuchi, A., Nohmi, T., 2010. DNA polymerases involved in the incorporation of oxidized nucleotides into DNA: Their efficiency and template base preference. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen., Nucleotide Pool Damage and Its Biological Consequences* 703, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.06.004>
- Katsimbri, P., 2017. The biology of normal bone remodelling. *Eur. J. Cancer Care (Engl.)* 26. <https://doi.org/10.1111/ecc.12740>
- Kaufman, R.J., 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 1389–1398. <https://doi.org/10.1172/JCI16886>
- Kawamura, T., Kawatani, M., Muroi, M., Kondoh, Y., Futamura, Y., Aono, H., Tanaka, M., Honda, K., Osada, H., 2016. Proteomic profiling of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival. *Sci. Rep.* 6, 26521. <https://doi.org/10.1038/srep26521>
- Kennedy, C.H., Cueto, R., Belinsky, S.A., Lechner, J.F., Pryor, W.A., 1998. Overexpression of hMTH1 mRNA: a molecular marker of oxidative stress in lung cancer cells. *FEBS Lett.* 429, 17–20. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00505-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00505-5)
- Kennedy, D.D., Santella, R.M., Wang, Q., Ladas, E.J., Kelly, K.M., 2004. 8-oxo-dG elevated in children during leukemia treatment. *Integr. Cancer Ther.* 3, 301–309. <https://doi.org/10.1177/1534735404270285>
- Kersch-Schindl, K., 2016. Prevention and rehabilitation of osteoporosis. *Wien. Med. Wochenschr.* 166, 22–27. <https://doi.org/10.1007/s10354-015-0417-y>
- Kettle, J.G., Alwan, H., Bista, M., Breed, J., Davies, N.L., Eckersley, K., Fillery, S., Foote, K.M., Goodwin, L., Jones, D.R., Käck, H., Lau, A., Nissink, J.W.M., Read, J., Scott, J.S., Taylor, B., Walker, G., Wissler, L., Wylot, M., 2016. Potent and Selective Inhibitors of MTH1 Probe Its Role in Cancer Cell Survival. *J. Med. Chem.* 59, 2346–2361. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01760>
- Khanna, C., Khan, J., Nguyen, P., Prehn, J., Caylor, J., Yeung, C., Trepel, J., Meltzer, P., Helman, L., 2001. Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Res.* 61, 3750–3759.
- Khurana, N., Bhattacharyya, S., 2015. Hsp90, the Concertmaster: Tuning Transcription. *Front. Oncol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00100>
- Kiers, H.D., Scheffer, G.-J., van der Hoeven, J.G., Eltzschig, H.K., Pickkers, P., Kox, M., 2016. Immunologic Consequences of Hypoxia during Critical Illness. *Anesthesiology* 125, 237–249. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001163>
- Kijima, T., Prince, T., Neckers, L., Koga, F., Fujii, Y., 2019. Heat shock factor 1 (HSF1)-targeted anticancer therapeutics: overview of current preclinical progress. *Expert Opin. Ther. Targets* 23, 369–377. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1602119>
- Kijima, T., Prince, T.L., Tigue, M.L., Yim, K.H., Schwartz, H., Beebe, K., Lee, S., Budzynski, M.A., Williams, H., Trepel, J.B., Sistonen, L., Calderwood, S., Neckers, L., 2018. HSP90 inhibitors disrupt a transient HSP90-HSF1 interaction and identify a noncanonical model of HSP90-mediated HSF1 regulation. *Sci. Rep.* 8, 6976. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25404-w>
- Kim, E.H., Kim, M.-S., Lee, K.-H., Koh, J.-S., Jung, W.-G., Kong, C.-B., 2016. Zoledronic acid is an effective radiosensitizer in the treatment of osteosarcoma. *Oncotarget* 7, 70869–70880. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12281>
- Kim, S.-J., Lee, S.-C., Kang, H.-G., Gim, J., Lee, K.-H., Lee, S.-H., Chun, K.-H., 2018. Heat Shock Factor 1 Predicts Poor Prognosis of Gastric Cancer. *Yonsei Med. J.* 59, 1041–1048. <https://doi.org/10.3349/ymj.2018.59.9.1041>

- Kim, T.-H., Hur, E., Kang, S.-J., Kim, J.-A., Thapa, D., Lee, Y.M., Ku, S.K., Jung, Y., Kwak, M.-K., 2011. NRF2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 $\alpha$ . *Cancer Res.* 71, 2260–2275. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3007>
- Kim, W., Takyar, F.M., Swan, K., Jeong, J., VanHouten, J., Sullivan, C., Dann, P., Yu, H., Fiaschi-Taesch, N., Chang, W., Wysolmerski, J., 2016. Calcium-Sensing Receptor Promotes Breast Cancer by Stimulating Intracrine Actions of Parathyroid Hormone-Related Protein. *Cancer Res.* 76, 5348–5360. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2614>
- Kim, W.-T., Ryu, C.J., 2017. Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB Rep.* 50, 285–298. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.6.039>
- Kim, Y.R., Oh, J.E., Kim, M.S., Kang, M.R., Park, S.W., Han, J.Y., Eom, H.S., Yoo, N.J., Lee, S.H., 2010. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J. Pathol.* 220, 446–451. <https://doi.org/10.1002/path.2653>
- Kitamura, H., Motohashi, H., 2018. NRF2 addiction in cancer cells. *Cancer Sci.* 109, 900–911. <https://doi.org/10.1111/cas.13537>
- Kitamura, H., Onodera, Y., Murakami, S., Suzuki, T., Motohashi, H., 2017. IL-11 contribution to tumorigenesis in an NRF2 addiction cancer model. *Oncogene* 36, 6315–6324. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.236>
- Klaips, C.L., Jayaraj, G.G., Hartl, F.U., 2018. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J. Cell Biol.* 217, 51–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709072>
- Klein, M.J., Siegal, G.P., 2006. Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. *Am. J. Clin. Pathol.* 125, 555–581. <https://doi.org/10.1309/UC6K-QHLD-9LV2-KENN>
- Klein-Nulend, J., Bacabac, R.G., Bakker, A.D., 2012. Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. *Eur. Cell. Mater.* 24, 278–291.
- Kline, M.P., Morimoto, R.I., 1997. Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2107–2115. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.4.2107>
- Kobayashi, T., Nakazono, K., Tokuda, M., Mashima, Y., Dynlacht, B.D., Itoh, H., 2017. HDAC2 promotes loss of primary cilia in pancreatic ductal adenocarcinoma. *EMBO Rep.* 18, 334–343. <https://doi.org/10.15252/embr.201541922>
- Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M.J., Mori, K., 1993. The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 13, 877–890. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.2.877>
- Koketsu, S., Watanabe, T., Nagawa, H., 2004. Expression of DNA repair protein: MYH, NTH1, and MTH1 in colorectal cancer. *Hepatology* 51, 638–642.
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., Yamamoto, M., 2010. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12, 213–223. <https://doi.org/10.1038/ncb2021>
- Komori, T., 2018. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochem. Cell Biol.* 149, 313–323. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1640-6>
- Korfanty, J., Stokowy, T., Widlak, P., Gogler-Pigłowska, A., Handschuh, L., Podkowiński, J., Vydra, N., Naumowicz, A., Toma-Jonik, A., Widlak, W., 2014. Crosstalk between HSF1 and HSF2 during the heat shock response in mouse testes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 57, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.10.006>
- Koto, K., Horie, N., Kimura, S., Murata, H., Sakabe, T., Matsui, T., Watanabe, M., Adachi, S., Maekawa, T., Fushiki, S., Kubo, T., 2009. Clinically relevant dose of zoledronic acid inhibits spontaneous lung metastasis in a murine osteosarcoma model. *Cancer Lett.* 274, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.09.026>
- Kovac, M., Blattmann, C., Ribi, S., Smida, J., Mueller, N.S., Engert, F., Castro-Giner, F., Weischenfeldt, J., Kovacova, M., Krieg, A., Andreou, D., Tunn, P.-U., Dürr, H.R., Rechl, H., Schaser, K.-D., Melcher, I., Burdach, S., Kulozik, A., Specht, K., Heinemann, K., Fulda, S., Bielack, S., Jundt, G., Tomlinson, I., Korb, J.O., Nathrath, M., Baumhoer, D., 2015. Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nat. Commun.* 6, 8940. <https://doi.org/10.1038/ncomms9940>
- Koya, K., Li, Y., Wang, H., Ukai, T., Tatsuta, N., Kawakami, M., Shishido, null, Chen, L.B., 1996. MKT-077, a novel rhodocyanine dye in clinical trials, exhibits anticarcinoma activity in preclinical studies based on selective mitochondrial accumulation. *Cancer Res.* 56, 538–543.
- Krum, S.A., Miranda-Carboni, G.A., Hauschka, P.V., Carroll, J.S., Lane, T.F., Freedman, L.P., Brown, M., 2008. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *EMBO J.* 27, 535–545. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601984>
- Kühl, N.M., Rensing, L., 2000. Heat shock effects on cell cycle progression. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 450–463. <https://doi.org/10.1007/PL00000707>
- Kuijjer, M.L., Rydbeck, H., Kresse, S.H., Buddingh, E.P., Lid, A.B., Roelofs, H., Bürger, H., Myklebost, O., Hogendoorn, P.C.W., Meza-Zepeda, L.A., Cleton-Jansen, A.-M., 2012. Identification of osteosarcoma driver genes by integrative analysis of copy number and gene expression data. *Genes Chromosomes Cancer* 51, 696–706. <https://doi.org/10.1002/gcc.21956>
- Kundu, Z.S., 2014a. Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. *Indian J. Orthop.* 48, 238–246. <https://doi.org/10.4103/0019-5413.132491>
- Kundu, Z.S., 2014b. Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. *Indian J. Orthop.* 48, 238–246. <https://doi.org/10.4103/0019-5413.132491>
- Kupas, V., Weishaupt, C., Siepmann, D., Kaserer, M.-L., Eickelmann, M., Metze, D., Luger, T.A., Beissert, S., Loser, K., 2011. RANK Is Expressed in Metastatic Melanoma and Highly Upregulated on Melanoma-Initiating Cells. *J. Invest. Dermatol.* 131, 944–955. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.377>
- Kurahashi, T., Miyake, H., Hara, I., Fujisawa, M., 2007. Expression of major heat shock proteins in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *J. Urol.* 177, 757–761. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.09.073>
- Kusy, S., Gault, N., Ferri, F., Lewandowski, D., Barroca, V., Jaracz-Ros, A., Losson, R., Romeo, P.-H., 2011. Adult Hematopoiesis is Regulated by TIF1 $\gamma$ , a Repressor of TAL1 and PU.1 Transcriptional Activity. *Cell Stem Cell* 8, 412–425. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.005>
- Labbadia, J., Morimoto, R.I., 2015. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 435–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033955>

- Lamora, A., Talbot, J., Mullard, M., Brounais-Le Royer, B., Redini, F., Verrecchia, F., 2016. TGF- $\beta$  Signaling in Bone Remodeling and Osteosarcoma Progression. *J. Clin. Med.* 5. <https://doi.org/10.3390/jcm5110096>
- Lamoureux, F., Baud?huin, M., Rodriguez Calleja, L., Jacques, C., Berreur, M., R?dini, F., Lecanda, F., Bradner, J.E., Heymann, D., Ory, B., 2014. Selective inhibition of BET bromodomain epigenetic signalling interferes with the bone-associated tumour vicious cycle. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4511>
- Lamoureux, F., Richard, P., Wittrant, Y., Battaglia, S., Pilet, P., Trichet, V., Blanchard, F., Gouin, F., Pitard, B., Heymann, D., Redini, F., 2007a. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.* 67, 7308–7318. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4130>
- Lamoureux, F., Richard, P., Wittrant, Y., Battaglia, S., Pilet, P., Trichet, V., Blanchard, F., Gouin, F., Pitard, B., Heymann, D., Redini, F., 2007b. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.* 67, 7308–7318. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4130>
- Landre, T., Guetz, G.D., Chouahnia, K., Fossey-Diaz, V., Taleb, C., Culine, S., 2019. Is There a Benefit of Addition Docetaxel, Abiraterone, Celecoxib, or Zoledronic Acid in Initial Treatments for Patients Older Than 70 Years With Hormone-sensitive Advanced Prostate Cancer? A Meta-analysis. *Clin. Genitourin. Cancer* 17, e806–e813. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2019.05.001>
- Lecomte, S., Desmots, F., Le Masson, F., Le Goff, P., Michel, D., Christians, E.S., Le Dréan, Y., 2010. Roles of heat shock factor 1 and 2 in response to proteasome inhibition: consequence on p53 stability. *Oncogene* 29, 4216–4224. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.171>
- Lee, J.A., Jung, J.S., Kim, D.H., Lim, J.S., Kim, M.S., Kong, C.-B., Song, W.S., Cho, W.H., Jeon, D.-G., Lee, S.-Y., Koh, J.-S., 2011. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* 56, 738–743. <https://doi.org/10.1002/psc.22720>
- Lee, K.H., Okano, M., Hall, I.H., Brent, D.A., Soltmann, B., 1982. Antitumor agents XLV: Bisbrusatolyl and brusatolyl esters and related compounds as novel potent antileukemic agents. *J. Pharm. Sci.* 71, 338–345. <https://doi.org/10.1002/jps.2600710320>
- Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G., Choi, J.Y., Ryoo, H.M., Bae, S.C., 2000. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8783–8792. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.23.8783-8792.2000>
- Lee, M., Oprea-Ilie, G., Saavedra, H.I., 2015. Silencing of E2F3 suppresses tumor growth of Her2+ breast cancer cells by restricting mitosis. *Oncotarget* 6, 37316–37334.
- Lefaki, M., Papaevgeniou, N., Chondrogianni, N., 2017. Redox regulation of proteasome function. *Redox Biol.* 13, 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.005>
- Leon, L.R., Helwig, B.G., 2010. Heat stroke: Role of the systemic inflammatory response. *J. Appl. Physiol.* 109, 1980–1988. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00301.2010>
- Lepock, J.R., 2004. Role of nuclear protein denaturation and aggregation in thermal radiosensitization. *Int. J. Hyperthermia* 20, 115–130. <https://doi.org/10.1080/02656730310001637334>
- Lepock, J.R., Frey, H.E., Ritchie, K.P., 1993. Protein denaturation in intact hepatocytes and isolated cellular organelles during heat shock. *J. Cell Biol.* 122, 1267–1276. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.6.1267>
- Levine, R.L., Stadtman, E.R., 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol., Molecule Aging* 36, 1495–1502. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00135-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00135-8)
- Li, Chengqiu, Wang, T., Zhang, C., Xuan, J., Su, C., Wang, Y., 2016. Quercetin attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Gene* 577, 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.012>
- Li, F.P., Fraumeni, J.F., 1969. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann. Intern. Med.* 71, 747–752.
- Li, Jian, Chauve, L., Phelps, G., Brielmann, R.M., Morimoto, R.I., 2016. E2F coregulates an essential HSF developmental program that is distinct from the heat-shock response. *Genes Dev.* 30, 2062–2075. <https://doi.org/10.1101/gad.283317.116>
- Li, Jin, Feng, W., Chen, L., He, J., 2016. Downregulation of SMC1A inhibits growth and increases apoptosis and chemosensitivity of colorectal cancer cells. *J. Int. Med. Res.* 44, 67–74. <https://doi.org/10.1177/0300060515600188>
- Li, J., Labbadia, J., Morimoto, R.I., 2017. Rethinking HSF1 in Stress, Development, and Organismal Health. *Trends Cell Biol.* 27, 895–905. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.002>
- Li, Na, Li, Y., Lv, J., Zheng, X., Wen, H., Shen, H., Zhu, G., Chen, T.-Y., Dhar, S.S., Kan, P.-Y., Wang, Z., Shiekhhattar, R., Shi, X., Lan, F., Chen, K., Li, W., Li, H., Lee, M.G., 2016. ZMYND8 Reads the Dual Histone Mark H3K4me1-H3K14ac to Antagonize the Expression of Metastasis-Linked Genes. *Mol. Cell* 63, 470–484. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.035>
- Li, Q., Martinez, J.D., 2011. Loss of HSF1 Results in Defective Radiation-Induced G2 Arrest and DNA Repair. *Radiat. Res.* 176, 17–24.
- Li, S., Pei, Y., Wang, W., Liu, F., Zheng, K., Zhang, X., 2019. Quercetin suppresses the proliferation and metastasis of metastatic osteosarcoma cells by inhibiting parathyroid hormone receptor 1. *Biomed. Pharmacother.* 114, 108839. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108839>
- Li, X., Jiang, H., Xiao, L., Wang, S., Zheng, J., 2017. miR-200bc/429 Inhibits Osteosarcoma Cell Proliferation and Invasion by Targeting PMP22. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 23, 1001–1008. <https://doi.org/10.12659/MSM.900084>
- Li, X., Srinivasan, S.R., Connarn, J., Ahmad, A., Young, Z.T., Kabza, A.M., Zuiderweg, E.R.P., Sun, D., Gestwicki, J.E., 2013. Analogs of the Allosteric Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Inhibitor, MKT-077, as Anti-Cancer Agents. *ACS Med. Chem. Lett.* 4. <https://doi.org/10.1021/ml400204n>
- Li, X., Tian, J., Bo, Q., Li, K., Wang, H., Liu, T., Li, J., 2015. Targeting DNA-PKcs increased anticancer drug sensitivity by suppressing DNA damage repair in osteosarcoma cell line MG63. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 36, 9365–9372. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3642-5>
- Li, X.-X., Shi, L., Zhou, X.-J., Wu, J., Xia, T.-S., Zhou, W.-B., Sun, X., Zhu, L., Wei, J.-F., Ding, Q., 2017. The role of c-Myc-RBM38 loop in the growth suppression in breast cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 36, 49. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0521-5>
- Liang, W., Liao, Y., Zhang, J., Huang, Q., Luo, W., Yu, J., Gong, J., Zhou, Y., Li, X., Tang, B., He, S., Yang, J., 2017. Heat shock factor 1 inhibits the mitochondrial apoptosis pathway by regulating second mitochondria-derived activator of caspase to promote pancreatic tumorigenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 36, 64. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0537-x>
- Liao, D., Zhong, L., Duan, T., Zhang, R.-H., Wang, X., Wang, G., Hu, K., Lv, X., Kang, T., 2015. Aspirin Suppresses the Growth and Metastasis of Osteosarcoma through the NF- $\kappa$ B Pathway. *Clin. Cancer Res.* 21, 5349–5359. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0198>

- Lin, X., Sun, R., Zhao, Xiulan, Zhu, D., Zhao, Xueming, Gu, Q., Dong, X., Zhang, D., Zhang, Y., Li, Y., Sun, B., 2017. C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 95, 53–67. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1452-x>
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631–677. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>
- Liou, Y.F., Hall, I.H., Okano, M., Lee, K.H., Chaney, S.G., 1982. Antitumor agents XLVIII: Structure-activity relationships of quassinoids as in vitro protein synthesis inhibitors of P-388 lymphocytic leukemia tumor cell metabolism. *J. Pharm. Sci.* 71, 430–435. <https://doi.org/10.1002/jps.2600710414>
- Liu, Q., Huang, J., Zhou, N., Zhang, Z., Zhang, A., Lu, Z., Wu, F., Mo, Y.-Y., 2013. LncRNA loc285194 is a p53-regulated tumor suppressor. *Nucleic Acids Res.* 41, 4976–4987. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt182>
- Liu, S., Chen, Z., 2015. The Functional Role of PMP22 Gene in the Proliferation and Invasion of Osteosarcoma. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 21, 1976–1982. <https://doi.org/10.12659/MSM.893430>
- Liu, Y., Chang, A., 2008a. Heat shock response relieves ER stress. *EMBO J.* 27, 1049–1059. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.42>
- Liu, Y., Chang, A., 2008b. Heat shock response relieves ER stress. *EMBO J.* 27, 1049–1059. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.42>
- Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., Kourembanas, S., 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* 77, 638–643. <https://doi.org/10.1161/01.res.77.3.638>
- Liu, Y.V., Baek, J.H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R.N., Semenza, G.L., 2007. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol. Cell* 25, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.001>
- Loison, F., Debure, L., Nizard, P., le Goff, P., Michel, D., le Dréan, Y., 2006. Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1–HSF2 heterocomplexes. *Biochem. J.* 395, 223–231. <https://doi.org/10.1042/BJ20051190>
- Lonardo, F., Ueda, T., Huvos, A.G., Healey, J., Ladanyi, M., 1997. p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathologic features and proliferative rate. *Cancer* 79, 1541–1547.
- Lopez, S., Stuhl, L., Fichelson, S., Dubart-Kupperschmitt, A., St Arnaud, R., Galindo, J.-R., Murati, A., Berda, N., Dubreuil, P., Gomez, S., 2005. NACA is a positive regulator of human erythroid-cell differentiation. *J. Cell Sci.* 118, 1595–1605. <https://doi.org/10.1242/jcs.02295>
- Losada, A., Hirano, T., 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* 19, 1269–1287. <https://doi.org/10.1101/gad.1320505>
- Loukopoulos, P., Robinson, W.F., 2007. Clinicopathological relevance of tumour grading in canine osteosarcoma. *J. Comp. Pathol.* 136, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.11.005>
- Lu, X.-Y., Lu, Y., Zhao, Y.-J., Jaeweon, K., Kang, J., Xiao-Nan, L., Ge, G., Meyer, R., Perlaky, L., Hicks, J., Chintagumpala, M., Cai, W.-W., Ladanyi, M., Gorlick, R., Lau, C.C., Pati, D., Sheldon, M., Rao, P.H., 2008a. Cell cycle regulator gene CDC5L, a potential target for 6p12-p21 amplicon in osteosarcoma. *Mol. Cancer Res. MCR* 6, 937–946. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2115>
- Lu, X.-Y., Lu, Y., Zhao, Y.-J., Jaeweon, K., Kang, J., Xiao-Nan, L., Ge, G., Meyer, R., Perlaky, L., Hicks, J., Chintagumpala, M., Cai, W.-W., Ladanyi, M., Gorlick, R., Lau, C.C., Pati, D., Sheldon, M., Rao, P.H., 2008b. Cell Cycle Regulator Gene CDC5L, a Potential Target for 6p12-p21 Amplicon in Osteosarcoma. *Mol. Cancer Res. MCR* 6, 937–946. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2115>
- Luca, G.D., Russo, M.T., Degan, P., Tiveron, C., Zijno, A., Meccia, E., Ventura, I., Mattei, E., Nakabeppu, Y., Crescenzi, M., Pepponi, R., Pèzzola, A., Popoli, P., Bignami, M., 2008. A Role for Oxidized DNA Precursors in Huntington's Disease-Like Striatal Neurodegeneration. *PLoS Genet.* 4, e1000266. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000266>
- Luetke, A., Meyers, P.A., Lewis, I., Juergens, H., 2014. Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treat. Rev.* 40, 523–532. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.11.006>
- Ma, L., Wang, X., Duan, M., Liu, L., Shi, J., Dong, L., Yang, L., Wang, Z., Ding, Z., Ke, A., Cao, Y., Zhang, X., Zhou, J., Fan, J., Gao, Q., 2017. Telomere length variation in tumor cells and cancer-associated fibroblasts: potential biomarker for hepatocellular carcinoma. *J. Pathol.* 243, 407–417. <https://doi.org/10.1002/path.4961>
- MacEwen, E.G., Kurzman, I.D., Rosenthal, R.C., Smith, B.W., Manley, P.A., Roush, J.K., Howard, P.E., 1989. Therapy for osteosarcoma in dogs with intravenous injection of liposome-encapsulated muramyl tripeptide. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 935–938.
- Maghsudlu, M., Yazd, E.F., 2017. Heat-induced inflammation and its role in esophageal cancer. *J. Dig. Dis.* 18, 431–444. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12511>
- Mahat, D.B., Salamanca, H.H., Duarte, F.M., Danko, C.G., Lis, J.T., 2016. Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional Regulation. *Mol. Cell* 62, 63–78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.025>
- Mao, P., Wyrick, J.J., Roberts, S.A., Smerdon, M.J., 2017. UV-Induced DNA Damage and Mutagenesis in Chromatin. *Photochem. Photobiol.* 93, 216–228. <https://doi.org/10.1111/php.12646>
- Mao, Q.D., Zhang, W., Zhao, K., Cao, B., Yuan, H., Wei, L.Z., Song, M.Q., Liu, X.S., 2017. MicroRNA-455 suppresses the oncogenic function of HDAC2 in human colorectal cancer. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 50, e6103. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20176103>
- Marcén, M., Ruiz, V., Serrano, M.J., Condón, S., Mañas, P., 2017. Oxidative stress in E. coli cells upon exposure to heat treatments. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.023>
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., Ron, D., 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18, 3066–3077. <https://doi.org/10.1101/gad.1250704>
- Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J.C., Ralph, S.J., Rodríguez-Enríquez, S., Moreno-Sánchez, R., 2009. HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 1084–1101.
- Marques, I.J., Weiss, F.U., Vlecken, D.H., Nitsche, C., Bakkers, J., Legendijk, A.K., Partecke, L.I., Heidecke, C.-D., Lerch, M.M., Bagowski, C.P., 2009. Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer* 9, 128. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-128>
- Martin, J.W., Squire, J.A., Zielenska, M., 2012. The genetics of osteosarcoma. *Sarcoma* 2012, 627254. <https://doi.org/10.1155/2012/627254>
- Martin, J.W., Yoshimoto, M., Ludkovski, O., Thorner, P.S., Zielenska, M., Squire, J.A., Nuin, P. a. S., 2010. Analysis of segmental duplications, mouse genome synteny and recurrent cancer-associated amplicons in human chromosome 6p21-p12. *Cytogenet. Genome Res.* 128, 199–213. <https://doi.org/10.1159/000308353>

- Martins-Neves, S.R., Paiva-Oliveira, D.I., Fontes-Ribeiro, C., Bovée, J.V.M.G., Cleton-Jansen, A.-M., Gomes, C.M.F., 2018. IWR-1, a tankyrase inhibitor, attenuates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cancer stem-like cells and inhibits in vivo the growth of a subcutaneous human osteosarcoma xenograft. *Cancer Lett.* 414, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.004>
- Mashiatulla, M., Ross, R.D., Sumner, D.R., 2017. Validation of Cortical Bone Mineral Density Distribution using micro-Computed Tomography. *Bone* 99, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.03.049>
- Masoud, G.N., Li, W., 2015. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* 5, 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007>
- Maurizi, A., Rucci, N., 2018. The Osteoclast in Bone Metastasis: Player and Target. *Cancers* 10. <https://doi.org/10.3390/cancers10070218>
- Mayer, E.L., Krop, I.E., 2010. Advances in Targeting Src in the Treatment of Breast Cancer and Other Solid Malignancies. *Clin. Cancer Res.* 16, 3526–3532. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1834>
- McColgan, P., Tabrizi, S.J., 2018. Huntington's disease: a clinical review. *Eur. J. Neurol.* 25, 24–34. <https://doi.org/10.1111/ene.13413>
- McCracken, A.A., Brodsky, J.L., 2003. Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD). *BioEssays* 25, 868–877. <https://doi.org/10.1002/bies.10320>
- McGary, E.C., Weber, K., Mills, L., Doucet, M., Lewis, V., Lev, D.C., Fidler, I.J., Bar-Eli, M., 2002. Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 3584–3591.
- McHugh, K.P., Hodivala-Dilke, K., Zheng, M.H., Namba, N., Lam, J., Novack, D., Feng, X., Ross, F.P., Hynes, R.O., Teitelbaum, S.L., 2000. Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J. Clin. Invest.* 105, 433–440. <https://doi.org/10.1172/JCI8905>
- McMillan, D.R., Christians, E., Forster, M., Xiao, X., Connell, P., Plumier, J.-C., Zuo, X., Richardson, J., Morgan, S., Benjamin, I.J., 2002. Heat Shock Transcription Factor 2 Is Not Essential for Embryonic Development, Fertility, or Adult Cognitive and Psychomotor Function in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8005–8014. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.22.8005-8014.2002>
- McMillan, D.R., Xiao, X., Shao, L., Graves, K., Benjamin, I.J., 1998. Targeted Disruption of Heat Shock Transcription Factor 1 Abolishes Thermotolerance and Protection against Heat-inducible Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 7523–7528. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7523>
- Mejia-Guerrero, S., Quejada, M., Gokgoz, N., Gill, M., Parkes, R.K., Wunder, J.S., Andrulis, I.L., 2010. Characterization of the 12q15 MDM2 and 12q13-14 CDK4 amplicons and clinical correlations in osteosarcoma. *Genes. Chromosomes Cancer* 49, 518–525. <https://doi.org/10.1002/gcc.20761>
- Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A.L., Lambert, J.-P., St-Denis, N., Li, T., Miteva, Y.V., Hauri, S., Sardi, M.E., Low, T.Y., Halim, V.A., Bagshaw, R.D., Hubner, N.C., al-Hakim, A., Bouchard, A., Faubert, D., Fermin, D., Dunham, W.H., Goudreault, M., Lin, Z.-Y., Badillo, B.G., Pawson, T., Durocher, D., Coulombe, B., Aebersold, R., Superti-Furga, G., Colinge, J., Heck, A.J.R., Choi, H., Gstaiger, M., Mohammed, S., Cristea, I.M., Bennett, K.L., Washburn, M.P., Raught, B., Ewing, R.M., Gingras, A.-C., Nesvizhskii, A.I., 2013. The CRAPome: a Contaminant Repository for Affinity Purification Mass Spectrometry Data. *Nat. Methods* 10, 730–736. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2557>
- Mendillo, M.L., Santagata, S., Koeva, M., Bell, G.W., Hu, R., Tamimi, R.M., Fraenkel, E., Ince, T.A., Whitesell, L., Lindquist, S., 2012a. HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. *Cell* 150, 549–562. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.031>
- Mendillo, M.L., Santagata, S., Koeva, M., Bell, G.W., Hu, R., Tamimi, R.M., Fraenkel, E., Ince, T.A., Whitesell, L., Lindquist, S., 2012b. HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. *Cell* 150, 549–562. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.031>
- Meng, L., Gabai, V.L., Sherman, M.Y., 2010. Heat-shock transcription factor HSF1 has a critical role in human epidermal growth factor receptor-2-induced cellular transformation and tumorigenesis. *Oncogene* 29, 5204–5213. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.277>
- Metchat, A., Åkerfelt, M., Bierkamp, C., Delsinne, V., Sistonen, L., Alexandre, H., Christians, E.S., 2009. Mammalian Heat Shock Factor 1 Is Essential for Oocyte Meiosis and Directly Regulates Hsp90 $\alpha$  Expression. *J. Biol. Chem.* 284, 9521. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808819200>
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., Sommer, T., 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell Biol.* 7, 766–772. <https://doi.org/10.1038/ncb0805-766>
- Meyers, P.A., Schwartz, C.L., Krailo, M.D., Healey, J.H., Bernstein, M.L., Betcher, D., Ferguson, W.S., Gebhardt, M.C., Goorin, A.M., Harris, M., Kleinerman, E., Link, M.P., Nadel, H., Nieder, M., Siegal, G.P., Weiner, M.A., Wells, R.J., Womer, R.B., Grier, H.E., Children's Oncology Group, 2008. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival—a report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 633–638. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.14.0095>
- Miller, C.W., Aslo, A., Won, A., Tan, M., Lampkin, B., Koeffler, H.P., 1996. Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122, 559–565.
- Miller, S.C., de Saint-Georges, L., Bowman, B.M., Jee, W.S., 1989. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc.* 3, 953–960; discussion 960–961.
- Mirabello, L., Troisi, R.J., Savage, S.A., 2009. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int. J. Cancer* 125, 229–234. <https://doi.org/10.1002/ijc.24320>
- Miranda, E., Nordgren, I.K., Male, A.L., Lawrence, C.E., Hoakwie, F., Cuda, F., Court, W., Fox, K.R., Townsend, P.A., Packham, G.K., Eccles, S.A., Tavassoli, A., 2013. A cyclic peptide inhibitor of HIF-1 heterodimerization that inhibits hypoxia signaling in cancer cells. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 10418–10425. <https://doi.org/10.1021/ja402993u>
- Misdorp, W., 1980. Skeletal osteosarcoma. Animal model: canine osteosarcoma. *Am. J. Pathol.* 98, 285–288.
- Mitra, S., Boldogh, I., Izumi, T., Hazra, T.K., 2001. Complexities of the DNA Base Excision Repair Pathway for Repair of Oxidative DNA Damage. *Environ. Mol. Mutagen.* 38, 180–190.
- Mittler, R., 2017. ROS Are Good. *Trends Plant Sci.* 22, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Miyazaki, T., Sanjay, A., Neff, L., Tanaka, S., Horne, W.C., Baron, R., 2004. Src Kinase Activity Is Essential for Osteoclast Function. *J. Biol. Chem.* 279, 17660–17666. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311032200>
- Moenner, M., Pluquet, O., Bouchecareilh, M., Chevet, E., 2007. Integrated Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Cancer. *Cancer Res.* 67, 10631–10634. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1705>
- Moloney, J.N., Cotter, T.G., 2017. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2017.05.023>

- Mols, M., Ceragioli, M., Abee, T., 2011. Heat stress leads to superoxide formation in *Bacillus cereus* detected using the fluorescent probe MitoSOX. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.004>
- Mora Camilo, Counsell Chelsie W.W., Bielecki Coral R., Louis Leo V, 2017. Twenty-Seven Ways a Heat Wave Can Kill You: *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* 10, e004233. <https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.117.004233>
- Moreau, A., Yotov, W.V., Glorieux, F.H., St-Arnaud, R., 1998. Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1312–1321.
- Morello, E., Martano, M., Buracco, P., 2011. Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma. *Vet. J. Lond. Engl.* 197, 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.08.014>
- Moreno, J.C., Bikker, H., Kempers, M.J.E., van Trotsenburg, A.S.P., Baas, F., de Vijlder, J.J.M., Vulmsa, T., Ris-Stalpers, C., 2002. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* 347, 95–102. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012752>
- Morimoto, H., Iwata, K., Ogonuki, N., Inoue, K., Atsuo, O., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, T., Yabe-Nishimura, C., Shinohara, T., 2013. ROS Are Required for Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell* 12, 774–786. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.001>
- Morita, M., Gravel, S.-P., Hulea, L., Larsson, O., Pollak, M., St-Pierre, J., Topisirovic, I., 2015. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle* 14, 473–480. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.991572>
- Morrow, J.J., Khanna, C., 2015. Osteosarcoma Genetics and Epigenetics: Emerging Biology and Candidate Therapies. *Crit. Rev. Oncog.* 20, 173–197.
- Mosley, J.R., 2000. Osteoporosis and bone functional adaptation: mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review. *J. Rehabil. Res. Dev.* 37, 189–199.
- Moukengue, B., Amiaud, J., Jacques, C., Charrier, C., Ory, B., Lamoureux, F., 2019. Analysis of mRNA, miRNA, and DNA in Bone Cells by RT-qPCR and In Situ Hybridization. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1914, 169–196. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3_9)
- Murakami, M., Taniguchi, M., Takama, M., Cui, J.H., Oyanagai, Y., 2008. UVB-dependent generation of reactive oxygen species by catalase and IgG under UVB light: Inhibition by antioxidants and anti-inflammatory drugs. *Drug Discov. Ther.* 2, 85–93.
- Muraro, M., Mereuta, O.M., Carraro, F., Madon, E., Fagioli, F., 2007. Osteosarcoma cell line growth inhibition by zoledronate-stimulated effector cells. *Cell. Immunol.* 249, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.11.005>
- Nagai, N., Nakai, A., Nagata, K., 1995. Quercetin suppresses heat shock response by down regulation of HSF1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 1099–1105. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1447>
- Nagel, R., Semenova, E.A., Berns, A., 2016. Drugging the addict: non-oncogene addiction as a target for cancer therapy. *EMBO Rep.* 17, 1516–1531. <https://doi.org/10.15252/embr.201643030>
- Naidu, S.D., Dinkova-Kostova, A.T., 2017. Regulation of the mammalian heat shock factor 1. *FEBS J.* 284, 1606–1627. <https://doi.org/10.1111/febs.13999>
- Nakabeppu, Y., 2014. Cellular Levels of 8-Oxoguanine in either DNA or the Nucleotide Pool Play Pivotal Roles in Carcinogenesis and Survival of Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 12543–12557. <https://doi.org/10.3390/ijms150712543>
- Nakabeppu, Y., 2001. Molecular genetics and structural biology of human MutT homolog, MTH1. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen., Analysis and Prevention of Carcinogenesis in Animal Models* 477, 59–70. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00096-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00096-3)
- Nakabeppu, Y., Sakumi, K., Sakamoto, K., Tsuchimoto, D., Tsuzuki, T., Nakatsu, Y., 2006. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol. Chem.* 387, 373–379. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.050>
- Nakamura, Y., Fujimoto, M., Fukushima, S., Nakamura, A., Hayashida, N., Takii, R., Takaki, E., Nakai, A., Muto, M., 2014. Heat shock factor 1 is required for migration and invasion of human melanoma in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 354, 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.029>
- Nakamura, Y., Fujimoto, M., Hayashida, N., Takii, R., Nakai, A., Muto, M., 2010. Silencing HSF1 by short hairpin RNA decreases cell proliferation and enhances sensitivity to hyperthermia in human melanoma cell lines. *J. Dermatol. Sci.* 60, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.09.009>
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17–29.
- Napier, C.E., Huschtscha, L.I., Harvey, A., Bower, K., Noble, J.R., Hendrickson, E.A., Reddel, R.R., 2015. ATRX represses alternative lengthening of telomeres. *Oncotarget* 6, 16543–16558. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3846>
- Narayanan, A., Srinath, N., Rohini, M., Selvamurugan, N., 2019. Regulation of Runx2 by MicroRNAs in osteoblast differentiation. *Life Sci.* 232, 116676. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116676>
- Netzer, N., Gatterer, H., Faulhaber, M., Burtscher, M., Pramschler, S., Pesta, D., 2015. Hypoxia, Oxidative Stress and Fat. *Biomolecules* 5, 1143–1150. <https://doi.org/10.3390/biom5021143>
- Neudegger, T., Verghese, J., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U., Bracher, A., 2016. Structure of human heat-shock transcription factor 1 in complex with DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 140–146. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3149>
- Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C.B., 2009. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 284, 13291–13295. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>
- Nioi, P., Nguyen, T., 2007. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 816–821. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.051>
- Niyibizi, C., Eyre, D.R., 1994. Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen. *Eur. J. Biochem.* 224, 943–950. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00943.x>
- Oakes, S.A., 2017. Endoplasmic reticulum proteostasis: a key checkpoint in cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 312, C93–C102. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00266.2016>
- Obtulowicz, T., Swoboda, M., Speina, E., Gackowski, D., Rozalski, R., Siomek, A., Janik, J., Janowska, B., Ciesla, J.M., Jawien, A., Banaszkiwicz, Z., Guz, J., Dziaman, T., Szpila, A., Olinski, R., Tudek, B., 2010. Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. *Mutagenesis* 25, 463–471. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq028>
- Ochs, J.J., Freeman, A.I., Douglass, H.O., Higby, D.S., Mindell, E.R., Sinks, L.F., 1978. cis-Dichlorodiammineplatinum (II) in advanced osteogenic sarcoma. *Cancer Treat. Rep.* 62, 239–245.
- O'Connor, M.J., 2015. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol. Cell* 60, 547–560. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.040>
- Oh, E.-T., Kim, J.-W., Kim, J.M., Kim, S.J., Lee, J.-S., Hong, S.-S., Goodwin, J., Ruthenborg, R.J., Jung, M.G., Lee, H.-J., Lee, C.-H., Park, E.S., Kim, C., Park, H.J., 2016. NQO1 inhibits proteasome-mediated degradation of HIF-1 $\alpha$ . *Nat. Commun.* 7, 13593. <https://doi.org/10.1038/ncomms13593>

- Oh, J.H., Kim, H.-S., Kim, H.-H., Kim, W.H., Lee, S.H., 2006. Aberrant methylation of p14ARF gene correlates with poor survival in osteosarcoma. *Clin. Orthop.* 442, 216–222.
- Ohba, T., Cole, H.A., Cates, J.M., Slosky, D.A., Haro, H., Ando, T., Schwartz, H.S., Schoenecker, J.G., 2014. Bisphosphonates Inhibit Osteosarcoma-Mediated Osteolysis Via Attenuation of Tumor Expression of MCP-1 and RANKL. *J. Bone Miner. Res.* 29, 1431–1445. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2182>
- Ohta, T., Iijima, K., Miyamoto, M., Nakahara, I., Tanaka, H., Ohtsuji, M., Suzuki, T., Kobayashi, A., Yokota, J., Sakiyama, T., Shibata, T., Yamamoto, M., Hirohashi, S., 2008. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res.* 68, 1303–1309. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5003>
- Oka, M., Sato, S., Soda, H., Fukuda, M., Kawabata, S., Nakatomi, K., Shiozawa, K., Nakamura, Y., Ohtsuka, K., Kohno, S., 2001. Autoantibody to heat shock protein Hsp40 in sera of lung cancer patients. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 92, 316–320. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2001.tb01097.x>
- Oka, S., Nakabeppu, Y., 2011. DNA glycosylase encoded by MUTYH functions as a molecular switch for programmed cell death under oxidative stress to suppress tumorigenesis. *Cancer Sci.* 102, 677–682. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01869.x>
- Ory, B., Baud'huin, M., Verrecchia, F., Royer, B.B.-L., Quillard, T., Amiaud, J., Battaglia, S., Heymann, D., Redini, F., Lamoureux, F., 2016. Blocking HSP90 Addiction Inhibits Tumor Cell Proliferation, Metastasis Development, and Synergistically Acts with Zoledronic Acid to Delay Osteosarcoma Progression. *Clin. Cancer Res.* 22, 2520–2533. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1925>
- Ory, B., Blanchard, F., Battaglia, S., Gouin, F., Redini, F., Heymann, D., 2007. Zoledronic acid activates the DNA S-phase checkpoint and induces osteosarcoma cell death characterized by apoptosis-inducing factor and endonuclease-G translocation independently of p53 and retinoblastoma status. *Mol. Pharmacol.* 71, 333–343. <https://doi.org/10.1124/mol.106.028837>
- Ory, B., Heymann, M.-F., Kamijo, A., Gouin, F., Heymann, D., Redini, F., 2005. Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* 104, 2522–2529. <https://doi.org/10.1002/cncr.21530>
- Ory, Benjamin, Moriceau, G., Redini, F., Heymann, D., 2007. mTOR inhibitors (rapamycin and its derivatives) and nitrogen containing bisphosphonates: bi-functional compounds for the treatment of bone tumours. *Curr. Med. Chem.* 14, 1381–1387.
- Ostling, P., Björk, J.K., Roos-Mattjus, P., Mezger, V., Sistonen, L., 2007. Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *J. Biol. Chem.* 282, 7077–7086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607556200>
- Owusu-Ansah, E., Banerjee, U., 2009. Reactive Oxygen Species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461, 537–541. <https://doi.org/10.1038/nature08313>
- Ozaki, T., Flege, S., Liljenqvist, U., Hillmann, A., Dellling, G., Salzer-Kuntschik, M., Jürgens, H., Kotz, R., Winkelmann, W., Bielack, S.S., 2002. Osteosarcoma of the spine: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group. *Cancer* 94, 1069–1077.
- Ozawa, K., Tsukamoto, Y., Hori, O., Kitao, Y., Yanagi, H., Stern, D.M., Ogawa, S., 2001. Regulation of Tumor Angiogenesis by Oxygen-regulated Protein 150, an Inducible Endoplasmic Reticulum Chaperone. *Cancer Res.* 61, 4206–4213.
- Padmanabhan, B., Tong, K.I., Ohta, T., Nakamura, Y., Scharlock, M., Ohtsuji, M., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Yokoyama, S., Yamamoto, M., 2006. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol. Cell* 21, 689–700. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.013>
- Page, T.J., Sikder, D., Yang, L., Pluta, L., Wolfinger, R.D., Kodadek, T., Thomas, R.S., 2006. Genome-wide analysis of human HSF1 signaling reveals a transcriptional program linked to cellular adaptation and survival. *Mol. Biosyst.* 2, 627–639. <https://doi.org/10.1039/b606129j>
- Paiva, K.B.S., Granjeiro, J.M., 2017. Chapter Six - Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption, Remodeling, and Repair, in: Khalil, R.A. (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science, Matrix Metalloproteinases and Tissue Remodeling in Health and Disease: Target Tissues and Therapy*. Academic Press, pp. 203–303. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.05.001>
- Palayoor, S.T., Mitchell, J.B., Cerna, D., Degraff, W., John-Aryankalayil, M., Coleman, C.N., 2008. PX-478, an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha, enhances radiosensitivity of prostate carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 123, 2430–2437. <https://doi.org/10.1002/ijc.23807>
- Pan, X.-W., Gan, S.-S., Ye, J.-Q., Fan, Y.-H., Hong, Y., Chu, C.-M., Gao, Y., Li, L., Liu, X., Chen, L., Huang, Y., Xu, H., Ren, J.-Z., Yin, L., Qu, F.-J., Huang, H., Cui, X.-G., Xu, D.-F., 2016. SMC1A promotes growth and migration of prostate cancer in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* 49, 1963–1972. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3697>
- Parakh, S., Atkin, J.D., 2016. Protein folding alterations in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res., ER stress and neurodegenerative diseases: From disease mechanism to therapies* 1648, 633–649. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.010>
- Park, H.G., Han, S.I., Oh, S.Y., Kang, H.S., 2005. Cellular responses to mild heat stress. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 10–23. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4208-7>
- Parks, S.K., Chiche, J., Pouyssegur, J., 2013. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 13, 611–623. <https://doi.org/10.1038/nrc3579>
- Pasic, I., Shlien, A., Durbin, A.D., Stavropoulos, D.J., Baskin, B., Ray, P.N., Novokmet, A., Malkin, D., 2010. Recurrent focal copy-number changes and loss of heterozygosity implicate two noncoding RNAs and one tumor suppressor gene at chromosome 3q13.31 in osteosarcoma. *Cancer Res.* 70, 160–171. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1902>
- Patel, A., Burton, D.G.A., Halvorsen, K., Balkan, W., Reiner, T., Perez-Stable, C., Cohen, A., Munoz, A., Giribaldi, M.G., Singh, S., Robbins, D.J., Nguyen, D.M., Rai, P., 2014. MutT Homolog 1 (MTH1) maintains multiple KRAS-driven pro-malignant pathways. *Oncogene* 34, 2586–2596.
- Patel, H.J., Modi, S., Chiosis, G., Taldone, T., 2011. Advances in the discovery and development of heat-shock protein 90 inhibitors for cancer treatment. *Expert Opin. Drug Discov.* 6, 559–587. <https://doi.org/10.1517/17460441.2011.563296>
- Paul, C., Murray, A.A., Spears, N., Saunders, P.T.K., 2008. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction* 136, 73–84. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0036>
- Paul, S., Ghosh, S., Mandal, S., Sau, S., Pal, M., 2018a. NRF2 transcriptionally activates the heat shock factor 1 promoter under oxidative stress and affects survival and migration potential of MCF7 cells. *J. Biol. Chem.* 293, 19303–19316. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003376>
- Paul, S., Ghosh, S., Mandal, S., Sau, S., Pal, M., 2018b. NRF2 transcriptionally activates the heat shock factor 1 promoter under oxidative stress and affects survival and migration potential of MCF7 cells. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003376>
- Paul Tuck, S., Layfield, R., Walker, J., Mekkayil, B., Francis, R., 2017. Adult Paget's disease of bone: a review. *Rheumatology* 56, 2050–2059. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew430>
- Pavlov, Y.I., Minnick, D.T., Izuta, S., Kunkel, T.A., 1994. DNA Replication Fidelity with 8-Oxodeoxyguanosine Triphosphate. *Biochemistry* 33, 4695–4701. <https://doi.org/10.1021/bi00181a029>



- Pearson, R.C., McCloy, R.F., 1989. Preference for hot drinks is associated with peptic disease. *Gut* 30, 1201–1205.
- Pelham, H.R., 1982. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. *Cell* 30, 517–528.
- Pennanen, M., Hagström, J., Heiskanen, I., Sane, T., Mustonen, H., Arola, J., Haglund, C., 2018. C-myc expression in adrenocortical tumours. *J. Clin. Pathol.* 71, 129–134. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204503>
- Pérez-Crespo, M., Pintado, B., Gutiérrez-Adán, A., 2008. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 40–47. <https://doi.org/10.1002/mrd.20759>
- Perisic, O., Xiao, H., Lis, J.T., 1989. Stable binding of *Drosophila* heat shock factor to head-to-head and tail-to-tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit. *Cell* 59, 797–806.
- Perry, J.A., Kiezun, A., Tonzi, P., Van Allen, E.M., Carter, S.L., Baca, S.C., Cowley, G.S., Bhatt, A.S., Rheinbay, E., Peadarallu, C.S., Helman, E., Taylor-Weiner, A., McKenna, A., DeLuca, D.S., Lawrence, M.S., Ambrogio, L., Sougnez, C., Sivachenko, A., Walensky, L.D., Wagle, N., Mora, J., de Torres, C., Lavarino, C., Dos Santos Aguiar, S., Yunes, J.A., Brandalise, S.R., Mercado-Celis, G.E., Melendez-Zajgla, J., Cárdenas-Cardós, R., Velasco-Hidalgo, L., Roberts, C.W.M., Garraway, L.A., Rodriguez-Galindo, C., Gabriel, S.B., Lander, E.S., Golub, T.R., Orkin, S.H., Getz, G., Janeway, K.A., 2014. Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E5564–5573. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419260111>
- Peteranderl, R., Nelson, H.C., 1992. Trimerization of the heat shock transcription factor by a triple-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochemistry* 31, 12272–12276.
- Petrocchi, A., Leo, E., Reyna, N.J., Hamilton, M.M., Shi, X., Parker, C.A., Mseeh, F., Bardenhagen, J.P., Leonard, P., Cross, J.B., Huang, S., Jiang, Y., Cardozo, M., Draetta, G., Marszalek, J.R., Toniatti, C., Jones, P., Lewis, R.T., 2016. Identification of potent and selective MTH1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 1503–1507. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.02.026>
- Pignochino, Y., Grignani, G., Cavalloni, G., Motta, M., Tapparo, M., Bruno, S., Bottos, A., Gammaitoni, L., Migliardi, G., Camussi, G., Alberghini, M., Torchio, B., Ferrari, S., Bussolino, F., Fagioli, F., Picci, P., Aglietta, M., 2009. Sorafenib blocks tumour growth, angiogenesis and metastatic potential in preclinical models of osteosarcoma through a mechanism potentially involving the inhibition of ERK1/2, MCL-1 and ezrin pathways. *Mol. Cancer* 8, 118. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-118>
- Piperno-Neumann, S., Le Deley, M.-C., Rédini, F., Pacquement, H., Marec-Bérard, P., Petit, P., Brisse, H., Lervat, C., Gentet, J.-C., Entz-Werlé, N., Italiano, A., Corradini, N., Bompas, E., Penel, N., Tabone, M.-D., Gomez-Brouchet, A., Guinebretière, J.-M., Mascard, E., Gouin, F., Chevance, A., Bonnet, N., Blay, J.-Y., Brugières, L., Sarcoma Group of UNICANCER, French Society of Pediatric Oncology (SFCE), French Sarcoma Group (GSF-GETO), 2016. Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 17, 1070–1080. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30096-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30096-1)
- Pirkkala, L., Alastalo, T.P., Zuo, X., Benjamin, I.J., Sistonen, L., 2000. Disruption of heat shock factor 1 reveals an essential role in the ubiquitin proteolytic pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2670–2675.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Plotkin, L.I., Mathov, I., Aguirre, J.I., Parfitt, A.M., Manolagas, S.C., Bellido, T., 2005. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases, and ERKs. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 289, C633–C643. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00278.2004>
- Pommier, R.M., Gout, J., Vincent, D.F., Alcaraz, L.B., Chuvin, N., Arfi, V., Martel, S., Kaniewski, B., Devailly, G., Fourel, G., Bernard, P., Moyret-Lalle, C., Ansieau, S., Puisieux, A., Valcourt, U., Sentis, S., Bartholin, L., 2015. TIF1 $\gamma$  Suppresses Tumor Progression by Regulating Mitotic Checkpoints and Chromosomal Stability. *Cancer Res.* 75, 4335–4350. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3426>
- Poos, K., Smida, J., Nathrath, M., Maugg, D., Baumhoer, D., Neumann, A., Korsching, E., 2014. Structuring osteosarcoma knowledge: an osteosarcoma-gene association database based on literature mining and manual annotation. *Database J. Biol. Databases Curation* 2014. <https://doi.org/10.1093/database/bau042>
- Pourdehnad, M., Truitt, M.L., Siddiqi, I.N., Ducker, G.S., Shokat, K.M., Ruggero, D., 2013. Myc and mTOR converge on a common node in protein synthesis control that confers synthetic lethality in Myc-driven cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11988–11993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310230110>
- Pudelko, L., Rouhi, P., Sanjiv, K., Gad, H., Kalderén, C., Höglund, A., Squatrito, M., Schuhmacher, A.J., Edwards, S., Hägerstrand, D., Berglund, U.W., Helleday, T., Bräutigam, L., 2017. Glioblastoma and glioblastoma stem cells are dependent on functional MTH1. *Oncotarget* 8, 84671–84684. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19404>
- Qing, X., Shao, Z., Lv, X., Pu, F., Gao, F., Liu, L., Shi, D., 2018. Anticancer effect of (S)-crizotinib on osteosarcoma cells by targeting MTH1 and activating reactive oxygen species. *Anticancer. Drugs* 29, 341–352. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000602>
- Rabindran, S.K., Haroun, R.I., Clos, J., Wisniewski, J., Wu, C., 1993. Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* 259, 230–234. <https://doi.org/10.1126/science.8421783>
- Raggatt, L.J., Partridge, N.C., 2010. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J. Biol. Chem.* 285, 25103–25108. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087>
- Rahmani, M., Davis, E.M., Crabtree, T.R., Habibi, J.R., Nguyen, T.K., Dent, P., Grant, S., 2007. The Kinase Inhibitor Sorafenib Induces Cell Death through a Process Involving Induction of Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5499–5513. <https://doi.org/10.1128/MCB.01080-06>
- Rai, P., Onder, T.T., Young, J.J., McFaline, J.L., Pang, B., Dedon, P.C., Weinberg, R.A., 2009a. Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 169–174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809834106>
- Rai, P., Onder, T.T., Young, J.J., McFaline, J.L., Pang, B., Dedon, P.C., Weinberg, R.A., 2009b. Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 169–174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809834106>
- Rai, P., Young, J.J., Burton, D.G.A., Giribaldi, M.G., Onder, T.T., Weinberg, R.A., 2010. Enhanced elimination of oxidized guanine nucleotides inhibits oncogenic RAS-induced DNA damage and premature senescence. *Oncogene* 30, 1489–1496.
- Raj, L., Ide, T., Gurkar, A.U., Foley, M., Schenone, M., Li, X., Tolliday, N.J., Golub, T.R., Carr, S.A., Shamji, A.F., Stern, A.M., Mandinova, A., Schreiber, S.L., Lee, S.W., 2011. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* 475, 231–234. <https://doi.org/10.1038/nature10167>

- Rajkumar, S.V., Richardson, P.G., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Greipp, P.R., Witzig, T.E., Schlossman, R., Sidor, C.F., Anderson, K.C., Gertz, M.A., 2007. Novel therapy with 2-methoxyestradiol for the treatment of relapsed and plateau phase multiple myeloma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 6162–6167. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0807>
- Ramesh, N., Moratti, S.C., Dias, G.J., 2018. Hydroxyapatite–polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 106, 2046–2057. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33950>
- Ramírez, F., Ryan, D.P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A.S., Heyne, S., Dündar, F., Manke, T., 2016. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W160–W165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>
- Rathi, A., Virmani, A.K., Harada, K., Timmons, C.F., Miyajima, K., Hay, R.J., Mastrangelo, D., Maitra, A., Tomlinson, G.E., Gazdar, A.F., 2003. Aberrant methylation of the HIC1 promoter is a frequent event in specific pediatric neoplasms. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 3674–3678.
- Raychaudhuri, S., Loew, C., Körner, R., Pinkert, S., Theis, M., Hayer-Hartl, M., Buchholz, F., Hartl, F.U., 2014. Interplay of Acetyltransferase EP300 and the Proteasome System in Regulating Heat Shock Transcription Factor 1. *Cell* 156, 975–985. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.055>
- Reithmeier, A., Panizza, E., Krumpel, M., Orre, L.M., Branca, R.M.M., Lehtiö, J., Ek-Rylander, B., Andersson, G., 2017. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP/ACP5) promotes metastasis-related properties via TGFβ2/TβR and CD44 in MDA-MB-231 breast cancer cells. *BMC Cancer* 17. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3616-7>
- Ren, D., Villeneuve, N.F., Jiang, T., Wu, T., Lau, A., Toppin, H.A., Zhang, D.D., 2011. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1433–1438. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014275108>
- Reva, B., Antipin, Y., Sander, C., 2011. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res.* 39, e118. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr407>
- Richter, K., Haslbeck, M., Buchner, J., 2010. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol. Cell* 40, 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>
- Rickel, K., Fang, F., Tao, J., 2017. Molecular genetics of osteosarcoma. *Bone* 102, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.10.017>
- Riek, R., Eisenberg, D.S., 2016. The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature* 539, 227–235. <https://doi.org/10.1038/nature20416>
- Ritossa, F., 1996. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1, 97–98.
- Ritossa, F., 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 18, 571–573. <https://doi.org/10.1007/BF02172188>
- Ritter, J., Bielack, S.S., 2010. Osteosarcoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 21 Suppl 7, vii320-325. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq276>
- Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T., Leiros, I., 2009. DNA Repair in Mammalian Cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 981–993. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8736-z>
- Rochefort, G.Y., Pallu, S., Benhamou, C.L., 2010a. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 21, 1457–1469. <https://doi.org/10.1007/s00198-010-1194-5>
- Rochefort, G.Y., Pallu, S., Benhamou, C.L., 2010b. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos. Int.* 21, 1457–1469. <https://doi.org/10.1007/s00198-010-1194-5>
- Rosen, G., Tan, C., Sanmaneechai, A., Beattie, E.J., Marcove, R., Murphy, M.L., 1975. The rationale for multiple drug chemotherapy in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer* 35, 936–945. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197503\)35:3<936::aid-cncr2820350714>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197503)35:3<936::aid-cncr2820350714>3.0.co;2-b)
- Rosset, E.M., Bradshaw, A.D., 2016. SPARC/Osteonectin in Mineralized Tissue. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 52–54, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.02.001>
- Roti, J.L.R., 2008. Cellular responses to hyperthermia (40–46°C): Cell killing and molecular events. *Int. J. Hyperthermia* 24, 3–15. <https://doi.org/10.1080/02656730701769841>
- Ruggero, D., 2013. Translational control in cancer etiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012336>
- Sabharwal, S.S., Schumacker, P.T., 2014. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* 14, 709–721. <https://doi.org/10.1038/nrc3803>
- Sadikovic, B., Thorner, P., Chilton-Macneill, S., Martin, J.W., Cervigne, N.K., Squire, J., Zielenska, M., 2010. Expression analysis of genes associated with human osteosarcoma tumors shows correlation of RUNX2 overexpression with poor response to chemotherapy. *BMC Cancer* 10, 202. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-202>
- Saju, J.M., Hossain, M.S., Liew, W.C., Pradhan, A., Thevasagayam, N.M., Tan, L.S.E., Anand, A., Olsson, P.-E., Orbán, L., 2018. Heat Shock Factor 5 Is Essential for Spermatogenesis in Zebrafish. *Cell Rep.* 25, 3252-3261.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.090>
- Salamanca, H.H., Antonyak, M.A., Cerione, R.A., Shi, H., Lis, J.T., 2014. Inhibiting Heat Shock Factor 1 in Human Cancer Cells with a Potent RNA Aptamer. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096330>
- Samarasinghe, B., Wales, C.T.K., Taylor, F.R., Jacobs, A.T., 2014. Heat shock factor 1 confers resistance to Hsp90 inhibitors through p62/SQSTM1 expression and promotion of autophagic flux. *Biochem. Pharmacol.* 87, 445–455. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.11.014>
- Sandqvist, A., Björk, J.K., Åkerfelt, M., Chitikova, Z., Grichine, A., Vourc'h, C., Jolly, C., Salminen, T.A., Nymalm, Y., Sistonen, L., 2009. Heterotrimerization of Heat-Shock Factors 1 and 2 Provides a Transcriptional Switch in Response to Distinct Stimuli. *Mol. Biol. Cell* 20, 1340–1347. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-08-0864>
- Santagata, S., Hu, R., Lin, N.U., Mendillo, M.L., Collins, L.C., Hankinson, S.E., Schnitt, S.J., Whitesell, L., Tamimi, R.M., Lindquist, S., Ince, T.A., 2011. High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18378–18383. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115031108>
- Santagata, S., Mendillo, M.L., Tang, Y., Subramanian, A., Perley, C.C., Roche, S.P., Wong, B., Narayan, R., Kwon, H., Koeva, M., Amon, A., Golub, T.R., Porco, J.A., Whitesell, L., Lindquist, S., 2013. Tight coordination of protein translation and HSF1 activation supports the anabolic malignant state. *Science* 341, 1238303. <https://doi.org/10.1126/science.1238303>
- Savage, S.A., Mirabello, L., Wang, Z., Gastier-Foster, J.M., Gorlick, R., Khanna, C., Flanagan, A.M., Tirabosco, R., Andrulis, I.L., Wunder, J.S., Gokgoz, N., Patiño-García, A., Sierrasesúmaga, L., Lecanda, F., Kurucu, N., Ilhan, I.E., Sari, N., Serra, M., Hattinger, C., Picci, P., Spector, L., Barkauskas, D.A., Marina, N., de Toledo, S.R.C., Petrilli, A.S., Amary, M.F., Halai, D., Thomas, D.M., Douglass, C.,

- Meltzer, P.S., Jacobs, K., Chung, C.C., Berndt, S.I., Purdue, M.P., Caporaso, N.E., Tucker, M., Rothman, N., Landi, M.T., Silverman, D.T., Kraft, P., Hunter, D.J., Malats, N., Kogevinas, M., Wacholder, S., Troisi, R., Helman, L., Fraumeni, J.F., Yeager, M., Hoover, R.N., Chanock, S.J., 2013. Genome-wide Association Study Identifies Two Susceptibility Loci for Osteosarcoma. *Nat. Genet.* 45, 799–803. <https://doi.org/10.1038/ng.2645>
- Savvidou, O.D., Bolia, I.K., Chloros, G.D., Papanastasiou, J., Koutsouradis, P., Papagelopoulos, P.J., 2017. Denosumab: Current Use in the Treatment of Primary Bone Tumors. *Orthopedics* 40, 204–210. <https://doi.org/10.3928/01477447-20170627-04>
- Scheel, C., Schaefer, K.L., Jauch, A., Keller, M., Wai, D., Brinkschmidt, C., van Valen, F., Boecker, W., Dockhorn-Dworniczak, B., Poremba, C., 2001. Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas. *Oncogene* 20, 3835–3844. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204493>
- Scherz-Shouval, R., Santagata, S., Mendillo, M.L., Sholl, L.M., Ben-Aharon, I., Beck, A.H., Dias-Santagata, D., Koeva, M., Stemmer, S.M., Whitesell, L., Lindquist, S., 2014. The reprogramming of tumor stroma by HSF1 is a potent enabler of malignancy. *Cell* 158, 564–578. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.045>
- Schopf, F.H., Biebl, M.M., Buchner, J., 2017. The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 345–360. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.20>
- Schwarz, R., Bruland, O., Cassoni, A., Schomberg, P., Bielack, S., 2009a. The role of radiotherapy in osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* 152, 147–164. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_7)
- Schwarz, R., Bruland, O., Cassoni, A., Schomberg, P., Bielack, S., 2009b. The role of radiotherapy in osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* 152, 147–164. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_7)
- Ségaliny, A.I., Tellez-Gabriel, M., Heymann, M.-F., Heymann, D., 2015. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *J. Bone Oncol.* 4, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2015.01.001>
- Semenza, G.L., 2012. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* 148, 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>
- Semenza, G.L., Wang, G.L., 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5447–5454.
- Serra, M., Hattinger, C.M., 2017. The pharmacogenomics of osteosarcoma. *Pharmacogenomics J.* 17, 11–20. <https://doi.org/10.1038/tpj.2016.45>
- Shaikh, A.B., Li, F., Li, M., He, B., He, X., Chen, G., Guo, B., Li, D., Jiang, F., Dang, L., Zheng, S., Liang, C., Liu, J., Lu, C., Liu, B., Lu, J., Wang, L., Lu, A., Zhang, G., 2016. Present Advances and Future Perspectives of Molecular Targeted Therapy for Osteosarcoma. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 506. <https://doi.org/10.3390/ijms17040506>
- Shao, Y.W., Wood, G.A., Lu, J., Tang, Q.-L., Liu, J., Molyneux, S., Chen, Y., Fang, H., Adissu, H., McKee, T., Waterhouse, P., Khokha, R., 2019. Cross-species genomics identifies DLG2 as a tumor suppressor in osteosarcoma. *Oncogene* 38, 291–298. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0444-4>
- Sharma, C., Seo, Y.H., 2018. Small Molecule Inhibitors of HSF1-Activated Pathways as Potential Next-Generation Anticancer Therapeutics. *Mol. Basel Switz.* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23112757>
- Sharpless, N.E., DePinho, R.A., 2002. p53: Good Cop/Bad Cop. *Cell* 110, 9–12. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00818-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00818-8)
- Shaw, R.J., Cantley, L.C., 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441, 424–430. <https://doi.org/10.1038/nature04869>
- Sheng, Z., Oka, S., Tsuchimoto, D., Abolhassani, N., Nomaru, H., Sakumi, K., Yamada, H., Nakabeppu, Y., 2012. 8-Oxoguanine causes neurodegeneration during MUTYH-mediated DNA base excision repair. *J. Clin. Invest.* 122, 4344–4361. <https://doi.org/10.1172/JCI65053>
- Shi, X., Mihaylova, V.T., Kuruvilla, L., Chen, F., Viviano, S., Baldassarre, M., Sperandio, D., Martinez, R., Yue, P., Bates, J.G., Breckenridge, D.G., Schlessinger, J., Turk, B.E., Calderwood, D.A., 2016. Loss of TRIM33 causes resistance to BET bromodomain inhibitors through MYC- and TGF- $\beta$ -dependent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E4558–E4566. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608319113>
- Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., Hirohashi, S., 2008. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13568–13573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806268105>
- Shimoda, L.A., Laurie, S.S., 2014. HIF and pulmonary vascular responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 116, 867–874. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00643.2013>
- Shimose, S., Kubo, T., Fujimori, J., Furuta, T., Ochi, M., 2014. A novel assessment method of serum alkaline phosphatase for the diagnosis of osteosarcoma in children and adolescents. *J. Orthop. Sci. Off. J. Jpn. Orthop. Assoc.* 19, 997–1003. <https://doi.org/10.1007/s00776-014-0617-0>
- Shimura-Miura, H., Hattori, N., Kang, D., Miyako, K., Nakabeppu, Y., Mizuno, Y., 1999. Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 46, 920–924.
- Shivaswamy, S., Iyer, V.R., 2008. Stress-Dependent Dynamics of Global Chromatin Remodeling in Yeast: Dual Role for SWI/SNF in the Heat Shock Stress Response. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2221–2234. <https://doi.org/10.1128/MCB.01659-07>
- Shuda, M., Kondoh, N., Imazeki, N., Tanaka, K., Okada, T., Mori, K., Hada, A., Arai, M., Wakatsuki, T., Matsubara, O., Yamamoto, N., Yamamoto, M., 2003. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* 38, 605–614. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(03\)00029-1](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(03)00029-1)
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Silvera, D., Formenti, S.C., Schneider, R.J., 2010. Translational control in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 254–266. <https://doi.org/10.1038/nrc2824>
- Simpson, E., Brown, H.L., 2018. Understanding osteosarcomas. *JAAPA Off. J. Am. Acad. Physician Assist.* 31, 15–19. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000541477.24116.8d>
- Simpson, S., Dunning, M.D., de Brot, S., Grau-Roma, L., Mongan, N.P., Rutland, C.S., 2017. Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. *Acta Vet. Scand.* 59. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0341-9>
- Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R.K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M.O., Herman, J.G., Baylin, S.B., Sidransky, D., Gabrielson, E., Brock, M.V., Biswal, S., 2006. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med.* 3, e420. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030420>

- Smida, J., Baumhoer, D., Rosemann, M., Walch, A., Bielack, S., Poremba, C., Remberger, K., Korsching, E., Scheurlen, W., Dierkes, C., Burdach, S., Jundt, G., Atkinson, M.J., Nathrath, M., 2010. Genomic alterations and allelic imbalances are strong prognostic predictors in osteosarcoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 4256–4267. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0284>
- Smith, H.L., Li, W., Cheetham, M.E., 2015. Molecular chaperones and neuronal proteostasis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 40, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.03.003>
- Smogorzewska, A., de Lange, T., 2004. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 177–208. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.071403.160049>
- Sohail, A., Sherin, L., Butt, S.I., Javed, S., Li, Z., Iqbal, S., Be'g, O.A., 2018. Role of key players in paradigm shifts of prostate cancer bone metastasis. *Cancer Manag. Res.* 10, 1619–1626. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S162525>
- Solís, E.J., Pandey, J.P., Zheng, X., Jin, D.X., Gupta, P.B., Airoidi, E.M., Pincus, D., Denic, V., 2016. Defining the Essential Function of Yeast Hsf1 Reveals a Compact Transcriptional Program for Maintaining Eukaryotic Proteostasis. *Mol. Cell* 63, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.014>
- Solis, L.M., Behrens, C., Dong, W., Suraokar, M., Ozburn, N.C., Moran, C.A., Corvalan, A.H., Biswal, S., Swisher, S.G., Bekele, B.N., Minna, J.D., Stewart, D.J., Wistuba, I.I., 2010. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 3743–3753. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3352>
- Song, B., Wang, Y., Xi, Y., Kudo, K., Bruheim, S., Botchkina, G.I., Gavin, E., Wan, Y., Formentini, A., Kornmann, M., Fodstad, O., Ju, J., 2009. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene* 28, 4065–4074. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.274>
- Song, S., Kole, S., Precht, P., Pazin, M.J., Bernier, M., 2010. Activation of heat shock factor 1 plays a role in pyrrolidine dithiocarbamate-mediated expression of the co-chaperone BAG3. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1856–1863. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.07.021>
- Sorger, P.K., Pelham, H.R., 1988. Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54, 855–864.
- Squire, J.A., Pei, J., Marrano, P., Beheshti, B., Bayani, J., Lim, G., Moldovan, L., Zielenska, M., 2003. High-resolution mapping of amplifications and deletions in pediatric osteosarcoma by use of CGH analysis of cDNA microarrays. *Genes. Chromosomes Cancer* 38, 215–225. <https://doi.org/10.1002/gcc.10273>
- Stefanatos, R., Sanz, A., 2018. The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Lett.* 592, 743–758. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12902>
- Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mittnacht, S., Bartek, J., Eilers, M., 1995. Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *EMBO J.* 14, 4814–4826.
- Stephanou, A., Amin, V., Isenberg, D.A., Akira, S., Kishimoto, T., Latchman, D.S., 1997. Interleukin 6 activates heat-shock protein 90 beta gene expression. *Biochem. J.* 321, 103–106.
- Stephanou, A., Isenberg, D.A., Akira, S., Kishimoto, T., Latchman, D.S., 1998. The nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6) and signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) signalling pathways co-operate to mediate the activation of the hsp90beta gene by interleukin-6 but have opposite effects on its inducibility by heat shock. *Biochem. J.* 330 ( Pt 1), 189–195. <https://doi.org/10.1042/bj3300189>
- Stephanou, A., Isenberg, D.A., Nakajima, K., Latchman, D.S., 1999. Signal transducer and activator of transcription-1 and heat shock factor-1 interact and activate the transcription of the Hsp-70 and Hsp-90beta gene promoters. *J. Biol. Chem.* 274, 1723–1728. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1723>
- Stephanou, A., Latchman, D.S., 2011. Transcriptional Modulation of Heat-Shock Protein Gene Expression [WWW Document]. *Biochem. Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2011/238601>
- Stiller, C.A., Bielack, S.S., Jundt, G., Steliarova-Foucher, E., 2006. Bone tumours in European children and adolescents, 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 42, 2124–2135. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.05.015>
- Stojanovic, N., Hassan, Z., Wirth, M., Wenzel, P., Beyer, M., Schäfer, C., Brand, P., Kroemer, A., Stauber, R.H., Schmid, R.M., Arlt, A., Sellmer, A., Mahboobi, S., Rad, R., Reichert, M., Saur, D., Krämer, O.H., Schneider, G., 2017. HDAC1 and HDAC2 integrate the expression of p53 mutants in pancreatic cancer. *Oncogene* 36, 1804–1815. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.344>
- Stopeck, A.T., Lipton, A., Body, J.-J., Steger, G.G., Tonkin, K., de Boer, R.H., Lichinitser, M., Fujiwara, Y., Yardley, D.A., Viniegra, M., Fan, M., Jiang, Q., Dansey, R., Jun, S., Braun, A., 2010. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 5132–5139. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.29.7101>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., Mesirov, J.P., 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Supko, J.G., Hickman, R.L., Grever, M.R., Malspeis, L., 1995. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 36, 305–315. <https://doi.org/10.1007/BF00689048>
- Tabas, I., Ron, D., 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 184–190. <https://doi.org/10.1038/ncb0311-184>
- Taguchi, K., Yamamoto, M., 2017. The KEAP1–NRF2 System in Cancer. *Front. Oncol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00085>
- Takahashi, T., Sonobe, M., Menju, T., Nakayama, E., Mino, N., Iwakiri, S., Nagai, S., Sato, K., Miyahara, R., Okubo, K., Hirata, T., Date, H., Wada, H., 2010. Mutations in Keap1 are a potential prognostic factor in resected non-small cell lung cancer. *J. Surg. Oncol.* 101, 500–506. <https://doi.org/10.1002/jso.21520>
- Takii, R., Fujimoto, M., Tan, K., Takaki, E., Hayashida, N., Nakato, R., Shirahige, K., Nakai, A., 2015. ATF1 modulates the heat shock response by regulating the stress-inducible heat shock factor 1 transcription complex. *Mol. Cell. Biol.* 35, 11–25. <https://doi.org/10.1128/MCB.00754-14>
- Tang, D., Khaleque, M.A., Jones, E.L., Theriault, J.R., Li, C., Wong, W.H., Stevenson, M.A., Calderwood, S.K., 2005. Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. *Cell Stress Chaperones* 10, 46–58.

- Tchério, T., Havard, M., Martinez, L.A., Dautry, F., 2006. Heat Shock-Independent Induction of Multidrug Resistance by Heat Shock Factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 580–591. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.2.580-591.2006>
- Teitelbaum, S.L., 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504–1508. <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1504>
- Tessari, A., Salata, E., Ferlin, A., Bartoloni, L., Slongo, M.L., Foresta, C., 2004. Characterization of HSFY, a novel AZFb gene on the Y chromosome with a possible role in human spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 253–258. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah036>
- Thoenen, E., Curl, A., Iwakuma, T., 2019. TP53 in bone and soft tissue sarcomas. *Pharmacol. Ther.* 202, 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.06.010>
- Thuringer, D., Jegou, G., Wettstein, G., Terrier, O., Cronier, L., Yousfi, N., Hébrard, S., Bouchot, A., Hazoumé, A., Joly, A.-L., Gleave, M., Rosa-Calatrava, M., Solary, E., Garrido, C., 2013. Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 4169–4183. <https://doi.org/10.1096/fj.12-226977>
- Tobey, N.A., Sikka, D., Marten, E., Caymaz-Bor, C., Hosseini, S.S., Orlando, R.C., 1999. Effect of heat stress on rabbit esophageal epithelium. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 276, G1322–G1330. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.6.G1322>
- Toguchida, J., Ishizaki, K., Sasaki, M.S., Ikenaga, M., Sugimoto, M., Kotoura, Y., Yamamuro, T., 1988. Chromosomal reorganization for the expression of recessive mutation of retinoblastoma susceptibility gene in the development of osteosarcoma. *Cancer Res.* 48, 3939–3943.
- Toguchida, J., Yamaguchi, T., Dayton, S.H., Beauchamp, R.L., Herrera, G.E., Ishizaki, K., Yamamuro, T., Meyers, P.A., Little, J.B., Sasaki, M.S., 1992. Prevalence and spectrum of germline mutations of the p53 gene among patients with sarcoma. *N. Engl. J. Med.* 326, 1301–1308. <https://doi.org/10.1056/NEJM199205143262001>
- Toma-Jonik, A., Widlak, W., Korfanty, J., Cichon, T., Smolarczyk, R., Gogler-Pigłowska, A., Widlak, P., Vydra, N., 2015. Active heat shock transcription factor 1 supports migration of the melanoma cells via vinculin down-regulation. *Cell. Signal.* 27, 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.11.029>
- Tonelli, C., Chio, I.I.C., Tuveson, D.A., 2018. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>
- Tormos, K.V., Anso, E., Hamanaka, R.B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Chandel, N.S., 2011. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab.* 14, 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.007>
- Török, Z., Crul, T., Maresca, B., Schütz, G.J., Viana, F., Dindia, L., Piotto, S., Brameshuber, M., Balogh, G., Péter, M., Porta, A., Trapani, A., Gombos, I., Glatz, A., Gungor, B., Peksel, B., Vigh, L., Csoboz, B., Horváth, I., Vijayan, M.M., Hooper, P.L., Harwood, J.L., Vigh, L., 2014. Plasma membranes as heat stress sensors: From lipid-controlled molecular switches to therapeutic applications. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., Membrane Structure and Function: Relevance in the Cell's Physiology, Pathology and Therapy* 1838, 1594–1618. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2013.12.015>
- Toth, R.K., Warfel, N.A., 2017. Strange Bedfellows: Nuclear Factor, Erythroid 2-Like 2 (Nrf2) and Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) in Tumor Hypoxia. *Antioxidants* 6. <https://doi.org/10.3390/antiox6020027>
- Travlos, G.S., 2006. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicol. Pathol.* 34, 548–565. <https://doi.org/10.1080/01926230600939856>
- Tretiakova, I., Blaesus, D., Maxia, L., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., Cinatl, J., Michaelis, M., Werz, O., 2008. Myrtucommulone from *Myrtus communis* induces apoptosis in cancer cells via the mitochondrial pathway involving caspase-9. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 13, 119–131. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0150-0>
- Trieb, K., Windhager, R., 2015. Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B expression is a prognostic factor in human osteosarcoma. *Oncol. Lett.* 10, 1813–1815. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3489>
- Trinklein, N.D., Murray, J.L., Hartman, S.J., Botstein, D., Myers, R.M., 2003. The Role of Heat Shock Transcription Factor 1 in the Genome-wide Regulation of the Mammalian Heat Shock Response. *Mol. Biol. Cell* 15, 1254–1261. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-10-0738>
- Troisi, R., Masters, M.N., Joshipura, K., Douglass, C., Cole, B.F., Hoover, R.N., 2006. Perinatal factors, growth and development, and osteosarcoma risk. *Br. J. Cancer* 95, 1603–1607. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603474>
- Tsuchida, K., Tsujita, T., Hayashi, M., Ojima, A., Keleku-Lukwete, N., Katsuoka, F., Otsuki, A., Kikuchi, H., Oshima, Y., Suzuki, M., Yamamoto, M., 2017. Halofuginone enhances the chemo-sensitivity of cancer cells by suppressing NRF2 accumulation. *Free Radic. Biol. Med.* 103, 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.041>
- Tsuzuki, T., Egashira, A., Kura, S., 2001. Analysis of MTH1 gene function in mice with targeted mutagenesis. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen., Analysis and Prevention of Carcinogenesis in Animal Models* 477, 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00108-7)
- Unger, V.M., Kumar, N.M., Gilula, N.B., Yeager, M., 1999. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283, 1176–1180. <https://doi.org/10.1126/science.283.5405.1176>
- van Dartel, M., Cornelissen, P.W.A., Redeker, S., Tarkkanen, M., Knuutila, S., Hogendoorn, P.C.W., Westerveld, A., Gomes, I., Bras, J., Hulsebos, T.J.M., 2002. Amplification of 17p11.2 approximately p12, including PMP22, TOP3A, and MAPK7, in high-grade osteosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 139, 91–96.
- van Harn, T., Foijer, F., van Vugt, M., Banerjee, R., Yang, F., Oostra, A., Joenje, H., te Riele, H., 2010a. Loss of Rb proteins causes genomic instability in the absence of mitogenic signaling. *Genes Dev.* 24, 1377–1388. <https://doi.org/10.1101/gad.580710>
- van Harn, T., Foijer, F., van Vugt, M., Banerjee, R., Yang, F., Oostra, A., Joenje, H., te Riele, H., 2010b. Loss of Rb proteins causes genomic instability in the absence of mitogenic signaling. *Genes Dev.* 24, 1377–1388. <https://doi.org/10.1101/gad.580710>
- Vartanian, S., Ma, T.P., Lee, J., Haverty, P.M., Kirkpatrick, D.S., Yu, K., Stokoe, D., 2016. Application of Mass Spectrometry Profiling to Establish Brusatol as an Inhibitor of Global Protein Synthesis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 15, 1220–1231. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.055509>
- Vartholomaiou, E., Echeverría, P.C., Picard, D., 2016. Unusual Suspects in the Twilight Zone Between the Hsp90 Interactome and Carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* 129, 1–30. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.08.001>
- Vasilaki, A., Richardson, A., Van Remmen, H., Brooks, S.V., Larkin, L., McArdle, A., Jackson, M.J., 2017. Role of nerve–muscle interactions and reactive oxygen species in regulation of muscle proteostasis with ageing. *J. Physiol.* 595, 6409–6415. <https://doi.org/10.1113/JP274336>
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P., Delmas, P.D., 2006. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos. Int.* 17, 319–336. <https://doi.org/10.1007/s00198-005-2035-9>

- Vihervaara, A., Mahat, D.B., Guertin, M.J., Chu, T., Danko, C.G., Lis, J.T., Sistonen, L., 2017. Transcriptional response to stress is pre-wired by promoter and enhancer architecture. *Nat. Commun.* 8, 255. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00151-0>
- Vihervaara, A., Sergelius, C., Vasara, J., Blom, M.A.H., Elsing, A.N., Roos-Mattjus, P., Sistonen, L., 2013. Transcriptional response to stress in the dynamic chromatin environment of cycling and mitotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E3388–E3397. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305275110>
- Vilaboa, N., Boré, A., Martin-Saavedra, F., Bayford, M., Winfield, N., Firth-Clark, S., Kirton, S.B., Voellmy, R., 2017. New inhibitor targeting human transcription factor HSF1: effects on the heat shock response and tumor cell survival. *Nucleic Acids Res.* 45, 5797–5817. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx194>
- Vilaboa, N.E., Galán, A., Troyano, A., Blas, E. de, Aller, P., 2000. Regulation of Multidrug Resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein Gene Expression and Activity by Heat-Shock Transcription Factor 1 (HSF1). *J. Biol. Chem.* 275, 24970–24976. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909136199>
- Vincent, D.F., Gout, J., Chuvin, N., Arfi, V., Pommier, R.M., Bertolino, P., Jonckheere, N., Ripoche, D., Kaniewski, B., Martel, S., Langlois, J.-B., Goddard-Léon, S., Colombe, A., Janier, M., Van Seuning, I., Losson, R., Valcourt, U., Treilleux, I., Dubus, P., Bardeesy, N., Bartholin, L., 2012. Tif1y suppresses murine pancreatic tumoral transformation by a Smad4-independent pathway. *Am. J. Pathol.* 180, 2214–2221. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.006>
- Vincent, D.F., Yan, K.-P., Treilleux, I., Gay, F., Arfi, V., Kaniewski, B., Kaniewsky, B., Marie, J.C., Lepinasse, F., Martel, S., Goddard-Leon, S., Iovanna, J.L., Dubus, P., Garcia, S., Puisieux, A., Rimokh, R., Bardeesy, N., Scoazec, J.-Y., Losson, R., Bartholin, L., 2009. Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet.* 5, e1000575. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000575>
- Virrey, J.J., Dong, D., Stiles, C., Patterson, J.B., Pen, L., Ni, M., Schönthal, A.H., Chen, T.C., Hofman, F.M., Lee, A.S., 2008. Stress chaperone GRP78/BIP confers chemoresistance to tumor-associated endothelial cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 6, 1268–1275. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0060>
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Kinzler, K.W., 2013. Cancer Genome Landscapes. *Science* 339, 1546–1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>
- Volodina, O., Ganesan, S., Pearce, S.C., Gabler, N.K., Baumgard, L.H., Rhoads, R.P., Selsby, J.T., 2017. Short-term heat stress alters redox balance in porcine skeletal muscle. *Physiol. Rep.* 5. <https://doi.org/10.14814/phy2.13267>
- Vydra, N., Toma, A., Glowala-Kosinska, M., Gogler-Pigłowska, A., Widlak, W., 2013. Overexpression of heat shock transcription factor 1 enhances the resistance of melanoma cells to doxorubicin and paclitaxel. *BMC Cancer* 13, 504. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-504>
- Wander, S.A., Hennessy, B.T., Slingerland, J.M., 2011. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J. Clin. Invest.* 121, 1231–1241. <https://doi.org/10.1172/JCI44145>
- Wang, B., Lee, C.-W., Witt, A., Thakkar, A., Ince, T.A., 2015. Heat shock factor 1 induces cancer stem cell phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 153, 57–66. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3521-1>
- Wang, E., Kawaoka, S., Roe, J.-S., Shi, J., Hohmann, A.F., Xu, Y., Bhagwat, A.S., Suzuki, Y., Kinney, J.B., Vakoc, C.R., 2015. The transcriptional cofactor TRIM33 prevents apoptosis in B lymphoblastic leukemia by deactivating a single enhancer. *eLife* 4, e06377. <https://doi.org/10.7554/eLife.06377>
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L., 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5510–5514. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510>
- Wang, W., Xia, X., Mao, L., Wang, S., 2019. The CCAAT/Enhancer-Binding Protein Family: Its Roles in MDSC Expansion and Function. *Front. Immunol.* 10, 1804. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01804>
- Wang, X., Grammatikakis, N., Siganou, A., Calderwood, S.K., 2003. Regulation of Molecular Chaperone Gene Transcription Involves the Serine Phosphorylation, 14-3-3ε Binding, and Cytoplasmic Sequestration of Heat Shock Factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6013–6026. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.17.6013-6026.2003>
- Wang, X., Khaleque, M.A., Zhao, M.J., Zhong, R., Gaestel, M., Calderwood, S.K., 2006. Phosphorylation of HSF1 by MAPK-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding. *J. Biol. Chem.* 281, 782–791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505822200>
- Wang, Y., Alam, G.N., Ning, Y., Visioli, F., Dong, Z., Nör, J.E., Polverini, P.J., 2012. The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway. *Cancer Res.* 72, 5396–5406. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0474>
- Warpman Berglund, U., Sanjiv, K., Gad, H., Kalderén, C., Koolmeister, T., Pham, T., Gokturk, C., Jafari, R., Maddalo, G., Seashore-Ludlow, B., Chernobrovkin, A., Manoilov, A., Pateras, I.S., Rasti, A., Jemth, A.-S., Almlöf, I., Loseva, O., Visnes, T., Einarsdóttir, B.O., Gaugaz, F.Z., Saleh, A., Platzack, B., Wallner, O.A., Vallin, K.S.A., Henriksson, M., Wakchaure, P., Borhade, S., Herr, P., Kallberg, Y., Baranczewski, P., Homan, E.J., Wiita, E., Nagpal, V., Meijer, T., Schipper, N., Rudd, S.G., Bräutigam, L., Lindqvist, A., Filppula, A., Lee, T.-C., Artursson, P., Nilsson, J.A., Gorgoulis, V.G., Lehtiö, J., Zubarev, R.A., Scobie, M., Helleday, T., 2016a. Validation and development of MTH1 inhibitors for treatment of cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 27, 2275–2283. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw429>
- Warpman Berglund, U., Sanjiv, K., Gad, H., Kalderén, C., Koolmeister, T., Pham, T., Gokturk, C., Jafari, R., Maddalo, G., Seashore-Ludlow, B., Chernobrovkin, A., Manoilov, A., Pateras, I.S., Rasti, A., Jemth, A.-S., Almlöf, I., Loseva, O., Visnes, T., Einarsdóttir, B.O., Gaugaz, F.Z., Saleh, A., Platzack, B., Wallner, O.A., Vallin, K.S.A., Henriksson, M., Wakchaure, P., Borhade, S., Herr, P., Kallberg, Y., Baranczewski, P., Homan, E.J., Wiita, E., Nagpal, V., Meijer, T., Schipper, N., Rudd, S.G., Bräutigam, L., Lindqvist, A., Filppula, A., Lee, T.-C., Artursson, P., Nilsson, J.A., Gorgoulis, V.G., Lehtiö, J., Zubarev, R.A., Scobie, M., Helleday, T., 2016b. Validation and development of MTH1 inhibitors for treatment of cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 27, 2275–2283. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw429>
- Watson, M., Holman, D.M., Maguire-Eisen, M., 2016. Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk. *Semin. Oncol. Nurs.* 32, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2016.05.005>
- Weindling, E., Bar-Nun, S., 2015. Sir2 links the unfolded protein response and the heat shock response in a stress response network. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.021>
- Weiss, M.B., Vitolo, M.L., Mohseni, M., Rosen, D.M., Denmeade, S.R., Park, B.H., Weber, D.J., Bachman, K.E., 2010a. Deletion of p53 in human mammary epithelial cells causes chromosomal instability and altered therapeutic response. *Oncogene* 29, 4715–4724. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.220>

- Weiss, M.B., Vitolo, M.I., Mohseni, M., Rosen, D.M., Denmeade, S.R., Park, B.H., Weber, D.J., Bachman, K.E., 2010b. Deletion of p53 in human mammary epithelial cells causes chromosomal instability and altered therapeutic response. *Oncogene* 29, 4715–4724. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.220>
- Westerheide, S.D., Ankar, J., Stevens, S.M., Sistonen, L., Morimoto, R.I., 2009. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323, 1063–1066. <https://doi.org/10.1126/science.1165946>
- Westerheide, S.D., Kawahara, T.L.A., Orton, K., Morimoto, R.I., 2006. Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 281, 9616–9622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512044200>
- Westwood, J.T., Wu, C., 1993. Activation of Drosophila heat shock factor: conformational change associated with a monomer-to-trimer transition. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3481–3486. <https://doi.org/10.1128/MCB.13.6.3481>
- Whitesell, L., Lindquist, S., 2009a. Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 469–478. <https://doi.org/10.1517/14728220902832697>
- Whitesell, L., Lindquist, S., 2009b. Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 469–478. <https://doi.org/10.1517/14728220902832697>
- Widlak, W., Vydra, N., 2017. The Role of Heat Shock Factors in Mammalian Spermatogenesis. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 222, 45–65. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-51409-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-51409-3_3)
- Wiechmann, K., Müller, H., König, S., Wielsch, N., Svatoš, A., Jauch, J., Werz, O., 2017. Mitochondrial Chaperonin HSP60 Is the Apoptosis-Related Target for Myrtilone. *Cell Chem. Biol.* 24, 614–623.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.04.008>
- Wilkening, A., Rüb, C., Sylvester, M., Voos, W., 2018. Analysis of heat-induced protein aggregation in human mitochondria. *J. Biol. Chem.* 293, 11537–11552. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002122>
- Wong, R.S., Kapp, L.N., Krishnaswamy, G., Dewey, W.C., 1993. Critical steps for induction of chromosomal aberrations in CHO cells heated in S phase. *Radiat. Res.* 133, 52–59.
- Wu, Q., Lian, J.B., Stein, J.L., Stein, G.S., Nickerson, J.A., Imbalzano, A.N., 2017. The BRG1 ATPase of human SWI/SNF chromatin remodeling enzymes as a driver of cancer. *Epigenomics* 9, 919–931. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0034>
- Wu, X., Shi, W., Cao, X., 2007. Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1116, 29–49. <https://doi.org/10.1196/annals.1402.053>
- Wu, Y.S., Chung, I., Wong, W.F., Masamune, A., Sim, M.S., Looi, C.Y., 2017. Paracrine IL-6 signaling mediates the effects of pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition via Stat3/Nrf2 pathway in pancreatic cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1861, 296–306. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.006>
- Xia, L.-M., Huang, W.-J., Wang, B., Liu, M., Zhang, Q., Yan, W., Zhu, Q., Luo, M., Zhou, Z.-Z., Tian, D.-A., 2009. Transcriptional up-regulation of FoxM1 in response to hypoxia is mediated by HIF-1. *J. Cell. Biochem.* 106, 247–256. <https://doi.org/10.1002/jcb.21996>
- Xiang, Y., Ye, W., Huang, C., Lou, B., Zhang, J., Yu, D., Huang, X., Chen, B., Zhou, M., 2017. Brusatol inhibits growth and induces apoptosis in pancreatic cancer cells via JNK/p38 MAPK/NF- $\kappa$ B/Stat3/Bcl-2 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 487, 820–826. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.133>
- Xiao, H., Perisic, O., Lis, J.T., 1991. Cooperative binding of Drosophila heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit. *Cell* 64, 585–593.
- Xiao, X., Wang, W., Li, Y., Yang, D., Li, X., Shen, C., Liu, Y., Ke, X., Guo, Z., Guo, Z., 2018. HSP90AA1-mediated autophagy promotes drug resistance in osteosarcoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 37, 201. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0880-6>
- Xiao, X., Zuo, X., Davis, A.A., McMillan, D.R., Curry, B.B., Richardson, J.A., Benjamin, I.J., 1999. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J.* 18, 5943–5952. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.5943>
- Xiong, W., MacColl Garfinkel, A.E., Li, Y., Benowitz, L.I., Cepko, C.L., 2015. NRF2 promotes neuronal survival in neurodegeneration and acute nerve damage. *J. Clin. Invest.* 125, 1433–1445. <https://doi.org/10.1172/JCI79735>
- Xue, J., Chen, Y., Wu, Y., Wang, Z., Zhou, A., Zhang, S., Lin, K., Aldape, K., Majumder, S., Lu, Z., Huang, S., 2015. Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear  $\beta$ -catenin degradation. *Nat. Commun.* 6, 6156. <https://doi.org/10.1038/ncomms7156>
- Yamaguchi, H., Kajitani, K., Dan, Y., Furuichi, M., Ohno, M., Sakumi, K., Kang, D., Nakabeppu, Y., 2006. MTH1, an oxidized purine nucleoside triphosphatase, protects the dopamine neurons from oxidative damage in nucleic acids caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Cell Death Differ.* 13, 551–563. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401788>
- Yamaguchi, T., Toguchida, J., Yamamuro, T., Kotoura, Y., Takada, N., Kawaguchi, N., Kaneko, Y., Nakamura, Y., Sasaki, M.S., Ishizaki, K., 1992. Allelotype analysis in osteosarcomas: frequent allele loss on 3q, 13q, 17p, and 18q. *Cancer Res.* 52, 2419–2423.
- Yan, H.P., Roberts, L.J., Davies, S.S., Pohlmann, P., Parl, F., Estes, S., Maeng, J., Parker, B., Mernaugh, R., 2017. Isolevuglandins as a Gauge of Lipid Peroxidation in Human Tumors. *Free Radic. Biol. Med.* 106, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.020>
- Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H.C., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T.M., Hanauer, A., Karsenty, G., 2004. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 117, 387–398.
- Yang, Y., Wang, B., 2018. PTH1R-CaSR Cross Talk: New Treatment Options for Breast Cancer Osteolytic Bone Metastases. *Int. J. Endocrinol.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7120979>
- Yasui, H., Sakurai, H., 2000. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 131–136. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2254>
- Yokota, S., Kitahara, M., Nagata, K., 2000. Benzylidene lactam compound, KNK437, a novel inhibitor of acquisition of thermotolerance and heat shock protein induction in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 60, 2942–2948.
- Yoon, Y.J., Kim, J.A., Shin, K.D., Shin, D.-S., Han, Y.M., Lee, Y.J., Lee, J.S., Kwon, B.-M., Han, D.C., 2011. KRIBB11 inhibits HSP70 synthesis through inhibition of heat shock factor 1 function by impairing the recruitment of positive transcription elongation factor b to the hsp70 promoter. *J. Biol. Chem.* 286, 1737–1747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.179440>
- Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L.D., Nishikawa, S., 1990. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442–444. <https://doi.org/10.1038/345442a0>
- Yoshimura, D., Sakumi, K., Ohno, M., Sakai, Y., Furuichi, M., Iwai, S., Nakabeppu, Y., 2003. An oxidized purine nucleoside triphosphatase, MTH1, suppresses cell death caused by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 278, 37965–37973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306201200>
- Yotov, W.V., Moreau, A., St-Arnaud, R., 1998. The Alpha Chain of the Nascent Polypeptide-Associated Complex Functions as a Transcriptional Coactivator. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1303–1311. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.3.1303>

- Yu, G., Wang, L.-G., He, Q.-Y., 2015. ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 31, 2382–2383. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv145>
- Yu, T., Tang, B., Sun, X., 2017. Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. *Yonsei Med. J.* 58, 489–496. <https://doi.org/10.3349/ymj.2017.58.3.489>
- Zanini, C., Giribaldi, G., Mandili, G., Carta, F., Crescenzo, N., Bisaro, B., Doria, A., Foglia, L., di Montezemolo, L.C., Timeus, F., Turrini, F., 2007. Inhibition of heat shock proteins (HSP) expression by quercetin and differential doxorubicin sensitization in neuroblastoma and Ewing's sarcoma cell lines. *J. Neurochem.* 103, 1344–1354. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04835.x>
- Zavattari, P., Perra, A., Menegon, S., Kowalik, M.A., Petrelli, A., Angioni, M.M., Follenzi, A., Quagliata, L., Ledda-Columbano, G.M., Terracciano, L., Giordano, S., Columbano, A., 2015. Nrf2, but not  $\beta$ -catenin, mutation represents an early event in rat hepatocarcinogenesis. *Hepatol. Baltim. Md* 62, 851–862. <https://doi.org/10.1002/hep.27790>
- Zhang, C., Wang, H.-J., Bao, Q.-C., Wang, L., Guo, T.-K., Chen, W.-L., Xu, L.-L., Zhou, H.-S., Bian, J.-L., Yang, Y.-R., Sun, H.-P., Xu, X.-L., You, Q.-D., 2016. NRF2 promotes breast cancer cell proliferation and metastasis by increasing RhoA/ROCK pathway signal transduction. *Oncotarget* 7, 73593–73606. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12435>
- Zhang, D., Zhang, B., 2016. Selective killing of cancer cells by small molecules targeting heat shock stress response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478, 1509–1514. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.108>
- Zhang, M., Zhang, C., Zhang, L., Yang, Q., Zhou, S., Wen, Q., Wang, J., 2015. Nrf2 is a potential prognostic marker and promotes proliferation and invasion in human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 15, 531. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1541-1>
- Zhang, P., Singh, A., Yegnasubramanian, S., Esopi, D., Kombairaju, P., Bodas, M., Wu, H., Bova, S.G., Biswal, S., 2010. Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* 9, 336–346. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0589>
- Zhang, T., Huang, Y., Liu, W., Meng, W., Zhao, H., Yang, Q., Gu, S.-J., Xiao, C.-C., Jia, C.-C., Zhang, B., Zou, Y., Li, H.-P., Fu, B.-S., 2017. Overexpression of zinc finger protein 687 enhances tumorigenic capability and promotes recurrence of hepatocellular carcinoma. *Oncogenesis* 6, e363. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.63>
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoutte, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., Liu, X.S., 2008. Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* 9, R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>
- Zhang, Y., Tang, Y.-J., Man, Y., Pan, F., Li, Z.-H., Jia, L.-S., 2013. Knockdown of AXL receptor tyrosine kinase in osteosarcoma cells leads to decreased proliferation and increased apoptosis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 26, 179–188. <https://doi.org/10.1177/039463201302600117>
- Zhao, H., Yu, Z., Zhao, L., He, M., Ren, J., Wu, H., Chen, Q., Yao, W., Wei, M., 2016. HDAC2 overexpression is a poor prognostic factor of breast cancer patients with increased multidrug resistance-associated protein expression who received anthracyclines therapy. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 46, 893–902. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyw096>
- Zhao, S.-J., Guo, S.-N., Zhu, Q.-L., Yuan, S.-S., Zheng, J.-L., 2018. Heat-induced oxidative stress and inflammation involve in cadmium pollution history in the spleen of zebrafish. *Fish Shellfish Immunol.* 72, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.077>
- Zhou, J., Schmid, T., Schnitzer, S., Brüne, B., 2006. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett.* 237, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.05.028>
- Zhou, P., Xiao, N., Wang, Jian, Wang, Z., Zheng, S., Shan, S., Wang, Jianping, Du, J., Wang, Jianwei, 2017. SMC1A recruits tumor-associated-fibroblasts (TAFs) and promotes colorectal cancer metastasis. *Cancer Lett.* 385, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.10.041>
- Zhou, Q., Deng, Z., Zhu, Y., Long, H., Zhang, S., Zhao, J., 2010. mTOR/p70S6K signal transduction pathway contributes to osteosarcoma progression and patients' prognosis. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 27, 1239–1245. <https://doi.org/10.1007/s12032-009-9365-y>
- Zhou, W., Ma, L., Yang, J., Qiao, H., Li, L., Guo, Q., Ma, J., Zhao, L., Wang, J., Jiang, G., Wan, X., Adam Goscinski, M., Ding, L., Zheng, Y., Li, W., Liu, H., Suo, Z., Zhao, W., 2019. Potent and specific MTH1 inhibitors targeting gastric cancer. *Cell Death Dis.* 10, 434. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1665-3>
- Zhou, X., Wei, M., Wang, W., 2013. MicroRNA-340 suppresses osteosarcoma tumor growth and metastasis by directly targeting ROCK1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437, 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.033>
- Zhou, Z., Li, Y., Jia, Q., Wang, Z., Wang, X., Hu, J., Xiao, J., 2017. Heat shock transcription factor 1 promotes the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells. *Cell Prolif.* <https://doi.org/10.1111/cpr.12346>
- Zoncu, R., Efeyan, A., Sabatini, D.M., 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 21–35. <https://doi.org/10.1038/nrm3025>
- Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F., Voellmy, R., 1998. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471–480.
- Zou, Z., Chang, H., Li, H., Wang, S., 2017. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 22, 1321–1335. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1424-9>



**Titre :** Ciblage thérapeutique de la réponse au stress cellulaire dans l'Ostéosarcome

**Mots clés :** Ostéosarcome, Stress cellulaire, HSF1, MTH1

**Résumé :** L'ostéosarcome (OS) est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes. C'est une pathologie rare qui affecte principalement les individus jeunes. Les traitements actuels consistent à combiner chimiothérapie et chirurgie, permettant d'obtenir des taux de survie à 5 ans de 70%. Cependant, ces taux chutent à 20% pour les mauvais répondeurs et en cas de métastases. Malgré les optimisations de protocoles, les molécules utilisées sont limitées en termes d'efficacité et de toxicité. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques. La forte hétérogénéité de l'OS rend cependant difficile la recherche de thérapies efficaces et la prévention de mécanismes de résistance. Le ciblage de caractéristiques partagées uniquement par les cellules tumorales apparaît donc comme une stratégie prometteuse, permettant de réduire l'émergence de résistance tout en épargnant les cellules saines.

L'un des points communs à toutes les cellules tumorales est qu'elles sont soumises à des stress cellulaires constants, dus à un métabolisme accéléré soutenant une prolifération rapide. Ces cellules sont de ce fait dépendantes des mécanismes de défense contre le stress. Le but de ma thèse est de définir l'intérêt d'un ciblage thérapeutique des moyens de défense de la cellule tumorale contre le stress. Deux cibles sont étudiées : HSF1, le facteur de transcription majeur de la réponse au stress, et l'enzyme MTH1, gardienne de l'intégrité génomique contre le stress oxydatif. Ces études visent à comprendre l'implication de ces protéines dans le développement et la progression de l'OS, via notamment leur inhibition dans des modèles tumoraux *in vitro* et *in vivo*.

**Title :** Therapeutic targeting of cellular stress response in Osteosarcoma

**Keywords :** Osteosarcoma, Cellular stress, HSF1, MTH1

**Abstract :** Osteosarcoma (OS) is the most common primary bone tumor. It is a rare pathology mainly affecting children and young adults. Current treatments combine chemotherapy with surgical resection of the tumor, thus achieving 70% of survival rates for localized OS. Unfortunately, for bad responders and in case of metastasis, survival rates are drastically reduced (20%), and the efficacy of chemotherapeutic agents is limited by their toxicity. Consequently, new therapeutic approaches are needed. But this search for new therapies is impeded by OS heterogeneity, leading to emergence of resistance and/or patients relapses. Targeting cancer specific mechanisms appears therefore to be a promising strategy, limiting drug resistance, while sparing normal cells and avoiding heavy side effects.

Cellular stress is one common characteristic between all tumor cells. Indeed, tumor cells are constantly in stress, due to their fast metabolism and high proliferation rates. These cells are therefore addicted to stress-protecting mechanisms, and could be sensitive to therapeutic strategies targeting cellular stress response. My thesis aims to understand the implication of two stress-protecting proteins in the development of OS, using *in vitro* and *in vivo* models. The first project evaluates the implication of HSF1, the major stress response regulator, in OS. The second project studies the targeting of MTH1, guardian of genome integrity against oxidative stress, in OS.